

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

Caracterización de transportadores necesarios para la compartimentación de la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*



Lda. Marta Fernández Aguado León, 2014



Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

Caracterización de transportadores necesarios para la compartimentación de la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*.



Lda. Marta Fernández Aguado

León, 2014



Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

Caracterización de transportadores necesarios para la compartimentación de la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*.

Memoria presentada por

MARTA FERNÁNDEZ AGUADO

Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor

por la Universidad de León



Estudios de Doctorado

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹

Los Dres. D. Juan Francisco Martín Martín y D. Ricardo Vicente Ullán como Directores² de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización de proteínas transportadoras de relevancia para compartimentación de la biosíntesis de penicilina G en *Penicillium chrysogenum*" realizada por Dña. Marta Fernández Aguado en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 25 de Acosto de 2014

Fdo.: Dr. D. Juan Francisco Martín Martín

Ricato

Dr. D. Ricardo Vicente Ullán

¹ Solamente para las tesis depositadas en papel.

² Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

El presente trabajo ha sido realizado en el Área de Microbiología del Departamento de Biología Molecular, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León bajo la dirección de los Doctores Don Juan Francisco Martín Martín y Don Ricardo Vicente Ullán. A D. Juan Francisco Martín Martín me gustaría agradecerle que me permitiera incorporarme a su grupo de investigación y su inestimable contribución para la consecución de financiación para el desarrollo de este trabajo. A D. Ricardo Vicente Ullán le agradezco la continua dedicación y apoyo incluso en los momentos de flaqueza, porque este trabajo no habría sido posible sin su colaboración. Desde estas líneas también quisiera agradecer a la Junta de Castilla y León y al Fondo Social Europeo la concesión de una beca/contrato para la contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria, cofinanciada por ambos organismos (número de contrato: Q2432001B). Finalmente, agradecer también a la actual dirección del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) el haber permitido el desarrollo de la parte experimental de este trabajo en las instalaciones de INBIOTEC.

Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Es hora de comprender más, para temer menos.

Marie Sklodowska Curie

Física, matemática y química. (Varsovia, Polonia 1867-Passy, Francia 1934)

Resérvate el derecho de pensar: incluso equivocarse es mejor que no pensar nada.

Hipatia de Alejandría

Filósofa y maestra neoplatonista. (370 – 425)

Abreviaturas y acrónimos

6-APA: ácido 6-aminopenicilánico

C: citosina

AAAP: *Amino Acid Auxin Permease* (familia de transportadores aminoacídicos)

AAP: *Amino Acid Permease* (familia de transportadores aminoacídicos)

ABC: *ATP Binding Cassette* (familia de transportadores MDR)

ACV (o LLD-ACV): L-(α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (forma reducida)

ACVS: ACV sintasa

ad-7-ACA: adipil-7-aminiocefalosporánico

ad-7-ADAC: ácido adipil-7aminodesacetilcefalosporánico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNdc: ADN de doble cadena

ADNsc: ADN de cadena sencilla

AMP: adenosina monofosfato

APC: *Amino acid Polyamine Cation* (familia de transportadores para aminoácidos)

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ATP: trifosfato de adenosina

bis-ACV: ACV en su forma oxidada (homodímero de ACV)

BLASTp: *protein-protein Basic Local Alignment Search Tool* (herramienta informática para el alineamiento de secuencias proteicas) **C-terminal:** carboxi-terminal (tipo de extremo, en una proteína)

C_i: *inward open* (modalidad conformacional en un transportador MFS)

Ci-S: *inward occluded* (modalidad conformacional en un transportador MFS)

Co: *outward open* (modalidad conformacional en un transportador MFS)

Co-S: *outward occluded* (modalidad conformacional en un transportador MFS)

CEPA: Campania Española de Antibióticos

CoA: coenzima A

CPC: cefalosporina C

Cys: cisteína

DAC: desacetilcefalosporina C

DAOC: desacetoxi-cefalosporina C

DdRP: *DNA dependent RNA polymerase* (ARN polimerasa dependiente de ADN)

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente mejorada)

G+/G-: Gram +/Gram -

G: guanine

Gly: glicina

GTPasa: guanosina trifosfatasa

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografía líquida de alta eficacia)

IAT: isopenicilina N acil-transferasa

IPN: isopenicilina N

IPNS: IPN sintetasa

kb: kilobase

kDa: kilodalton

LAT: L-lisina-aminotransferasa

MATE: *Multidrug and Toxic Compounds Efflux* (familia de transportadores MDR)

Mb: Megabase

MDR: *Multi Drug Resistance* (resistencia multidroga. Se ha empleado para hacer referencia a una familia de transportadores o a un transportador concreto)

MFS: Major Facilitator Superfamily (se ha empleado para hacer referencia a una familia de transportadores MDR o a un transportador concreto)

mg: miligramo

ml: mililitro

mm: milímetro

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAG: N-acetilglucosamina

NAM: ácido N-acetilmurámico

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information* (Centro Nacional para la Información en Biotecnología estadounidense)

NRPS: *Nonribosomal Peptide Synthetase* (sintesasa de péptidos no ribosomales)

NRRL: *Northern Regional Research Laboratory* (Laboratorio de investigación de la región de Norte)

N-terminal: amino-terminal (tipo de extremo, en una proteína)

ORF: *Open Reading Frame* (Marco de lectura abierto)

P6CD: piperidin-6-carboxilato deshidrogenasa

PAA: ácido fenilacético, fenilacetato

pb: par de bases

PBP: *Penicillin Binding Protein* (Proteínas fijadoras de penicilina)

PCL: fenilacetil-CoA ligasa

PenG: penicilina

PenN: penicilina N

PPTasa: 4'-fosfopantentenil transferasa

PTS1: *Peroxisomal targetting signal 1* (señal de direccionamiento a peroxisomas de tipo 1)

PW2: Power 2 (medio de cultivo complejo para *Penicillium*)

RdRP: *RNA dependent RNA polymerase* (ARN polimerasa dependiente de ARN)

RISC: *RNA Induced Silencing Complex* (complejo para el silenciamiento inducido por ARN)

RND: *Resistance Nodulation Division* (familia de transportadores MDR)

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

S: svedberg

s: siglo

siRNA: *small interference RNA* (pequeño RNA de interferencia)

SMR: *Small Multidrug Resistance* (familia de transportadores MDR)

TLC: *Thin Layer Chromatography* (cromatografía en capa fina)

TMS: *Transmembrane Segment* (segmento transmembranal)

TrxA: tiorredoxina disulfuro reductasa

UV: Ultravioleta

μg: microgramo

\$: dólar americano

C: grado Celsius

II Indice

Capítulo 1: Introducción 1	1
1. Las penicilinas: visión general	3
1.1. Concepto de antibiótico	3
1.2. Historia breve del descubrimiento de la penicilina	3
1.2.1. El descubrimiento de la penicilina	4
1.2.2. La investigación acerca del poder terapéutico de la penicilina se retoma en la Universi de Oxford	dad 6
1.2.3. La investigación y la producción de penicilina se concentra en Estados Unidos	7
1.2.4. Las compañías americanas se implican en el reto de producir penicilina a gran escala.	8
1.2.5. La Segunda Guerra Mundial y la producción comercial de penicilina	8
1.2.6. La llegada de la penicilina a una España bajo el régimen franquista	9
1.3. Desarrollo de cepas de <i>Penicillium</i> superproductoras de penicilina	10
1.4. Características de las penicilinas	13
1.4.1. Características estructurales de las penicilinas	13
1.4.2. Mecanismo de acción de las penicilinas	14
2. <i>Penicillium</i> , el productor de penicilinas	15
2.1. Características de <i>Penicillium chrysogenum</i>	15
2.1.1 Características generales de los hongos	15
2.1.2. Hábitats y relevancia de <i>P. chrysogenum</i> en los ecosistemas y para el ser humano	17
2.1.3. Características morfológicas de <i>Penicillium</i>	18
2.1.3.1. Morfofisiología del micelio y producción de penicilinas en <i>P. chrysogenum</i> .	20
2.1.4. Estadío sexual de <i>P. chrysogenum</i>	21
2.2. Taxonomía y filogénica de <i>Penicillium chrysogenum</i>	21
2.2.1. Taxonomía y posición filogenética del hongo productor de penicilina	22
2.2.2. La sección Chrysogena de Penicillium sensu stricto	24

2.3. Características genéticas, transcripcionales y proteómicas y su relación con la capacidad de producción de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> 20
2.3.1. Características físicas del genoma
2.3.2. El <i>cluster</i> de biosíntesis de penicilina en el genoma
2.3.3. Características transcripcionales relacionadas con la capacidad productora de penicilina
2.3.4. Perfil proteómico de cepas productoras de penicilina
3. La ruta de biosíntesis de penicilina G en <i>P. chrysogenum</i>
3.1. Los genes de la ruta biosintética: organización y origen evolutivo de los genes biosintéticos
3.1.1. Organización génica de los genes de biosíntesis de penicilinas en <i>P. chrysogenum</i>
3.1.2. Origen evolutivo de los genes de biosíntesis de penicilina
3.2. Etapas de la ruta de biosíntesis de PenG
3.2.1. Biosíntesis de cisteína, valina y L-α-aminoadipato
3.2.2. Biosíntesis de δ-(L- α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina
3.2.3. Biosíntesis de isopenicilina N
3.2.4. Biosíntesis de penicilina G
3.2.5. Activación del ácido fenilacético, precursor de la cadena lateral de la PenG 40
4. Compartimentación de la biosíntesis de penicilina G 4
4.1. Compartimentación de la ruta de biosíntesis de PenG en <i>P. chrysogenum</i>
4.2. El transporte celular en la ruta de biosíntesis de PenG
4.2.1. Visión general del transporte celular
4.2.1.1. Modalidades de transporte a través de membranas biológicas
4.2.1.2. Transportadores de resistencia multidroga
I. Descripción general de los transportadores MDR
II. La superfamilia MFS (<i>Major Facilitator Superfamily</i>)
i. Características estructurales de los MFSs
ii. Mecanismo de transporte de los MFSs44
4.2.1.3. Transportadores MDR en <i>P. chrysogenum</i>
4.3. Compartimentos subcelulares importantes en la ruta de biosíntesis de PenG en <i>P. chrysogenum</i> 52
4.3.1. La membrana plasmática en la ruta de biosíntesis de PenG
4.3.1.1. Transporte a través de la membrana plasmática

I. Transporte de aminoácidos5	53
II. Transporte de ácido fenilacético5	54
III. Transporte de intermediarios de la biosíntesis de PenG5	54
IV. Transporte de PenG5	55
4.3.2. El citoplasma y la ruta de biosíntesis de PenG	56
4.3.3. L a vacuola en la ruta de biosíntesis de PenG	56
4.3.3.1. Papel fisiológico de las vacuolas fúngicas	56
I. La vacuola como compartimento para el almacenamiento de aminoácidos	
	57
II. La vacuola como compartimento para el almacenamiento de cationes	57
III. Estado de desarrollo de la hifa y morfología de las vacuolas5	58
4.3.4. El peroxisoma en la biosíntesis de PenG	58
4.3.4.1. Visión general del peroxisoma	58
I. Biogénesis y degradación de peroxisomas en hongos filamentosos5	59
4.3.4.2. El papel de los peroxisomas en la ruta de biosíntesis de betalactamas5	59
I. Autofagia de peroxisomas y su influencia en la producción de penicilinas	
	51
4.3.4.3. Transporte de betalactamas y sus intermediarios a través de la membrana peroxisomal	52
4.4. Proteínas transportadoras con influencia sobre la ruta biosintética de betalactamas	54
5. Objetivos y metodología	56
5.1. Presentación de los objetivos de la presente Tesis Doctoral	56
5.2. Procedimiento para la caracterización de los genes y proteínas diana de <i>P. chrysogenum</i>	58
I – Determinación de la proteína de <i>P. chrysogenum</i> con mayor homología a la proteína referencia (de <i>A. chrysogenum</i>) y del gen que la codifica y caracterización <i>in silico</i> de ambos 7	de 70
II – Silenciamiento de gen diana mediante siARNs y determinación del efecto del silenciamien sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibiótico 	nto s 70
III – Sobreexpresión del gen diana mediante el uso de un promotor de expresión fuerte caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG	эу 71
IV – Determinación de la localización <i>in vivo</i> de la proteína diana empleando proteínas de fus fluorescentes	ión 72
5.3. Silenciamiento mediante ARNi mediado por siARN	72

5.3.1. Mecanismo de ARNi mediado por siARN73	3
5.3.2. Inducción del mecanismo de ARNi	4
Capítulo 2: Publicaciones originales77	7
Artículo 1: Una proteína vacuolar afecta drásticamente a la biosíntesis del tripéptido ACV y a la ruta o biosíntesis de betalactamas en Penicillium chrysogenum	le 1
Artículo 2: El transporte de ácido fenilacético a través de la membrana del peroxisoma está mediado por proteína PaaT en <i>Penicillium chrysogenum</i> 105	la 5
Artículo 3: Nuevos datos sobre el transporte de isopenicilina N en <i>Penicillium chrysogenum</i>	7
Capitulo 3: Resultados y Discusión155	5
1. Proteínas transportadoras en la biosíntesis de betalactamas. Relevancia y caracterización	7
1.1. La reedición de la investigación de los compuestos betalactámicos por la industria farmacéutica152	7
1.2. Compartimentación de la biosíntesis de penicilina en <i>P. chrysogenum</i>	0
1.2.1. La compartimentación metabólica desde la perspectiva de la evolución162	1
1.2.2. Origen evolutivo de los peroxisomas162	2
1.3. Compartimentación de las rutas metabólicas163	3
1.4. Papel de las proteínas transportadoras en la compartimentación metabólica	3
2. Caracterización de PenV, PaaT y PenM160	6
2.1. Una proteína vacuolar afecta drásticamente a la biosíntesis del tripéptido ACV y a la ruta o biosíntesis de betalactamas en <i>Penicillium chrysogenum</i>	le 6
2.1.1. Determinación de la proteína de <i>P. chrysogenum</i> con mayor homología a la proteína Ce de <i>A. chrysogenum</i> y del gen que la codifica. Caracterización <i>in silico</i> de <i>penV</i> /PenV	fP 7
2.1.2. Silenciamiento de gen diana mediante siRNAs y determinación de efecto del silenciamient sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibiótico 	to os 8
2.1.3. Sobreexpresión del <i>penV</i> mediante el uso de un promotor de expresión fuerte caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG169	у 9
2.1.4. Determinación de la localización <i>in vivo</i> de la proteína de fusión fluorescente ro PenV-DsRed	ija 0
2.2. El transporte de ácido fenilacético a través de la membrana del peroxisoma está mediado por proteína PaaT en <i>Penicillium chrysogenum</i>	la 1
2.2.1. Determinación de la proteína de <i>P. chrysogenum</i> con mayor homología a la proteína Cer de <i>A. chrysogenum</i> y del gen que la codifica. Caracterización <i>in silico paaT</i> /PaaT172	fT 1
2.2.2. Silenciamiento de <i>paaT</i> mediante siRNAs y determinación del efecto del silenciamien sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibiótico	to os 3

2.2.4. Determinación de la localización <i>in vivo</i> de la proteína de fusión fluorescente roja PenV-DsRed
2.2.5. Ensayo de tolerancia a PAA de las cepas genéticamente modificadas en <i>paaT</i> 175
2.3. Nuevos datos sobre el transporte de isopenicilina N en <i>Penicillium chrysogenum</i>
2.3.1. Determinación de la proteína de <i>P. chrysogenum</i> con mayor homología a la proteína CefM de <i>A. chrysogenum</i> y del gen que la codifica. Caracterización <i>in silico</i> de <i>penM</i> /PenM177
2.3.2. Silenciamiento de <i>penM</i> mediante siRNAs y determinación de efecto del silenciamiento sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibióticos
2.3.3. Sobreexpresión del <i>penM</i> mediante el uso de un promotor de expresión fuerte y caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG
2.3.4. Determinación de la localización <i>in vivo</i> de la proteína de fusión fluorescente roja PenM-DsRed
2.3.5. Ensayo de transporte de intermediarios179
2.4. PenV, PaaT y PenM en el contexto de la red de transporte de la ruta de biosíntesis de PenG y <i>P. chrysogenum</i>
3. Consideraciones finales a los fenómenos de transporte en la ruta de biosíntesis de penicilina
Capítulo 4: Conclusiones185
1. Compendio de conclusiones
1.1. Conclusiones experimentales (<i>penV</i> /PenV)
1.2. Conclusiones experimentales (<i>paaT</i> /PaaT)
1.3. Conclusiones experimentales (<i>penM</i> /PenM)
1.4. Conclusiones teóricas generales190
Anexo191
Bibliografía201



Capítulo 1 **Introducción** **Imagen portada Capítulo 1**: Estructura conidiogénica del extremo distal del micelio de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 tras 72 horas de crecimiento en medio de esporulación PW2 (Fernández-Aguado et al., 2013a). La técnica empleada fue la de microcultivo. La fotografía fue tomada con cámara de captura de imágenes acoplada a microscopio óptico y utilizando el objetivo 100 X.

Las penicilinas: visión general

1.1. Concepto de antibiótico.

1

El término antibiótico, acuñado por primera vez por Selman Waksman en 1941 (Waksman y Woodruff 1941), designaba a cualquier sustancia secretada por un microorganismo, con capacidad de impedir el desarrollo normal (efecto bacteriostático) o provocar la muerte (efecto bactericida) de otros microorganismos. Actualmente, en la terminología médica el significado del término antibiótico se ha ampliado para designar también a derivados sintéticos generados por la modificación de los productos microbianos naturales, antimicrobianos puramente sintéticos (como las quinolonas y las sulfamidas) y por extensión, cualquier sustancia con propiedades antimicrobianas descubiertas empíricamente.

Los antibióticos naturales (los producidos por los microorganismos) son metabolitos secundarios, sintetizados al final de la fase exponencial de crecimiento del organismo productor. Los antibióticos son de carácter no esencial para el microorganismo que los produce, es decir, que no son necesarios para su supervivencia y se forman a partir de metabolitos o intermediarios de las vías metabólicas primarias, mediante enzimas que tienen especificidades diferentes de las del metabolismo (Vining, 1992; Ledingham y Warrell 2000; Martín, 2000). Generalmente se trata de sustancias de bajo peso molecular que ejercen su acción incluso a pequeñas concentraciones.

El ámbito de aplicación de los antibióticos lo conforman la medicina humana y la veterinaria para el control y erradicación de microorganismo patógenos sensibles. Este uso terapéutico de los antibióticos es posible gracias a que presentan una toxicidad selectiva, es decir, pues mientras que resultan dañinos para el microorganismo patógeno, no afectan o son relativamente inocuos para el huésped infectado. Desde la comercialización, en los años 40 del siglo XX, del que se considera el primer antibiótico, la penicilina, estos agentes han constituido la medida terapéutica de mayor éxito en la reducción de los porcentajes de mortalidad (López-Brea y Alarcón-Cavero 2001).

1.2. Historia breve del descubrimiento de la penicilina.

El primer antibiótico empleado masivamente en la práctica médica fue la bencilpenicilina o penicilina G (PenG), una sustancia producida de forma natural por algunas cepas de hongos filamentosos del género *Penicillium*.

La historia del descubrimiento de la penicilina ha sido plasmada por escrito previamente en diversas obras, entre ellas, las consultadas para la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral: la editada para conmemorar el 25º aniversario de la compañía Antibióticos S.A. (Antibióticos S.A. (1974) *Editores* F. Mellizo, Madrid) y la editada para celebrar la designación del descubrimiento de las penicilina como "Hito Químico Histórico Internacional" por la *Royal Society of Chemistry* y la *American Society of Chemistry* (The discovery and development of penicillin: 1928-1945 (1999). *Editores* American Chemical Society. International Historic Chemical Landmark program).

1.2.1. El descubrimiento de la penicilina.

El descubrimiento de la penicilina se atribuye al bacteriólogo escocés Sir Alexander Fleming, pero muchas civilizaciones de la antigüedad ya conocían y aprovechaban, sin saberlo, las propiedades bactericidas de los mohos, al llevar a cabo ciertas prácticas tradicionales arraigadas en las diferentes culturas (Tabla suplementaria 1). No en vano, el descubrimiento de Fleming estuvo enmarcado dentro de una corriente centrada en la investigación del fenómeno de la antibiosis natural que exhibían ciertos hongos microscópicos frente a poblaciones bacterianas. Muchos investigadores de diferentes países y en diferentes épocas, como Vicenzo Tiberio (Italia), Ernst Duchesne (Francia) o Clodomiro Twight (Costa Rica) por citar algunos, llegaron a constatar la acción bactericida de los mohos mediante aproximaciones científicas (Tabla suplementaria 1). Sin duda, en algunos casos existía un conocimiento, por parte de los investigadores, de investigaciones contemporáneas o previas que habrían sido llevadas a cabo sobre el poder bactericida de los hongos. Por unas u otras circunstancias ninguno de estos trabajos recibió el respaldo necesario por parte de la comunidad científica, para haber culminando, quizás, en el descubrimiento de la sustancia responsable de la antibiosis fúngica antes del momento en que este evento ocurriera en realidad.

La suerte de los trabajos de Fleming sobre la penicilina fue muy diferente a la de los otros trabajo previos, al ser retomadas, cuando él ya las había abandonado, por unos visionarios que apostaron por el potencial terapéutico de la penicilina. Esto marcaría un punto de inflexión en la historia de la medicina, cambiando radicalmente la forma en que el ser humano pudo hacer frente a muchas enfermedades infecciosas. De hecho, antes de la introducción de la penicilina en la práctica médica no había un tratamiento efectivo contra infecciones como la neumonía (*Streptococcus penumoniae, Haemophilus influenzae*), la gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*) o la fiebre reumática (*Streptococcus pyogenes*) y una simple y pequeña herida infectada podía ser el origen de una septicemia mortal.

Fleming trabajaba en el laboratorio de bacteriología del Hospital de Santa María de Londres cuando fue enviado a filas durante la Primera Guerra Mundial (1914-1918). Con el grado de "*Capitán de Cuerpos Médicos de la Armada Real*", fue destinado al hospital de Bolonia, en Francia. Allí fue testigo de cómo las infecciones de las heridas de los combatientes acababan con más vidas que las propias armas. Durante este periodo bélico Fleming aplicaba a los heridos arsfenamina (Salvarsán), un compuesto sintético que contenía arsénico orgánico, descubierto por el médico y bacteriólogo polaco Paul Erlich, en 1910 (Bosch y Rosich 2008). La arsfenamina se aplicaba para tratar la sífilis (causada por *Treponema pallidum*) y fiebres recurrentes. Fleming pensaba que debían de existir otros compuestos con una actividad similar a la de la arsfenamina que ayudaran a combatir las infecciones que tantas vidas estaban costando.

Ya de regreso a su laboratorio en el Hospital Santa María, teniendo en mente su experiencia durante el conflicto bélico, Fleming se dedicó a la búsqueda de antisépticos eficaces. Así descubrió la lisozima (Fleming, 1922), una enzima presente en fluidos corporales, como las lágrimas, la saliva y el plasma

4

sanguíneo, así como en el bazo y los pulmones. Las lisozimas tienen un efecto antibacteriano natural, al hidrolizar los enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ del peptidoglicano de la pared celular bacteriana (*ver* Introducción - 1.4.2. Mecanismo de acción de las penicilinas), aunque contra los agentes infecciosos más virulentos son poco efectivas.

Fleming continuaba buscando activamente sustancias bactericidas cuando al regreso de las vacaciones del verano de 1928 se percató de que una placa que había inoculado con *Staphilococcus aureus* se había contaminado accidentalmente con un hongo. En vista de la cepa fúngica que creció en la placa, se piensa que esporas fúngicas procedentes del laboratorio de micología del hospital, situado escaleras abajo del de Fleming, habrían llegado de algún modo hasta el medio de cultivo que el bacteriólogo posteriormente emplearía para crecer los estafilococos con los que estaba trabajando. Lo que llamó poderosamente la atención de Fleming, no fue la contaminación fúngica en sí, sino que en torno a la colonia del hongo contaminante había un halo de transparencia en el cultivo bacteriano, lo que significaba que las células de *S. aureus* habían sido destruidas en esa área. Fleming interpretó que alguna sustancia producida por el hongo difundía a través del medio provocando la muerte de las células estafilococales a las que alcanzaba (Figura 1). Fleming resembró y aisló la cepa fúngica y la ensayó frente a otros bacterias, mostrando esta actividad antibiótica también frente a *S. pyogenes*, pneumococos, gonococos y meningococos, pero no frente a *Bacillus typhosus, Bacillus dysenteriae* y *Escherichia coli*.



Figura 1. La observación *in vitro* de la antibiosis ejercida por una cepa de *Penicillium* sobre un cultivo de estafilococos fue crucial para el inicio de la investigación sobre el poder quimioterápico de la penicilina a principios del s. XX. (A) Reproducción de la placa de cultivo original en la que Fleming observó como alrededor de la colonia de *Penicillium* la abundancia de colonias estafilococales era menor que en regiones más alejadas de colonia fúngica. (B) Muestra de la cepa original de *Penicillium* con la que trabajó Fleming, conservada en una caja de oro. Fleming regaló muestras similares a algunos colegas y otras personalidades como el presidente británico Winston Churchill o el papa Pío XII.

Sin los conocimientos suficientes de micología, Fleming acudió a un estudiante, La Tauche, quien identificó el hongo de Fleming, bastante acertadamente, como *Penicillium rubrum*. Por eso a la sustancia bactericida que este producía se la nombró penicilina. Años más tarde, Charles Thom, un eminente micólogo estadounidense, corregiría esta identificación inicial, sabiéndose entonces que el hongo de Fleming era en realidad *Penicillium notatum*.

Frederick Ridley y Stuart Craddock primero y P.W. Clutterbuck, Reginald Lovell y Harold Raistick después, trabajaron en un método para extraer la penicilina. En 1930 lograron obtener una solución cruda de *P. notatum*, con la que llegaron a inyectar conejos y ratones demostrando su inocuidad. La solución

obtenida tenía escasa actividad antibiótica, a pesar de lo cual fue empleada con cierto éxito sobre infecciones tópicas locales. Sin embargo, la penicilina no pudo ser aislada ni purificada debido a su gran inestabilidad. Además tampoco fue revelado su verdadero potencial quimioterápico porque no se probó su eficacia para combatir infecciones sistémicas.

En vista de estos pobres resultados Fleming abandonó el estudio de la penicilina como agente terapéutico en favor de las recién aparecidas sulfamidas. Las sulfamidas eran unos antibacterianos bacteriostáticos sintéticos de amplio espectro, que habían probado su eficacia contra infecciones estreptocócicas, aunque presentaban cierto grado de toxicidad debido al arsénico que contienen. En cuanto a la penicilina, Fleming restringió su utilidad al ámbito del laboratorio bacteriológico, como agente selectivo para el aislamiento de microorganismos resistentes a partir de cultivos mixtos y para la elaboración de vacunas contra especies patógenas, mencionando muy de soslayo el potencial antibiótico de la penicilina en un trabajo que remitió a la revista *British Journal of Experimental Pathology*, y que no suscitó mayor interés (Fleming, 1929).

1.2.2. La investigación acerca del poder terapéutico de la penicilina se retoma en la Universidad de Oxford.

Hacia 1938, en la Escuela de Patología Sir William Dunn de la Universidad de Oxford, en el laboratorio de Howard Walter Florey, donde se llevaba a cabo un estudio sobre los mecanismos de acción de agentes antibacterianos naturales, se consiguió que la penicilina pasara de ser una curiosidad de laboratorio a una realidad clínica sin precedentes.

Florey, que dirigía el laboratorio de Patología, contrató a Ernst Boris Chain, quien movido por los intereses del propio Florey, se mostró a favor de la búsqueda de sustancias antibacterianas. Al hacer una revisión bibliográfica de los trabajos publicados sobre antibacterianos, dio con los trabajos sobre la lisozima publicados por Fleming y así llegó también a leer su trabajo sobre la penicilina de 1929. Florey y Chain se inclinaron por el estudio de la penicilina frente a otras sustancias potencialmente antibacterianas. Para llevar a cabo el trabajo fueron contratados un buen número de investigadores (entre ellos Norman Heatly) y técnicos, que conformaron un grupo multidisciplinar y altamente competente.

El equipo dirigido por Florey retomó los estudios de Fleming y comenzaron a trabajar en la purificación y caracterización química de la penicilina hacia 1939. Para ello, tuvieron que dar solución a muchas cuestiones técnicas: hubo que poner a punto el método de cultivo del hongo para incrementar la productividad, diseñar un protocolo eficaz de extracción y purificación de la lábil penicilina, refinar los ensayos para testar la potencia antibiótica de los extractos de penicilina purificada y hacer un escalado de la producción para obtener la mayor cantidad de penicilina posible.

Los problemas de financiación eran un obstáculo añadido a las investigaciones sobre la penicilina, pues el contexto bélico de la Segunda Guerra Mundial en el que Inglaterra se encontraba inmersa, dificultaba la llegada de fondos para avalar una investigación aún demasiado incipiente. El apoyo económico para el proyecto de la penicilina finalmente llegó de la mano la Fundación Rockefeller estadounidense y del Consejo Británico y así el grupo de Oxford pudo volcarse en la investigación de la penicilina.

Heatly y Edward Abraham, un colaborador, diseñaron un método de purificación en el que aún se basan los métodos modernos. Este método consistía en la acidificación del medio en el que se había cultivado *Penicillium*, seguida de una extracción orgánica en condiciones de alcalinidad y una posterior resolubilización a contracorriente de la penicilina en una fase acuosa. La penicilina así solubilizada era purificada eliminando las impurezas acompañantes mediante una cromatografía en columna de alúmina. Posteriormente la penicilina pura era concentrada para poder emplearla en ensayos clínicos. Se estima que esta penicilina, aún bastante impura, no contendría más de 4 unidades de actividad por miligramo.

Las primeras pruebas de toxicidad de la penicilina se hicieron sobre cultivos celulares y tejidos bajo la dirección de Sir Peter Medawar, del departamento de Zoología de la Universidad de Oxford. Tras haber determinado *in vitro* el umbral citotóxico de la penicilina, en 1940 se probó por primera vez la eficacia de la penicilina purificada en seres vivos. El Dr. José Trueta llevó a cabo un ensayo mediante el que se demostró que la penicilina protegía a ratones de una infección letal por estreptococos virulentos, demostrando así experimentalmente la potencial validez de la penicilina para la curación de enfermedades infecciosas. Estos resultados fueron publicitados a través de la prensa y a pesar del conflicto armado, muchos grupos de científicos en todo el mundo conocieron estos avances relativos a la penicilina (Chain y col. 1940).

Sin embargo, aún faltaba por probar la eficacia de la penicilina en seres humanos. En el año 1941, un paciente aquejado de una septicemia severa que afectaba a muchos de sus órganos y que no respondía a ningún otro tratamiento, fue el primero en ser tratado con la penicilina purificada por el grupo de Oxford. Dada la escasez de penicilina, para poder prolongar el tratamiento, el fármaco era incluso parcialmente recuperado de la orina del propio paciente. Tras una mejora notable de su estado tras la administración del antibiótico, el paciente acabó falleciendo al terminarse la reserva de penicilina purificada, sin que el tratamiento hubiera tenido una duración suficiente. Mediante estos primeros ensayos clínicos fueron tratados con penicilina seis pacientes, de los cuales sólo habrían fallecido dos. En el resto, las infecciones fueron atajadas con éxito, incluso cuando las sulfamidas habían fracasado. El problema era que para conseguir la cantidad de penicilina necesaria para tratar a un solo enfermo, se requería un mes entero de trabajo. Aún así, con estos primeros éxitos tras la aplicación de la penicilina se había dado un primer paso esperanzador en la medicina, debido a lo cual enseguida surgió interés por producir la penicilina a gran escala para poder extender su uso por todo el mundo.

1.2.3. La investigación y la producción de penicilina se concentra en Estados Unidos.

Para poder repetir los ensayos clínicos que confirmasen los prometedores resultados obtenidos hasta aquel momento y para incrementar las reservas de penicilina que permitieran cubrir todas las necesidades terapéuticas, se hacía necesario escalar la producción a tasas industriales. La capacidad de la industria químico-farmacéutica británica estaba fuera de toda duda, pero la situación reinante de crisis bélica, económica y humanitaria le impedía asumir el reto de lograr la producción de penicilina a gran escala en aquel momento.

Estas circunstancias propiciaron el traslado de Florey y Heatly a Estados Unidos en el verano de 1941, con el fin de conseguir que centros académicos de investigación e industrias americanas se involucraran en el proyecto de la penicilina. Una vez allí Florey y Heatly recalaron en el "*Laboratorio de Investigación de la Región del Norte*" (*Northern Regional Research Laboratory*, abreviado NRRL) de Peoria, Illinois. En este centro contaban con la experiencia práctica y las infraestructuras necesarias para la mejora del crecimiento y de los procesos fermentativos fúngicos. No en vano, desde el NRRL se harían contribuciones innovadoras que hicieron posible aumentar enormemente el rendimiento de penicilina. Para ello el personal del NRRL puso a punto un método de fermentación a escala industrial y seleccionó una estirpe fúngica con unas mejores cualidades productivas, la cepa denominada NRRL-1951, aislada a partir de un melón mohoso adquirido en un mercado de Peoría.

1.2.4. Las compañías americanas se implican en el reto de producir penicilina a gran escala.

En 1941, el ataque japonés a la base naval americana de Pearl Harbor, en Hawai, propició el ingreso de los Estados Unidos en la Segunda Guerra Mundial. Este hecho hizo que la producción de penicilina pasase a ser considerada por el gobierno estadounidense de máxima prioridad para poder tratar a los milicianos aliados heridos en los enfrentamientos. Gracias a ello, se impulsó un programa de colaboración entre el Gobierno Federal (incluido el NRRL) y varias compañías químicas y farmacéuticas para acelerar la producción de penicilina. Estas compañías adaptaron sus plantas de producción a las nuevas necesidades productivas, en algunos casos con el apoyo económico del gobierno, jugando así un papel muy importante en el traslado, adaptación y optimización del método de producción de penicilina desde la planta piloto hasta escala industrial (Figura 2: 2 B y 2 C).



Figura 2. El desarrollo y la aplicación clínica de la penicilina se produjo en un tiempo record y en pocos años se pasó de obtener penicilina de un modo casi artesanal a la producción mecanizada a gran escala. Esto fue posible gracias a una colaboración científica sin precedentes entre investigadores de grupos británicos y americanos patrocinada por sus respectivos gobiernos, urgidos por las necesidades sanitarias de las tropas aliadas en la Segunda Guerra Mundial. (A) Tarea rutinaria para la producción de penicilina a pequeña escala tal y como se llevaba a cabo en la Universidad de Oxford, utilizando los recipientes que permitían el cultivo en superficie del hongo. Las fermentaciones eran atendidas ininterrumpidamente por un grupo de mujeres conocidas como "*The Penicillin Girls*". (B) Tanques para la producción de penicilina en una factoría de Pfizer. (C) Imagen del interior de un tanque de fermentación para la producción de penicilina en una factoría de Merck. [Imágenes tomadas de American Chemical Society International Historic Chemical Landmarks. Discovery and Development of Penicillin. http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html].

1.2.5. La Segunda Guerra Mundial y la producción comercial de penicilina.

La urgencia del gobierno por disponer de suficientes reservas de penicilina y el esfuerzo de la industria hizo que la producción industrial de penicilina se incrementara mucho y en poco tiempo. Durante el periodo bélico los ejércitos aliados recibieron el 85 % de la producción nacional de penicilina, mientras que la población civil encontraba grandes dificultades para acceder al antibiótico.

Gracias a la sofisticación y las mejoras técnicas de los procesos productivos, a principios de 1944 la producción de penicilina comenzó a incrementarse exponencialmente. Este incremento de la capacidad productiva llevó asociada una caída del precio de la penicilina en el mercado, desde un valor incalculable en 1940, a 20 \$ por dosis (100000 unidades de penicilina) en 1943 y hasta 0.55 \$ por dosis al término del conflicto, facilitando el acceso de la población civil a los tratamientos. El gobierno de Estados Unidos

permitió la comercialización de penicilina en todas las farmacias del país en 1945 y el gobierno británico haría lo mismo en Junio de 1946.

La disponibilidad de la penicilina constituye uno de los triunfos médicos, científicos e industriales más relevantes de la historia y reportó reconocimiento social y académico a algunas de las personas involucradas en su desarrollo y aplicación. Por ejemplo, en Diciembre de 1945, tan sólo unos meses después del fin oficial de la II Guerra Mundial, los investigadores del grupo británico Fleming, Florey y Chain, fueron premiados conjuntamente con el Premio Nobel de Medicina por "*el descubrimiento de la penicilina y sus efectos curativos sobre varias enfermedades infecciosas*" (Figura 3). Aunque ellos recibieran el premio, muchos otros investigadores contribuyeron igualmente a la investigación de la penicilina y sin duda sin su colaboración la realidad de la penicilina habría sido muy diferente.



Figura 3. El descubrimiento, la producción a escala industrial y la aplicación clínica de la penicilina reportaron reconocimiento social y académico a algunos de los que participaron en hacer posible este éxito. En la imagen los investigaciones pioneros, aunque no los únicos, galardonados con el Nobel de Medicina de 1945 por sus trabajos con la penicilina (A) Alexander Fleming (1881-1955), bacteriólogo escocés fue quien aportó la cepa de *Penicillium* productora de penicilina. (B) Howard Walter Florey (1898-1968), patólogo y farmacólogo australiano, se ocupó del estudio de aspectos biológicos y farmacológicos de la penicilina; (C) Ernst Boris Chain (1906-1979), bioquímico alemán encargado de determinar las propiedades bioquímicas de la penicilina.

1.2.6. La llegada de la penicilina a una España bajo el régimen franquista.

En los años 40 del siglo XX, España no era ajena al fenómeno de la penicilina. Algunos grupos de investigación españoles se encontraban realizando estudios sobre la misma, aunque por aquella época la mayor parte de la producción mundial de penicilina procedía de Estados Unidos. En Septiembre de 1944 España llegó a un acuerdo comercial con el Gobierno norteamericano para recibir regularmente partidas del medicamento con el fin de cubrir las necesidades de la sociedad. A pesar del acuerdo con Estados Unidos, la penicilina seguía siendo un producto escaso en España completamente controlado por el régimen franquista y el pleno acceso de la población al medicamento no era real. En muchas ocasiones la penicilina que se consumía procedía de importaciones ilegales o incluso era obtenida de estraperlo y sometido a fraudes, falsificaciones y otros negocios ilícitos. El régimen franquista trataría de resolver la situación por la vía autárquica, abriendo un concurso para la designación de dos entidades españolas, que asumirían la explotación del monopolio de la penicilina al 50 %. El concurso fue ganado en 1949 por dos consorcios españoles: "Antibióticos" y "Compañía Española de Penicilina y Antibióticos" (CEPA) siendo este último un conglomerado bancario y de industrias. "Antibióticos" era una asociación de varios laboratorios españoles que había mostrado interés en la investigación de la penicilina y en su fabricación y registro (Santesmases, 2010; Bueno y Nozal, 2012).

1.3. Desarrollo de cepas de *Penicillium* superproductoras de penicilina.

Al término de la II Guerra Mundial se abrieron nuevas líneas de investigación en el terreno de la penicilina. Entre los nuevos objetivos estaban tanto la optimización del proceso de fermentación como el desarrollo de nuevas penicilinas biosintéticas alternativas a la clásica penicilina (PenG), en la que se habían centrado mayoritariamente los trabajos hasta entonces. La mejora de la productividad mediante el aislamiento y selección de nuevas cepas productoras con un enfoque meramente industrial, fue otro de esos objetivos (Demain y Elander 1999).

La cepa de *P. notatum* que Fleming y el equipo de Florey habían empleado en sus trabajos acerca de la penicilina en Inglaterra, tan sólo producía 1.2 µg/ml de antibiótico. La selección de cepas de Penicillium con un mejor perfil productivo comenzó en 1943 con el aislamiento en el laboratorio estadounidense NRRL de la cepa NRRL-1951 a partir de un melón mohoso. Con un rendimiento de 60-150 µg/ml (Raper y col. 1944) y con una mejor adaptación a las condiciones industriales de fermentación, esta cepa fue adoptada para iniciar los programas de producción de penicilina a gran escala. Desde entonces, a partir de esta cepa, se llevaron a cabo numerosas rondas de mutación y selección que permitieron el aislamiento de numerosas cepas mutantes que presentaban una mayor producción de antibiótico. En la Institución Carnegy (Cold Spring Harbor, Nueva York) mutaron mediante rayos X la cepa NRRL-1951, obteniendo la cepa X-1612, que producía 300 µg/ml. En la Universidad de Wisconsin irradiaron la cepa X-1612 con rayos UV y obtuvieron la cepa Wisconsin Q-176, con una producción de 550 µg/ml (Backus y Stauffer 1955). La cepa Q-176 fue la primera de la familia de cepas Wisconsin, un linaje de cepas productoras de penicilina a partir de la que se desarrollaron diversas cepas superproductoras en diferentes laboratorios independientes de distintos lugares del mundo. Son ejemplo de ello las cepas DS04825 [aislada por la compañía holandesa DSM Antinfectives (Gouka y col. 1991)], P2 [desarrollada por los laboratorios PanLabs de Taiwan (Lein, 1986)] y las cepas E1 y AS-P-78 [seleccionadas ambas en la factoría de Antibióticos S.A. (Fierro y col. 1995; Rodríguez-Saiz y col. 2001; Rodríguez-Saiz y col. 2005; Jami y col. 2010a; Jami y col. 2010b;)]. Aún hoy en día, estirpes derivadas directamente de algunas de estas cepas superproductoras son las que emplean las industrias para la producción de penicilina, alcanzándose producciones de más de 50 mg/ml. Estos niveles de producción de penicilina implican que desde 1943 se ha multiplicado tremendamente la productividad de las cepas empleadas, estimándose que las cepas industriales de Penicillium más modernas llegan a producir 100000 veces más penicilina que la cepa original de Fleming en cultivos de larga duración (fed-batch) (Elander, 2003; Rokem y col. 2007; Ozcengiz y Demain 2013). En el presente trabajo se ha empleado la cepa Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089/DSM 1075) como cepa de referencia, que con una producción aproximada de 800 µg/ml, es considerada una cepa de media-baja capacidad productiva (Elander, 1983).

En los programas de mejora de cepas productoras se inducían mutaciones mediante agentes tanto químicos (mostazas nitrogenadas, nitrosoguanidina, etc.) como físicos (rayos X, rayos UV). Aunque estas técnicas se seguirían empleando en la actualidad para la obtención de nuevas cepas de *Penicillium* mejoradas, presentan el inconveniente de que sus resultados son impredecibles ya que causan mutaciones totalmente aleatorias. Esto ha provocado que la base genética de la mejora de la producción en las cepas industriales, sea en gran parte desconocida a día de hoy.

Las sucesivas rondas de mutación y selección habrían ocasionado que las cepas superproductoras portaran mutaciones con efectos fenotípicos a muchos niveles, no sólo en aspectos directamente relacionados con la ruta biosintética (Jami y col. 2010a). El equilibrio entre todas las mutaciones habría generado cepas de alta producción estables en las que, por ejemplo, existiría una capacidad optimizada para la síntesis de los precursores biosintéticos, la expresión de ciertos transportadores relacionados con la ruta de biosíntesis estaría incrementada y agrupaciones génicas (clusters) implicadas en vías del metabolismo secundario (en competencia con la ruta de biosíntesis) estarían reprimidas. También existiría una base genética responsable de la morfología diferencial entre cepas de baja y alta producción (lo que influiría en su comportamiento durante las fermentaciones) y también para explicar el volumen peroxisomal incrementado en las cepas superproductoras (van den Berg y col. 2008; Weber y col. 2012a). Sin embargo, la presencia de múltiples copias genómicas del cluster de biosíntesis de penicilina (Barredo y col. 1989a; Fierro y col. 1995; Newbert y col. 1997; van den Berg y col. 2008) y la pérdida de actividad de una enzima que interviene en el catabolismo del ácido fenilacético (van den Berg y col. 2008; Weber y col. 2012a), son, hasta el momento, los únicos rasgos genéticos diferenciales entre la cepa de referencia Wisconsin 54-1255 y las cepas superproductoras que derivan de ella, para los que se ha podido demostrar una relación directa con la productividad incrementada de penicilinas en estas últimas (ver: Introducción - 2.3. Características genéticas, transcripcionales y proteómicas y su relación con la capacidad de producción de penicilina en *P. chrvsogenum*).

En los últimos años, apenas se han hecho progresos en la mejora de la productividad mediante ciclos de mutación al azar y selección, lo que hace pensar que estos métodos de mejora clásicos han alcanzado su cénit. Sin embargo la mutagénesis dirigida ofrece una vía alternativa para avanzar y obtener cepas con características mejoradas.

En este sentido, la ingeniería genética se ha empleado para reprogramar el metabolismo secundario de P. chrysogenum de forma que tenga la capacidad de producir otros metabolitos de interés, distintos a las propias penicilinas. Por citar dos ejemplos, cuando en P. chrysogenum se expresan los genes cefE/F (expandasa/hidrolasa) y cefG (DAC-acetiltransferasa) de A. chrysogenum, este es capaz de sintetizar ácido adipil-7-aminodesacetilcefalosporánico (ad-7-ADAC) que es convertido en ácido adipil-7-aminiocefalosporánico (ad-7-ACA). El ad-7-ACA puede ser extraído del medio de cultivo y mediante una glutaril-7-ACA-acilasa, puede ser convertido en 7-ACA (Monti y col. 2000) un precursor susceptible de ser modificado para la obtención de distintas cefalosporinas. También se ha conseguido que una cepa de P. chrysogenum que carece de la enzima IAT pero que expresa los genes cefD1, cefD2, cefEFy cefG de A. chrysogenum, produzca desacetilcefalosporina C (DAC) y cefalosporina C (CPC) (Ullán y col. 2007) (ver: Introducción - 3. La ruta de biosíntesis de penicilina G en P. chrysogenum).

Recientemente, el descubrimiento del ciclo sexual de *P. chrysogenum*, ha abierto una nueva e interesante vía aplicable en una nueva etapa de los programas de mejora de cepas. El fenómeno de reproducción sexual representa una herramienta de gran interés en la mejora de cepas de interés industrial, puesto que permite la generación de estirpes nuevas de una manera mucho más rápida y económica que mediante los procedimientos tradicionales de mutagénesis al azar o incluso mediante técnicas de ingeniería genética. Se podrían organizar cruzamientos dirigidos para obtener cepas hijas que reunieran caracteres de interés de ambos linajes progenitores, es decir, cepas recombinantes. La recombinación genética se produciría durante el proceso meiótico que precede a la formación de las esporas sexuales (ascosporas). Esta

recombinación abarcaría todo el genoma, lo que, por un lado, permitiría obviar la base genética subyacente a cada carácter que se desee modificar (imprescindible, por ejemplo, en la mutación selectiva de genes) y por otro generaría una descendencia abundante con una alta variabilidad genética, susceptible de ser seleccionada (Dyer y O'Gorman 2011).

Antibiótico	Anillo secundario	Núcleo antibiótico	Características estructurales
Penicilinas	Tiazolidina (5 miembros)	6-α-penicilánico	Átomo de azufre en 1. Radical carboxilo en 3 puede neutralizarse con Na+ o K+ modificando la solubilidad. Cadena lateral en 6 que varía de unas penicilinas a otras.
Cefalosporinas	Dihidrotiazínico (6 miembros) 2,3 dihidrotiazol. 3,6-dihidro-2H-1,3- tiazina	7- α -cefalosporánico R ₁ -NH H H J H H H J H H H H H H H H H H H H	Átomo de azufre en 1. Desaturación entre 3 y 4. La cadena lateral en 3 determina las características metabólicas y farmacológicas. La cadena lateral en 6 determina el espectro antimicrobiano y la potencia antibiótico.
Carbapenemas	Pirrolínico (5 miembros) 2,3-dihidro-1H- pirrolico	carbapenámico	 Átomo de carbono en 1. Enlace no saturado entre 2 y 3. Diferentes sustituyentes en 1 y 2 dan lugar a diferentes carbapenemas. Radical carboxilo en 3. En 6 siempre presentan un hidroxilo, que en posición trans protege el anillo betalactámico de las β-lactamasas.
Clavamas (Inhibidores de betalactamasas con estructura betalactámica)	oxazolidínico (5 miembros)	clavamo/oxapenamo	Átomo de oxigeno en 1, lo que las hace más reactivas que las penicilinas No hay cadena lateral acilamino en 6.
Monobactamas	ninguno	3- aminomonobactámico R-NH H CH ₃ O SO ₃	El grupo sulfónico (HSO3) unido a N(2) activa el anillo β-lactámico

Tabla 1. Antibióticos betalactámicos. Estructura y características químicas

1.4. Características de las penicilinas.

1.4.1. Características estructurales de las penicilinas.

Las penicilinas son antibióticos de naturaleza peptídica de la familia de los betalactámicos. Todos los antibióticos betalactámicos se caracterizan por incluir en su estructura el anillo betalactámico, un anillo de cuatro miembros responsable de la actividad antibacteriana de estos compuestos. Además presentan una segunda estructura cíclica conjugada con el anillo betalactámico (excepto las monobactamas, que sólo presentan este último), constituyendo un núcleo bicíclico. La estructura de este núcleo bicíclico permite clasificar los betalactámicos en cinco grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas y clavamas (Aharonowitz y col. 1992) (Tabla 1).



Figura 4. Muchos investigadores vinculados a la Universidad de Oxford contribuyeron con su trabajo a profundizar en el conocimiento de la penicilina, pues incluso la determinación de la estructura atómica esencial de este tipo de compuestos fue llevada a cabo por un grupo de esta universidad británica (A) Estructura química de la bencilpenicilina o PenG donde se observan el anillo betalactámico (de 4 miembros, sombreado en azul), el anillo tiazolidínico (de 5 miembros, sombreado en rosa) y la cadena lateral hidrófoba, que en esta penicilina incluye el radical fenilo (sombreado en verde). La PenG es la única penicilina natural aplicada en la práctica clínica. (B) La química Dorothy Mary Crowfoot Hodgkin (1910-1994) determinó la estructura atómica de la penicilina mediante cristalografía y difracción de rayos X, junto con su grupo de colaboradores. (C) Modelo tridimensional de la estructura atómica de la bencilpenicilina basado en el uso de tres mapas bidimensionales de densidad electrónica, tal y como los habría usado Hodgkin.

En las penicilinas, la estructura cíclica conjugada al anillo betalactámico es un anillo de tiazolidina de cinco miembros, y juntos constituyen el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) (Figura 4: 4 A). En la penicilinas, la posición 6 del anillo betalactámico está saturada con una cadena lateral que varía de unas penicilinas a otras. El anillo tiazolidínico y la cadena lateral, son conjuntamente responsables de las propiedades farmacológicas, el espectro antibacteriano, la susceptibilidad a betalactamasas y la potencia antibiótica de cada tipo de penicilina (López-Brea y Alarcón-Cavero 2001) (Figura 4: 4 A).

La estructura química esencial de la penicilina fue determinada mediante cristalografía y difracción de rayos X por el grupo de investigación liderado por Dorothy Mary Crowfoot Hodking en el año 1945, aunque los resultados no verían la luz hasta unos años más tarde (Hodking, 1949) (Figura 4: 4 B y 4 C). Crowfoot, que al igual que Florey y sus colaboradores, trabajaba en la Universidad de Oxford, recibiría el

premio Nobel de química en 1964 "*por la determinación de la estructura de muchas sustancias biológicas importantes mediante los rayos X*" (entre ellas, además de la penicilina, el colesterol, la vitamina B12, la insulina y un largo etc.).

1.4.2. Mecanismo de acción de las penicilinas.

Las penicilinas ejercen su acción antibacteriana inhibiendo la transpeptidación que es la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, el componente principal de la pared celular bacteriana. En las células eucariotas no existe ninguna estructura comparable a esta pared celular, lo que hace posible que la penicilina muestre una toxicidad diferencial respecto a las células bacterianas y las células eucariotas del organismo hospedador. Esta toxicidad selectiva, es imprescindible para el éxito terapéutico de las penicilinas.

La pared celular bacteriana es una estructura que envuelve las células por fuera de la membrana plasmática. Es esencial para la supervivencia de las células bacterianas por que las protege de la lisis osmótica, pero además les proporciona forma, controla la entrada de sustancias y resulta indispensable para la división celular y para la capacidad patogénica de la bacteria (Prescott y col. 1999). La pared celular muestra características diferentes en función de si la bacteria tiene fenotipo Gram positivo (G+) o Gram negativo (G-). En bacterias G+ la pared celular consiste únicamente en una gruesa capa de peptidoglicano. En bacterias G- la pared celular consta de dos capas: una membrana externa formada a base de lipopolisacáridos y proteínas y una capa fina de peptidoglicano entre la membrana externa y la membrana plasmática, lo que hace que, en general, este tipo de bacterias sean menos susceptibles a los antibióticos betalactámicos (Stanier y col. 1996).

El peptidoglicano es un heteropolímero lineal de restos alternantes de los aminoazúcares N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM) unidos mediante enlaces glucosídicos β (1-4). A los residuos de NAM hay unida una cadena corta de cinco aminoácidos o pentapéptido. Las cadenas heteropoliméricas NAG-NAM se disponen en capas en torno a la célula y las diferentes capas se encuentran unidas mediante los pentapéptidos de diferentes residuos NAM, que establecen entre sí puentes peptídicos. Estos puentes peptídicos estabilizan y fortalecen el peptidoglicano. La reacción por la cual se forma el enlace peptídico entre los pentapéptidos del peptidoglicano recibe el nombre de transpeptidación, y la llevan a cabo enzimas fijadoras de penicilina (PBPs, por su denominación en inglés <u>Penicillin Binding Proteins</u>) con diferentes actividades (carboxipeptidasa, transpeptidasa, endopeptidasa). Todas las PBPs tienen una conformación similar y las penicilinas las inhiben debido a la analogía estructural que existe entre el núcleo penam y la porción terminal de los pentapéptidos del peptidoglicano (que es el sustrato de las PBPs en las reacciones de transpeptidación). Esta analogía estructural hace que las penicilinas se unan covalentemente al centro activo de las PBPs, formándose un complejo peniciloilo altamente estable e inactivo frente al peptidoglicano (Zhao y col. 1997). Al ser inhibidas las PBPs, se sintetiza una pared celular bacteriana defectuosa y debilitada que hace que se desrreprima un sistema autolítico que implica que las lisinas endógenas de la propia bacteria degraden esta pared celular defectuosa, lo que termina provocando la muerte de las bacterias por lisis osmótica. Las penicilinas, por su modo de acción sólo son efectivas durante la fase de crecimiento de las bacterias, que es el momento en el tiene lugar la síntesis de la pared celular, mientras que resultan inútiles durante la fase estacionaria de desarrollo (López-Brea y Alarcón-Cavero 2001; Suárez y Guidol 2009).

Penicillium, el productor de penicilinas

2.1. Características de Penicillium chrysogenum.

El microorganismo a partir del que los grupos de investigación británicos y americanos obtuvieron la penicilina por primera vez es un hongo microscópico y filamentoso del género *Penicillium*. Aún hoy en día hongos pertenecientes a este género son empleados por la industria farmacéutica para la producción del principio activo con el que después se elaboran diferentes preparados comerciales que se emplean en la curación y prevención de diversas enfermedades infecciosas provocadas por bacterias, tanto en humanos como en animales.

2.1.1. Características generales de los hongos.

2

En 1969, Robert Harding Whittaker propuso la existencia de cinco grandes Reinos para clasificar todas las formas de vida del planeta (Figura 5). Estos cinco Reinos fueron nombrados como: Monera, Protista, Plantae, Animalia y Fungi, este último reconocido como un grupo independiente por vez primera (Whittaker, 1969). La clasificación de Whitakker sigue vigente hoy en día y constituye la base para muchos de los nuevos sistemas de clasificación que se plantean (Guarro y col. 1999).

El Reino Fungi lo integran un grupo heterogéneo de organismos que incluye levaduras (hongos microscópicos unicelulares), mohos (hongos microscópicos filamentosos, generalmente pluricelulares) y hongos formadores de setas (hongos filamentosos con esporocarpo o cuerpo fructífero macroscópico). No están incluidos en el Reino Fungi los hongos ameboides ni los hongos con esporas asexuales flageladas, que pertenecen al Reino Protista.

Los hongos son organismos eucariotas y comparten características con animales y plantas, a la vez que presentan características exclusivas que los definen como un grupo taxonómico separado de los anteriores. Como eucariotas poseen células delimitadas por una membrana plasmática y contienen un núcleo membranoso que mantiene el material genético separado del citoplasma. Poseen orgánulos intracelulares variados como mitocondrias, vacuolas y ribosomas 80S.

Al igual que los animales, los hongos emplean como sustancia de reserva el glucógeno (entre otras) y carecen de clorofila, no pudiendo llevar a cabo la fotosíntesis, lo que determina su condición de organismos heterótrofos que han de obtener la materia y la energía de compuestos orgánicos (quimioheterótrofos). Para nutrirse, los hongos secretan al exterior enzimas hidrolíticas que escinden los componentes orgánicos complejos sobre los que vegetan en moléculas más simples, susceptibles de ser luego absorbidas, en una modalidad de alimentación denominada osmotrofia. Las sustancias absorbidas

por el hongo son empleadas por este para la obtención de energía celular o en la construcción de nueva materia viva propia (Hawksworth, 1991).

A semejanza de las plantas los hongos poseen pared celular, aunque mientras que en las plantas el componente principal de esta es la celulosa (polímero de β -glucosa) el componente principal de la pared celular fúngica es la quitina (N-acetil-D-glucosa-2-amina), que también forma parte, por ejemplo, del exoesqueleto de los artrópodos (Hawksworth, 1991).



Figura 5. El Sistema de los cinco Reinos Naturales propuesto por Whitaker en 1969 se basa en la existencia de tres niveles de organización: procariotas (Reino Monera), eucariotas unicelulares (Reino Protista) y eucariotas multicelulares o multinucleados (Reinos Plantae, Fungi y Animalia). Una de las principales diferencias que existe entre los Reinos Plantae, Fungi y Animalia es la forma de nutrición que practican los organismos integrantes de cada uno, que son fotosíntesis, absorción e ingestión, respectivamente. Como se observa en la imagen, la divergencia evolutiva entre hongos y animales, que se estima que ocurrió hace 960 millones de años (Doolittle y col. 1996), es más reciente que la divergencia de ambos reinos con el de las plantas [Ilustración basada en (Whittaker, 1969)].

Una característica que separa a los hongos tanto de plantas como de animales es su versatilidad reproductiva. Muchos hongos pueden reproducirse tanto asexualmente como sexualmente, existiendo en este caso varios núcleos con distintas polaridades sexuales. Tanto la reproducción sexual como la asexual pueden implicar la formación de esporas, que contendrían toda la información genética necesaria para el desarrollo de un nuevo individuo. Las esporas sexuales, que se producen tras un proceso meiótico, son esporas muy resistentes que permiten la supervivencia del hongo en situaciones difíciles (falta de nutrientes, condiciones ambientales adversas), mientras que las esporas producidas asexualmente, también con cierta resistencia, cumplen con el objetivo de propagar al hongo extensa y rápidamente.
El heterogéneo Reino Fungi, actualmente se considera subclasificado en cinco Filos o Divisiones: *Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota* y *Basidiomycota,*. De entre ellos el filo Ascomycota es el más extenso, albergando unas 64000 especies entre las que se encuentran las pertenecientes al género *Penicillium*, integrado por unas 250 especies diferentes.

Se estima que existan 1.5 millones de especies fúngicas distintas (Hawksworth y Rossman 1997; Hawksworth, 2001) aunque la secuenciación de muestras medioambientales incrementa el número potencial de especies diferentes a 3.5 millones (O'Brien y col. 2005). Sin embargo, el número de nuevas especies aumenta año a año y los investigadores creen que más del 90 % de las especies fúngicas aún no han sido descubiertas o identificadas (Hawksworth, 2001; Hibbett y col. 2009).

2.1.2. Hábitats y relevancia de P. chrysogenum en los ecosistemas y para el ser humano

Los hongos en general desempeñan un papel ecológico muy importante, ya que en los ecosistemas naturales actúan como descomponedores primarios que permiten la continuidad de los ciclos biogeoquímicos. Al digerir la materia orgánica muerta (vegetal o animal) ayudan a los animales detritívoros a obtener sus nutrientes, incorporando el carbono y el nitrógeno a la cadena trófica.

Muchos hongos también tienen importancia económica, sobre todo por el abanico de moléculas que secretan (susceptibles de ser extraídas y purificadas) y que tienen utilidad para el ser humano, como proteínas hidrolíticas (pectinasas, lipasas, amilasa, celulasas y proteasas que pueden ser aplicadas en valorizaciones industriales o para degradar compuestos recalcitrantes), sustancias con actividad farmacológica (antibióticos como los betalactámicos, antitumorales como la griseofulvina o anticolesterolémicos como la lovastatina) e incluso micotoxinas (sustancias bioactivas tóxicas para humanos u otros animales).

Las especies del género *Penicillium* son abundantes y frecuentes en la naturaleza. Se pueden desarrollar con apariencia de moho en la superficie de materia orgánica húmeda, en el humus del suelo vegetal y en los estiércoles orgánicos. También pueden aparecer en la vegetación muerta de praderas y tierras de cultivo de zonas con clima templado, en viñas, en bodegas y en semillas almacenadas. Algunas especies del género *Penicillium* también se pueden encontrar en las casas, colonizando la superficie del pan y frutos dañados así como en el polvo.

P. chrysogenum, el hongo productor de penicilina por excelencia, es un hongo ambiental común y de gran importancia económica para el ser humano. A parte de producir penicilina y secretar diversas enzimas, también se emplea, junto con otras especies de hongos y levaduras, en la maduración de productos cárnicos y quesos. La microflora que coloniza la superficie de estos alimentos tiene como funciones principales proteger el alimento del exterior e impedir la colonización por parte de otras poblaciones de microorganismos no deseables. Además, también desarrollan las características organolépticas del producto, gracias a que durante su desarrollo secretan diferentes productos de su metabolismo que transforman la materia orgánica sobre la que vegetan, aportando al producto sabores y aromas característicos (Jami y col. 2010b).

P. chrysogenum también tiene cierta relevancia clínica en la medicina humana. Aunque raramente es un agente patogénico, en ocasiones excepcionales puede actuar como tal. En personas inmunocomprometidas puede provocar infecciones pulmonares y en caso de traumatismo penetrante

también puede sobrevenir una infección por *P. chrysogenum* de forma secundaria al trauma (Galland y col. 2004; Barcus y col. 2005). En cualquier caso, debido a su baja incidencia, la infecciones por *P. chrysogenum* son difíciles de diagnosticar pero fáciles de erradicar en la mayor parte de los casos con el uso de antimicóticos. Este hongo también puede ser agente causante de alergias e inducir asma. Su potencial alérgico se debe a la actuación como antígenos de las proteínas Pen ch 13 (oricina), Pen ch 18 (cerevisina) y Pen ch 20 (N-acetil-glucosaminidasa), que desencadenan la respuesta histamínica en las células epiteliales pulmonares, provocando la inflamación y el estrechamiento de las vías aéreas (Shen y col. 2003; Lai y col. 2004; Tai y col. 2006).

2.1.3. Características morfológicas de Penicillium.

Los mohos y los hongos formadores de setas son hongos filamentosos. Su cuerpo vegetativo o talo se denomina micelio y está constituido por hifas. Las hifas son filamentos cilíndricos consistentes en una cadena de células alargadas que crecen por sus extremos, alargándose a la vez que producen ramas laterales, las cuales se entrecruzan para dar lugar a un micelio más o menos compacto.

Los hongos del género *Penicillium* son aerobios y sus hifas no penetran más allá de los 4-5 mm de profundidad en el sustrato, es decir, que tienen un micelio superficial. El micelio de hongos ascomicetos como *Penicillium*, está formado por hifas tabicadas, divididas internamente en compartimentos multinucleados, por septos de pared celular perforados, lo que permite flujos en masa de citosol y orgánulos a través de la hifa. Gracias a este flujo, las hifas pueden crecer aún en condiciones de escasez de nutrientes. En las hifas maduras, los componentes celulares son reciclados, es decir, son hidrolizados en el interior de las vacuolas. Los productos de la hidrólisis pueden ser transportados a las regiones terminales de las hifas gracias a que los distintos sectores están comunicados a través de los poros septales. En las regiones terminales de la hifa los productos de la hidrólisis vacuolar se emplean en la obtención de energía y en la síntesis de materiales celulares nuevos que sostienen el crecimiento en estas regiones del micelio (Shoji y col. 2006a; Shoji y col. 2006b).

Los hongos pueden reproducirse asexualmente por simple fragmentación del micelio o generando esporas asexuales, que en el caso de P. chrysogenum son los conidios. Estos, una vez formados, al quedar libres y depositarse sobre un sustrato adecuado absorben agua y sustancias disueltas del medio nutritivo, se hinchan, rompen su pared celular y emiten brotes hifales. Los brotes se alargan extendiéndose radialmente y ramificándose a la vez que se nutren del sustrato hasta formar un micelio de hifas compacto. Tras 4 o 5 días, a partir de hifas indiferenciadas del micelio comienzan a producirse las ramas fértiles, denominadas conidióforos, que se proyectan sobre la superficie del micelio y en cuyo extremo libre se forman los aparatos conidianos. En las especies del género Penicillium estos tienen aspecto de pincel, en latín penicillus, de donde deriva su nombre genérico. En P. chrysogenum los conidióforos son asimétricos (desarrollados preferentemente hacia un lado) y típicamente bi- o terverticilados. Esto significa que sobre el extremo libre del tallo del conidióforo se asientan uno o dos verticilos de células de soporte, denominadas métulas y sobre el extremo libre de estas se asienta un verticilo de células especiales, llamadas fiálides (Figura 6: 6 A y 6 B). Las fiálides están rellenas de un citoplasma rico en reservas y son las encargadas de formar los conidios (por lo que se las denomina también células conidiogénicas). Las fiálides de P. chrysogenum no suelen exceder las 15 µm de longitud y tienen una característica forma de botella, con una base cilíndrica ancha que se va estrechando gradualmente hasta formar un cuello más o menos largo en el extremo distal. Para la formación de los conidios un núcleo de la

fiálide se aproxima al extremo distal de la célula y se rodea de citoplasma fialídico. A continuación, la pared celular de la hifa se fragmenta cuando comienza un proceso de estrangulamiento a nivel de membrana plasmática por detrás del núcleo. Cuando el proceso de estrangulamiento termina el conidio es independiente de la fiálide y puede quedar libre. Puesto que la formación de los conidios sólo implica una porción de la célula condiogénica se la denomina condiogénesis enteroblástica. Para constituir las cadenas conidiales típicas de *P. chrysogenum*, el ápice de la fiálide podría experimentar nuevos procesos de estrangulamiento para la generación de más conidios, de forma que el nuevo conidio se formaría en la base de la cadena (conidiación basípeta), entre la fiálide y el conidio generado inmediatamente antes (Figura 6: 6 C). La cadenas de conidios de *P. chrysogenum* son no ramificadas. Cuando maduran, los conidios son típicamente elípticos (4x3.3 μ m) o subglobosos (4x4.5 μ m), con la superficie lisa o ligeramente rugosa y son los que confieren la tonalidad verde al micelio maduro. Al quedar libres y llegar a un ambiente propicio, los conidios pueden germinar y dar comienzo a un nuevo ciclo de reproducción asexual. Los conidios pierden la capacidad de germinación en un periodo de tiempo relativamente corto tras su formación (unos 2-3 meses).



Figura 6. Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso microscópico. Los conidióforos que constituyen su micelio reproductor son, generalmente, ramificados y bi- o terverticilados con apariencia de pincel. Las fiálides tienen forma de botella y los conidios globosos de superficie lisa o ligeramente rugosa forman cadenas no ramificadas. (A) Esquema de una rama fértil 0 conidióforo biverticilado de Penicillium. (B) Micrografía de la porción terminal distal de un conidióforo de Penicillium donde se aprecia la típica apariencia de pincel. Esquema del proceso de (C) generación de los conidios en el extremo apical de las fiálides mediante un proceso denominado conidiación enteroblástica basípeta.

P. chrysogenum produce colonias de crecimiento moderadamente rápido, con un micelio denso y compacto, de margen regular y bien definido. El desarrollo de las colonias comienza con la formación de un velo de micelio laxo y blanquecino. Este micelio laxo se compacta a medida que se alargan y entrecruzan las hifas. Los conidióforos, ramas fértiles que constituyen el micelio aéreo reproductor, comienzan a desarrollarse en la zona central de la colonia, por ser la zona más antigua, y posteriormente, a medida que el micelio madura, se van extendiendo hacia la periferia, lo que explica la presencia de un borde blanco en las colonias en crecimiento (donde no hay conidióforos y por tanto tampoco conidios coloreados). Las colonias de *P. chrysogenum* tienen un aspecto aterciopelado, debido a que los conidióforos son muy numerosos, aunque se mantienen aislados unos de otros y son perpendiculares al plano del micelio vegetativo (Figura 7). En la superficie de la colonia pueden aparecer gotas de un

exudado amarillo. El micelio sumergido presenta el reverso de color amarillo y es el responsable de la toma de nutrientes por absorción (micelio vegetativo). Cuando la colonia envejece se torna de color pardo oscuro, con sobrecrecimiento de hifas blancas/rosadas (Peberdy, 1987).



Figura 7. Macromorfológicamente *P. chrysogenum* produce un micelio de textura aterciopelada y con una pigmentación verde muy características, todo ello debido a la disposición de los conidióforos (perpendiculares al sustrato e independientes unos de otros, pero no dispersos) y a la pigmentación de las conidiosporas. (A) Aspecto de un cultivo de *P. chrysogenum* tras 5 días de crecimiento a 25^o C sobre medio de esporulación PW2, en el que se observa el característico color verde debido los pigmentos de los conidios. (B) Colonias aisladas de *P. chrysogenum*, presentando un borde bien definido, de tonalidad verde en la región central (más antigua) donde se han desarrollado los conidióforos y un margen blanco debido a la ausencia de los mismos, al ser la región periférica y más joven de la colonia.

2.1.3.1. Morfofisiología del micelio y producción de penicilina en P. chrysogenum.

El micelio pluricelular de un hongo filamentoso es altamente heterogéneo en cuanto a estructura y morfología. La fisiología y diferenciación de las células cambian a lo largo de la hifa y también durante la fermentación para la producción de penicilinas (Zalokar, 1959a; Zalokar, 1959b).

En un intento por modelizar el patrón de desarrollo de un hongo filamentoso, se describió el comportamiento de *P. chrysogenum* en cuanto a crecimiento, diferenciación y producción de penicilina durante una fermentación en cultivo sumergido (Paul y Thomas 1996). Según este modelo, las hifas del hongo se pueden dividir en cuatro regiones diferentes, en función de la actividad y la estructura de las células:

- regiones A0: sobre todo apicales, con crecimiento activo.
- regiones A1: células con mucho citoplasma y sin crecimiento activo.
- regiones A2: células con predominio de vacuolas.
- regiones A3: regiones maduras, degeneradas o metabólicamente inactivas.

El crecimiento de la hifa ocurre en las regiones apicales A0 (Katz y col. 1972). Las regiones apicales nuevas se generan por ramificación de las regiones de tipo A1. La nueva región A0 crece hasta alcanzar una cierta longitud, a costa del consumo de nutrientes, momento en el cual se forma un septo por detrás de la región en crecimiento bloqueándose además el poro septal (Trinci y Collinge 1973; Trinci, 1973a; Trinci, 1973b). Así las células apicales A0 más antiguas se convierten en células A1, las cuales no

presentan un crecimiento activo. Si hay nutrientes, las regiones A0 se mantienen como tales, pero cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada, la diferenciación de regiones A0 a regiones A1 se ve estimulada y comienzan a aparecer vacuolas (regiones A2).

Según el modelo, las regiones A1 (células con citoplasma abundante y sin crecimiento) son las responsables exclusivas de la biosíntesis de penicilina. La capacidad de producción aparecería como consecuencia de la maduración y diferenciación celular, pues las regiones A1 comprenden células de cierta antigüedad que habrían acumulado las enzimas biosintéticas necesarias para la producción del antibiótico y con un nivel de vacuolización bajo.

Cuando se forma una vacuola (en regiones A2), esta es inicialmente esférica y conforme va aumentando de tamaño se hace elíptica, pudiendo llegar a ocupar el interior de la célula por completo en condiciones de escasez de nutrientes (Righelato y col. 1968). De esta forma aparecen regiones A3, de células con grandes vacuolas que no contribuyen a la biosíntesis de penicilina. Así un alto grado de vacuolización puede ser interpretado como una adaptación del hongo para crecer en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, puesto que formar una vacuola es metabólicamente menos costoso que sintetizar un volumen equivalente de citoplasma. Según el modelo, la vacuolización sería inhibida por altas concentraciones de nutrientes (Bartnicki-García, 1973; Paul y col. 1993).

2.1.4. Estadío sexual de P. chrysogenum.

Un aspecto de *P. chrysogenum* descubierto recientemente es que presenta un ciclo de reproducción sexual. De las alrededor de 250 especies de *Penicillium* reconocidas, aproximadamente el 73 % carece de ciclo sexual conocido (Pitt y col. 2000).

A pesar de que *P. chrysogenum* presentaba cierto potencial para la reproducción sexual, al portar parte del repertorio de genes implicados en el ciclo sexual en otras especies fúngicas como genes MAT (genes de apareamiento) y genes para un sistema de señalización mediado por feromonas que actúa durante el apareamiento (Woo y col. 2006; Dyer y O'Gorman 2011), aún era una especie fúngica tenida por asexual. Sin embargo, recientemente Bömh y col. (2013) lograron, en condiciones de laboratorio, un cruzamiento exitoso entre cepas de *P. chrysogenum* con un fenotipo de apareamiento complementario. En este cruzamiento reproductivo se observó la formación de estructuras reproductivas de tipo cleistotecio (características de especies sexuales de *Penicillium* y otros hongos ascomicetos (Dyer y O'Gorman 2011; Pöggeler y col. 2011)) en cuyo interior se desarrollaron ascosporas (esporas sexuales) recombinantes viables, que dieron lugar a una descendencia en la que se mezclaban los caracteres de las dos cepas parentales (Böhm y col. 2013).

2.2 Taxonomía y filogenia de Penicillium chrysogenum.

La importancia económica de *P. chrysogenum*, sobre todo, aunque no exclusivamente, por su capacidad para producir penicilina, ha hecho que la clasificación taxonómica y el estudio de la relación filogenética de esta especie de relevancia para el ser humano con otras especies haya suscitado el interés de muchos investigadores.

2.2.1. Taxonomía y posición filogenética del hongo productor de penicilina.

La taxonomía de la estirpe de *Penicillium* productora de penicilina ha sido controvertida. Se podría afirmar que ha variado casi tantas veces como autores se han dedicado a su estudio a lo largo del tiempo, en función de los diferentes criterios aplicados por cada uno para la caracterización de las especies. Así, la especie de *Penicillium* productora de penicilina ha sido denominada *Penicillium rubrum* [la cepa productora de Fleming (Fleming, 1929)], *Penicillium notatum* [tras ser corregida la identificación de la anterior (Thom, 1945; Raper y Thom 1949)], *Penicillium chrysogenum* (Samson y col. 1977), *Penicillium griseoroseum* (Pitt, 1980) y, actualmente, *Penicillium rubens* (Houbraken y col. 2011).

Existen trabajos muy recientes que se han dedicado a hacer un minucioso análisis de las relaciones filogenéticas de *P. chrysogenum* con otras especies fúngicas (Houbraken y Samson 2011; Houbraken y col. 2012). En estos estudios filogenéticos se evalúan muchas características de diferente naturaleza de las estirpes en estudio (en lo que se conoce como filogénia polifásica): características macro- y micromorfológicas, perfiles de extrolitos específicos producidos y grado de homología de ciertos genes tomados como marcadores filogenéticos válidos. Por tanto, la filogénia polifásica implica tener en cuenta factores morfológicos, empleados ya en las clasificaciones clásicas, pero que a veces no son suficientes para diferenciar entre especies muy próximas evolutivamente. Y además permite aprovechar el gran volumen de información que pueden aportar técnicas más sofisticadas, como la secuenciación de ADN o el análisis cromatográfico de alta precisión (aplicado en este caso a la identificación de sustancias secretadas) para hacer determinaciones más fiables de los aislados fúngicos, incluso a nivel de especie, para obtener clasificaciones taxonómicas más precisas. Cruzando y analizando los diferentes datos recopilados para cada estirpe fúngica estos estudios perfilaron el árbol filogenético vigente actualmente para la especie de *Penicillium* aprovechada industrialmente como fuente de penicilina.

Según esta filogenia, la especie de *Penicillium* en cuestión pertenecería a la familia *Thricomaceae* (Fischer, 1897), una gran familia de hongos, la mayoría de ellos saprófitos y tremendamente diversos en cuanto a su ecología y su metabolismo (producen diferentes ácidos orgánicos, enzimas capaces de hidrolizar distintas biomoléculas complejas, micotoxinas e incluso sustancias de aplicación farmacológica) (Geiser y col. 2007; Pitt y Hocking 2009; Samson y col. 2010). Según el mismo estudio, la familia *Thricomaceae* puede ser dividida en tres subfamilias diferentes:

1) *Aspergillaceae*: dividida a su vez en 7 clados (clados 1-7). Los miembros de *Aspergillaceae* muestran fiálides que tienen forma de botella o cilindro. Las ascas, en caso de formarse, son elipsoidales y ovaladas, con una hendidura ecuatorial y se generan en el interior de cleistotecios más o menos blandos o rodeadas por células de Hülle.

2) *Thermoascaeae*: dividida a su vez en 2 clados (clados 8 y 9). Son características las fiálides lanceoladas o cilíndricas que presentan sus miembros. Las ascas, en caso de estar presentes, carecerían de hendidura y se formarían en el seno de una capa de hifas flojas

3) *Thricocomaceae*: dividida a su vez en 5 clados (clados 10-14). Un carácter esencial de esta familia es la formación de cleistotecios bien definidos, firmes y endurecidos.

El clado 1 de la familia *Aspergillaceae*, denominado *Penicillium sensu stricto*, está dividido a su vez en dos subclados:

Penicillium sensu stricto subclado 1 A: consta de 14 clados o secciones (secciones 1-14) e incluye a las especies tipo (especies de referencia) de los subgéneros *Aspergilloides* y *Furcatum* (*Aspergilloides aurantrobrunneum* y *Penicillium citrinum*, respectivamente)

Penicillium sensu stricto subclado 1 B: se subdivide en 11 clados o secciones (secciones 15-25) y alberga especies del subgénero *Penicillium*,





2.2.2. La sección Chrysogena de Penicillium sensu stricto.

La sección 19 del subclado 1B de *Penicillium sensu stricto*, es la denominada sección *Chrysogena*. Las especies de la sección *Chrysogena* se consideran agrupadas en cuatro clados (Scott y col. 2004; Henk y col. 2011). El límite de estos clados varía de unos estudios a otros pero todos coinciden en la existencia de dos clados principales, uno centrado en *P. chrysogenum* y otro *en P. rubens*.

De acuerdo a Houbraken y col. (2012), la sección *Chrysogena* alberga 18 especies distintas (fenotípica y filogenéticamente), seis de ellas descritas por primera vez por estos autores. En el seno de la sección *Chrysogena, P. chrysogenum* y *P. rubens* formarían un clado junto con otras tres especies hermanas: *Penicillium alli-sativi, Penicillium tardochrysogenum* y *Penicillium vanlukii* (Figura 8). Por constituir un clado, estas cinco especies muestran caracteres fenotípicos similares, como conidióforos ter- o tetraverticilados ramificados y divergentes y fiálides relativamente cortas (< 9 µm). Todas producen penicilina y todas, menos *P. tardochrysogenum*, producen roquefortinas C y D y meleagrina. Pero también exhiben caracteres diferenciadores como la diferente coloración de los conidios, la capacidad de síntesis de diferentes pigmentos y la producción de diferentes perfiles de extrolitos (característicos de cada especie). Por ejemplo, *P. rubens*, produce entre otros los siguientes extrolitos: andrastinas A y B, crisogenina, penicilinas, roquefortinas C y D, meleagrina, sorbicilina, xantocilinas y toxina PR. Por su parte, *P. chrysogenum* produce andrastinas A y B, crisogenina, penicilinas, roquefortinas C y D, meleagrina, penicilinas, roquefortinas C y D, sorbicilina, xantocilinas y toxina PR. Por su parte,

Houbraken y col. (2011) teniendo en cuenta diversos caracteres fenotípicos y genotípicos y chocando con la tradición taxonómica en torno a las especies de *Penicillium* productoras de penicilina, demostraron que tanto el hongo productor de Fleming como la cepa Wisconsin (de la que derivan la mayoría de las cepas empleadas actualmente en la industria para la producción de penicilina) pertenecen al clado de *P. rubens* y no al de *P. chrysogenum*. La clasificación taxonómica completa de ambas especies aparece reflejada en la tabla 2.

Según el minucioso análisis de filogenia llevado a cabo por Houbraken y col. (Houbraken y Samson 2011; Houbraken y col. 2012) dentro de la serie *Chrysogena*, y por tanto en cierta relación con *P. chrysogenum* y *P. rubens*, se encuadran cuatro especies homotálicas formadoras de ascosporas (es decir que presentan un ciclo de reproducción sexual conocido): *P. egyptiacum*, *P. kewense*, *P. sinaicum* y *P. goetzi. P. chrysogenum* y *P. rubens* son especies heterotálicas, es decir, de cruzamiento obligado para la reproducción sexual (Hoff y col. 2008; Henk y col. 2011) pero recientemente se ha demostrado la competencia sexual de cepas de *P. chrysogenum* (Böhm y col. 2013) (*ver:* Introducción - 2.1.4. Estadio sexual de *Penicillium chrysogenum*).

NOTA: a largo del presente documento, en el que se exponen y analizan experimentaciones llevadas a cabo con la cepa Wisconsin 54-1255, a dicha cepa se la continuará denominando P. chrysogenum Wisconsin 54-1255, el nombre vigente al menos hasta la publicación en el año 2011 del trabajo de Houbraken y col. (2011), y conservando la nomenclatura que se ha empleado en las publicaciones directamente asociadas a esta Tesis. Igualmente cuando a lo largo de esta Tesis se hace referencia a publicaciones de otros autores y se indican las cepas de Penicillium mencionadas en dichas publicaciones, estas son citadas tal y como aparecen en los trabajos referenciados.

Categoría taxonómica	Rasgos definitorios de la categoría taxonómica
Dominio Eukaryota	Células complejas, orgánulos membranosos, material genético asilado del citoplasma en un núcleo.
(sin rango taxonómico) Opisthokonta	Crestas mitocondriales lisas y presencia de células móviles flageladas en algunos grupos.
Reino Fungi	Eucariotas, heterótrofos, pared celular quitinosa, unicelulares o pluricelulares, la mayoría con reproducción sexual y asexual.
Filo Ascomycota	Formación de ascosporas (esporas sexuales) en el interior de ascas y de conidios (esporas asexuales) en conidióforos
(sin rango taxonómico) saccharomyceta	
Subfilo Pezizomycotina	
(sin rango taxonómico) leotiomyceta	
Clase Eurotiomycetes	Presencia de ascocarpo
Subclase Eurotiomycetidae	
Orden Eurotiales	Ascas de pared fina reunidas en el ascocarpo, que suele ser esférico y cerrado.
Familia Trichomaceae	La liberación de las ascosporas se produce tras la rotura de las ascas. Los ascocarpos forma agrupaciones fibrosas de textura difusa.
Subfamilia Aspergillaceae	
Género Penicillium	Hongos filamentosos de textura algodonosa. Las colonias jóvenes suelen tener color blanquecino y se tornan verdes, verdeazuladas, grises, amarillentas o rosadas al madurar. Las fiálides suelen tener forma de botella. Sueles estar asociados a suelos, aire y frutos en descomposición. Los conidióforos tienen aspecto de pincel
(sin rango taxonómico)	
Penicillium "sensu stricto"	
Sección	
Chrysogena	
Especie	Producción de penicilina.
Penicillium rubens	

Tabla 2. Linaje completo de las especies hermanas P. chrysogenum y P. rubens.

Los hongos miembros del filo *Ascomycota* se caracterizan por el tipo de estructuras sexuales que presentan. A pesar de que hasta hace poco tiempo se desconocía su ciclo sexual, en base a estudios de morfología y secuenciación de ADN *P. chrysogenum* había sido considerado como un ascomiceto. Sin embargo, al carecer de ciclo sexual conocido, era considerado un hongo imperfecto, y junto a otros hongos en la misma situación era incluido en un grupo sin categoría taxonómica denominado *Deuteromycetes*. El reciente descubrimiento de su estadío sexual excluye a *P. chrysogenum* de este grupo y lo confirma como ascomiceto, sin reservas.

Fuentes: Tree of Life Web Project > Fungi (<u>http://tolweb.org/Fungi/2377</u>), NCBI > Genome > Browse by organism > *Penicillium chrysogenum* (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10820</u>).

2.3. Características genéticas, transcripcionales y proteómicas y su relación con la capacidad de producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

2.3.1. Características físicas del genoma.

En el año 2008 se publicó la secuencia del genoma de la cepa Wisconsin 54-1255 (van den Berg y col. 2008). Según este trabajo el genoma de *P. chrysogenum* tiene un tamaño de 32.1 Mb, un tamaño similar al de los genomas de otros hongos filamentosos y está organizado en cuatro cromosomas. Los cromosomas del I al IV tienen un tamaño de 10.4, 9.6, 7.6 y 6.3 Mb respectivamente y albergan un total de 49 *supercontings* génicos.

El genoma de *P. chrysogenum* presenta alrededor de 13653 marcos de lectura abierta (ORFs). 11472 de estos ORFs rinden alineamientos significativos con proteínas depositadas en las bases de datos, mientras que para los restantes 2198 no se obtiene tal correspondencia. Las secuencias codificantes, con una longitud media de 1515 pb, tan sólo representarían el 56.6 % del genoma. El 83,5 % de los genes presenta secuencias intrónicas, siendo 3 el número medio de intrones por gen. El contenido en G+C fue estimado alrededor del 52.8 %.

El genoma de *P. chrysogenum* presenta un núcleo de genes altamente conservados en todos los hongos. Estos genes estarían involucrados en funciones básicas para el mantenimiento sostenido de la célula, como la producción de energía o el metabolismo proteico. Por el contrario, alrededor de un 4 % del genoma correspondería a genes específicos de *P. chrysogenum* que participarían en procesos de transporte y en la regulación transcripcional y metabólica global en este organismo. El 30 % de las proteínas deducidas de *P. chrysogenum* no cuenta con ortólogos en otras especies de hongos secuenciadas y la mayoría estarían implicadas en el metabolismo secundario y en otras funciones accesorias. El origen de los genes que codifican estas proteínas específicas podría estar en una transferencia horizontal a partir de otros organismos o en la duplicación seguida de una diversificación génica (van den Berg y col. 2008).

2.3.2. El cluster de biosíntesis de penicilina en el genoma.

Los genes de biosíntesis de penicilina están agrupados en un único *cluster* situado en el superconting 21 del cromosoma I de P. chrysogenum. El cluster está presente en copia única en el genoma de la cepa Wisconsin 54-1255 (y en todas las precedentes en los programas de mejora). En las cepas superproductoras el cluster está amplificado en tándem y cada cepa porta varias copias de dicha agrupación génica. La cepa AS-P-68 contiene entre 5 y 6 copias, la cepa E1 entre 12 y 14 (Fierro y col. 1995) y la cepa DS0485 entre 5-6 (van den Berg y col. 2007). En estas cepas superproductoras, las repeticiones están separadas por una secuencia conservada de seis residuos nucleotídicos. Este hexanucleótido conservado pudo constituir un punto de recombinación específica recurrente, que habría permitido la amplificación del cluster durante la evolución forzada de la las cepas durante los programas de mejora (Fierro y col. 1995). A bajo número de copias del *cluster* de biosíntesis, la transcripción de los genes *pcbAB*, *pcbCy penDE* es proporcional al número de copias del *cluster* presentes en el genoma. A alto número de copias génicas los niveles de las enzimas ACVS e IPNS se corresponden bien con los niveles de transcripción de los genes pcbAB y pcbC respectivamente (Kosalková y col. 2007), pero los niveles de IAT sólo se duplican, mientras que el número de copias de penDE puede haberse incrementado hasta ocho veces (Nijland y col. 2010). La saturación prematura de la transcripción del gen penDE (con respecto a los otros dos genes) ocasiona que las cepas con alto número de copias del cluster de biosíntesis experimenten la acumulación de IPN, lo que supone que la conversión de IPN a PenG (o penicilina V, si la cadena lateral hidrófoba añadida deriva del ácido fenoxiacético) mediada por la IAT constituye un paso limitante en la ruta biosintética.

En las cepas superproductoras la región amplificada contiene otros ORFs además de los genes pcbAB, pcbC y penDE (Fierro y col. 1995; van den Berg y col. 2007). Para estas ORFs adicionales, dada su amplificación junto con los genes biosintéticos, se presuponen funciones de biosíntesis, regulación o secreción vinculadas a la biosíntesis de penicilina, a falta de su caracterización funcional. Sin embargo se ha podido comprobar que ninguno de estos genes es esencial para la producción de penicilinas (García-Estrada y col. 2007; van den Berg y col. 2007). Cuando en la cepa npe10 de P. chrysogenum (una cepa a la que se le ha delecionado el *cluster* completo de biosíntesis de penicilina) se expresan exclusivamente los genes estructurales del *cluster* biosintético (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*), la cepa resultante *npe10* AB-C-DE, produce tanto IPN como PenG. Esto significa que estos tres genes son suficientes para la síntesis de penicilinas y que por tanto ningún otro de los genes del *cluster* de biosíntesis es estrictamente necesario para el transporte de precursores o intermediarios de la penicilina o para la localización y el procesamiento adecuado de las enzimas biosintéticas. No obstante, en comparación con la cepa de referencia Wisconsin 54-1255, npe10 AB-C-DE produce menos IPN y menos PenG. Además acumula mayor cantidad de IPN intracelularmente, lo que podría indicar que esta cepa tiene dificultades para secretar IPN, pudiendo causar este hecho una retroalimentación negativa en la ruta biosintética. Por tanto, los genes del cluster de biosíntesis que acompañan a los genes biosintéticos contendrían información para la secreción eficiente de la IPN y de la PenG, por eso su falta en la cepa npe10 AB-C-DE provoca una reducción de la producción (de 2 a 4 veces) de ambos metabolitos en comparación con la cepa Wisconsin 54-1255 (García-Estrada y col. 2007).

Aunque hasta la fecha no se ha determinado que ninguno de los ORFs adicionales del cluster de biosíntesis de penicilina codifique un regulador específico de la ruta, esta sí que está sujeta a la acción de reguladores globales, como LaeA (Kosalková y col. 2009), el complejo Velvet (Hoff y col. 2008) o StuA (Sigl y col. 2011). Fuera del cluster de biosíntesis también se encuentran genes que codifican proteínas importantes para la biosíntesis de penicilinas como el gen *ppt* (García-Estrada y col. 2008b) y el gen *phl* (Lamas-Maceiras y col. 2006) (*ver*: Introducción - 3. La ruta de biosíntesis de PenG).

2.3.3. Características transcripcionales relacionadas con la capacidad productora de penicilina.

La producción de penicilina en las cepas superproductoras no sigue una correlación lineal con el número de copias de los genes biosintéticos, el nivel de transcripción de estos genes o el nivel de las enzimas que estos codifican (Smith y col. 1989; Monti y col. 2000; Nijland y col. 2010; Smidak y col. 2010). Esto indica que deben existir otros factores que juegan un papel importante en la determinación de la eficiencia de la ruta biosintética de penicilina, como la optimización de la biosíntesis de precursores, la estimulación de procesos de transporte o la atenuación de *clusters* para otros metabolitos secundarios.

Para comprobar esta hipótesis, dos cepas de *P. chrysogenum*, una cepa industrial superproductora de penicilina (DS17690, con 5-6 copias del cluster biosintético) y otra de referencia con un perfil de producción medio-bajo (Wisconsin 54-1255; con 1 copia del cluster biosintético) se emplearon en un análisis transcriptómico para detectar patrones diferenciales de expresión génica entre ambas cepas. Los perfiles de expresión se evaluaron además en dos condiciones experimentales: una condición control

(fermentación en ausencia de ácido fenilacético, PAA) y otra propicia de producción de penicilinas (fermentación en presencia de PAA)

Mediante estos análisis transcriptómicos se comprobó que la expresión de los genes *pcbAB*, *pcbC*, *penDE* es de 2 a 4 veces mayor en la cepa de alta producción que en la de referencia. Además en ambas cepas la adición de PAA provocaba un incremento de la tasa de trancripción de los tres genes biosintéticos. El gen *phl* (responsable de la activación de la cadena lateral hidrofóbica) y aquellos implicados en la biosíntesis de los precursores aminoacídicos cisteína, valina y α -aminoadipato también se expresan a mayor nivel en la cepa DS17690. Los niveles de expresión de *phl* también se incrementan en presencia de PAA, tanto en la cepa de referencia como en la cepa superproductora. Esto es razonable, dada la influencia directa de Phl sobre la ruta de biosíntesis de PenG (*ver*: Introducción - 3.2.5. Activación del ácido fenilacético, precursor de la cadena lateral de la PenG).

Los genes que codifican proteínas peroxisomales también presentan un mayor nivel de transcripción en la cepa DS17690. Algunos de estos genes además incrementan su transcripción en condiciones de producción de penicilina, lo que no es extraño ya que el aumento de la fracción de peroxisomas es una característica vinculada con la capacidad incrementada de producción de penicilinas en las cepas superproductoras.

La ruta del homogentisato para el catabolismo del fenilacetato tiene una actividad residual, tanto Wisconsin 54-1255 como DS17690. Esta vía catabólica estaría supuestamente inactiva debido a la pérdida de actividad de una citocromo P450 monooxigenasa, codificada por el gen *pahA*, que lleva a cabo la 2-hidroxilación del PAA y que es la primera enzima de esta vía catabólica. Ambas cepas muestran un consumo de fenilacetato que se atribuye a la vía del homogentisato y no a la biosíntesis de penicilina. La pérdida paulatina de actividad de la enzima codificada por *pahA* se debe a la acumulación de mutaciones puntuales en el gen a lo largo del programa de desarrollo de cepas a causa los ciclos seriados de mutagénesis, como la mutación C1357T (aparecida el en la cepa silvestre NRRL-1951 y conservada en Wisconsin 54-1255 y presumiblemente en todas sus derivadas) (Rodríguez-Saiz y col. 2005) o la mutación L181F (presente en Wisconsin 54-1255 y todas sus derivadas) (Rodríguez-Saiz y col. 2001). En las cepas productoras la paulatina pérdida de actividad de la PAA 2-hidroxilasa hace que disminuya la cantidad de PAA degradado por la vía del homogentisato y por tanto que aumente la cantidad de PAA disponible para la biosíntesis de penicilina, por lo que esta última vía biosintética se ve favorecida (Rodríguez-Saiz y col. 2001; Rodríguez-Saiz y col. 2005).

Entre los genes cuya expresión está reprimida en las cepas superproductoras están algunos que codifican determinantes morfogenéticos y de desarrollo.

2.3.4. Perfil proteómico de cepas productoras de penicilina.

Con las cepas de *P. chrysogenum* NRRL-1951 (cepa silvestre de baja producción de penicilina), Wisconsin 54-1255 (cepa de referencia de mediana capacidad productiva) y AS-P-78 (de alta producción) se llevó a cabo un estudio comparativo del proteoma intracelular con el fin de determinar algunos de los aspectos moleculares clave que caracterizasen a las cepas superproductoras de penicilina (Jami y col. 2010a). El resultado de este análisis confirmó muchos de los datos aportados previamente por los estudios transcripcionales (van den Berg y col. 2008) y reveló además una importante reorganización de diversas vías metabólicas en las cepas productoras con respecto a las cepas silvestres, lo que consigue una potenciación de la vía de biosíntesis de penicilina. Esto apoya que, aparte de la archiconocida amplificación del *cluster* de biosíntesis de penicilinas, existen otros mecanismos metabólicos que determinan la productividad de penicilina de las diferentes cepas de *P. chrysogenum* (van den Berg y col. 2008; Barreiro y col. 2012).

Así se constató, por ejemplo, una atenuación de las vías para el catabolismo de precursores como la cisteína y la valina a la vez que se da un estimulación de las vías implicadas en la biosíntesis de los mismos precursores en las cepas de alta producción. También se confirmó la sobrerrepresentación de las proteínas (enzimas) biosintéticas de penicilina ACVS, IPNS e IAT en las cepas superproductoras, aunque, el incremento de la dosis de dichas enzimas no guarda una relación proporcional con el número de copias del cluster de biosíntesis (5-6 copias en AS-P-78) (Fierro y col. 1995; van den Berg y col. 2008; Barreiro y col. 2012).

Mediante los mismos análisis proteómicos se observó que la expresión de ciertas proteínas se ha ido reduciendo paulatinamente durante el proceso de evolución de las cepas industriales. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, con algunas enzimas implicadas en la producción de pigmentos. En la cepa silvestre NRRL-1951 existe una gran variedad de estas enzimas que permiten la producción de diversos pigmentos y en cambio en las cepas productoras la capacidad para producir estos pigmentos está disminuida. De hecho, durante los programas de mejora de cepas, en algunos casos se seleccionaban las cepas por su falta de pigmentación porque se conocía la relación inversa existente entre la capacidad de producción de pigmentos y la capacidad de producir penicilina. La misma tendencia se observa para muchas proteínas implicadas en virulencia y en la capacidad de degradación de las envueltas celulares de la planta hospedadora (Jami y col. 2010b). Estas proteínas están infrarrepresentadas en la cepa AS-P-78 en comparación con la cepa silvestre NRRL 1951, lo que significa que las cepas de alta producción de penicilina son menos virulentas que las cepas de baja producción. También ocurre lo mismo con otras enzimas implicadas en la modificación y degradación de penicilinas o con enzimas implicadas en la síntesis o el metabolismo de otros metabolitos secundarios como los terpernos y las porfirinas, respectivamente (Jami y col. 2010b; Barreiro y col. 2012).

También mediante estos estudios de proteómica se observó que en la cepa superproductora AS-P-78, se da una modificación del flujo metabólico a través de la glucolisis y la ruta de las pentosas fosfato, que favorece la biosíntesis de penicilina. En esta cepa se sobreexpresan enzimas de la vía de las pentosas fosfato, como la ribosa-5-fosfato isomerasa o la ribosa-5-P transcetolasa (Jami y col. 2010a). Como resultado de la potenciación de esta vía se obtienen una gran cantidad de moléculas que pueden integrarse a la glucolisis (vía oxidativa para la producción de energía celular como ATP y NADH) y además se genera una gran cantidad de poder reductor en forma de NADPH. La biosíntesis de betalactamas es altamente dependiente de la disponibilidad de NADPH, pues por cada mol de betalactamas que se forma se consumen 8-10 moles de NADPH (Kleijn y col. 2007). La síntesis de cisteína (aminoácido precursor de la síntesis de betalactamas) también requiere de NADPH, lo que explica la relación positiva que existe entre la cantidad de NADPH, la cantidad de cisteína y la producción de betalactamas (Nasution y col. 2008). La producción incrementada de cisteína en las cepas superproductoras también está relacionada con la mayor demanda de glutatión que se da en estas cepas para combatir el estrés oxidativo acentuado al que están sometidas las cepas superproductoras debido a la aireación continuada durante las

fermentaciones (Jami y col. 2010a). La recuperación del poder antioxidante del glutatión se obtiene a través de la reducción del glutatión oxidado mediante NADPH.

3

La ruta de biosíntesis de penicilina G en *P. chrysogenum*

P. chrysogenum es el hongo productor de penicilina por excelencia, también a nivel industrial (Elander, 2003). El descubrimiento de la penicilina y su caracterización como un eficiente antimicrobiano de aplicación terapéutica en la primera mitad del s. XX, incentivó desde entonces el desarrollo de estrategias encaminadas a mejorar paulatinamente el rendimiento productivo, como la creación de cepas mejoradas, la optimización de las fermentaciones o el diseño de nuevos fármacos a partir de las betalactamas obtenidas mediante estas fermentaciones (Demain y Elander 1999). Estas estrategias se apoyaron en el estudio en profundidad de la ruta de biosíntesis de la propia PenG en *P. chrysogenum*, a nivel genético, bioquímico y molecular (van den Berg y col. 2008), lo que ha permitido adquirir un vasto conjunto de conocimientos en relación a esta valiosa ruta biosintética, de la que sin embargo aún restan aspectos que desvelar.

3.1. Los genes de la ruta biosintética: organización y origen evolutivo de los genes biosintéticos.

3.1.1. Organización génica de los genes de biosíntesis de penicilinas en P. chrysogenum

En *P. chrysogenum* son tres los genes implicados en la biosíntesis de PenG: *pcbAB* (Pc21g21390), *pcbC* (Pc21g21380) y *penDE* (Pc21g21370), según su orden secuencial de intervención en la ruta biosintética en cuestión (Barredo y col. 1989a; Barredo y col. 1989b; Díez y col. 1990; van de Kamp y col. 1999a; Evers y col. 2004). Los genes *pcbAB* y *pcbC* son comunes a las rutas de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas (denominados *pcb* por *penicillin and cephalosporin biosynthesis*), mientras que el gen *penDE* (el tercer gen que interviene para la biosíntesis de penicilinas) es específico de la ruta que conduce a la obtención de penicilinas como producto final.

Los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* forman parte de la misma agrupación génica, situada en el cromosoma I de *P. chrysogenum* e incluido en una región acotada de 120Kb (Fierro y col. 1995; Fierro y col. 2006). Los genes *pcbAB* y *pcbC* se transcriben a partir de dos promotores divergentes situados en la región intergénica entre ambos, lo que facilitaría la interacción coordinada de estos promotores con la ARN polimerasa y con diferentes factores transcripcionales, permitiendo una regulación conjunta de ambos genes (Ishida y col. 2006; García-Estrada y col. 2007). El gen *penDE*, situado aguas abajo del gen *pcbC*, se transcribe a partir de otro promotor independiente.

El *cluster* de biosíntesis de penicilinas aparece amplificado en tándem en las cepas industriales de alta producción (Fierro y col. 1995; Fierro y col. 2006; van den Berg y col. 2007; van den Berg y col. 2008)

estando las repeticiones separadas entre sí por la secuencia conservada TGTAAA/T (Fierro y col. 2006). La organización de genes en *clusters* no es un fenómeno común en las células eucariotas, pero en hongos filamentosos es bastante habitual que los genes implicados en una ruta metabólica concreta estén agrupados, especialmente si estos intervienen en rutas no indispensables para el organismo, como lo es la ruta de biosíntesis de penicilina (Smith y col. 1990a; Smith y col. 1990b).

En la región de 120 Kb que incluye a los tres genes biosintéticos, se han identificado hasta 39 ORFs adicionales que, a falta de una caracterización funcional individual y exhaustiva de cada una, se sabe que no codifican proteínas imprescindibles para la biosíntesis, pero sí determinantes para la eficacia de producción de la PenG (Fierro y col. 2006; García-Estrada y col. 2007; van den Berg y col. 2007; van den Berg y col. 2008).

En el genoma de *P. chrysogenum* se han detectado genes ortólogos de los genes *cefD1* y *cefD2*, implicados en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas en *Acremonium chrysogenum*. Estos genes de *P. chrysogenum* no serían funcionales, ya que a menos que los propios *cefD1* y *cefD2* de *A. chrysogenum* le sean introducidos, *P. chrysogenum* no produce penicilina N (Ullán y col. 2007). Se considera que los genes ortólogos portados por *P. chrysogenum* podrían ser vestigios de una potencialidad ancestral de *P. chrysogenum* para sintetizar cefalosporinas (van den Berg y col. 2008; Kiel y col. 2009), aunque también podrían estar implicados en la epimerización y degradación de ácidos grasos ramificados (Martín y col. 2010; Martín y col. 2012).

3.1.2. Origen evolutivo de los genes de biosíntesis de penicilina.

A parte de *P. chrysogenum* existen otros microorganismos, tanto procariotas como eucariotas, capaces de sintetizar betalactamas. Entre los procariotas se encuentran *Streptomyces clavuligerus* (que produce clavamas y carbapenamas) (Romero y col. 1997), *Amycolatopsis lactamdurans, Flavobacterium sp., Xantomonas lactamgena* y *Lysobacter lactamgenus* que producen cefabacinas (Sohn y col. 2001). Entre los organismos eucariotas están los hongos *Aspergillus nidulans* (productor de penicilinas) y *A. chrysogenum* (que produce cefalosporinas).

Los genes *pcbAB* y *pcbC*, comunes a las rutas biosintéticas de todas las betalactamas, presentan un alto grado de homología en diferentes organismos productores. Esto hace pensar que los genes de todos ellos tendrían un origen común, muy probablemente procariótico. Los hongos filamentosos (organismos eucariotas) habrían adquirido estos genes mediante un proceso de transferencia génica horizontal desde la línea procariota (evolutivamente más antigua) y los habrían conservado debido a la ventaja ecológica que otorgarían estos genes a sus portadores (Landan y col. 1990; Peñalva y col. 1990; Evers y col. 2004; Liras y Martín 2006).

A parte del alto grado de homología, diferentes evidencias apoyan el origen procariótico de los genes *pcbAB* y *pcbC* de *P. chrysogenum*. Estos genes están físicamente ligados y carecen de intrones, lo que es un rasgo característico de genes de procariotas y especialmente llamativo en el caso del gen *pcbAB*, por su gran tamaño. El contenido promedio en G+C de *pcbAB* y *pcbC* es superior al contenido promedio del resto del genoma, lo que se atribuye al origen procariótico de estos genes. El uso de codones para *pcbAB* y *pcbC*, aunque se considera que ha podido adaptarse parcialmente al uso de codones en *P. chrysogenum*, difiere ligeramente del uso general de codones registrado para el resto de los genes de *P. chrysogenum*, lo que se

debería también a la procedencia procariótica de ambos genes (Aharonowitz y col. 1992; Martín y Gutiérrez 1995; Gutiérrez y col. 1999; Evers y col. 2004; van den Berg y col. 2008). Asimismo, el rango de microorganismos con capacidad para producir antibióticos betalactámicos es restringido y las bacterias son las que elaboran moléculas betalactámicas más complejas, lo que posiciona a los hongos como receptores de la ruta biosintética, habiendo adquirido tan sólo una fracción de la misma (Aharonowitz y col. 1992).

En el caso del gen *penDE* este tendría un origen eucariótico y habría sido reclutado para el *cluster* de biosíntesis de penicilinas para lograr una producción eficiente del antibiótico (García-Estrada y col. 2010).

3.2. Etapas de la ruta de biosíntesis de PenG.

La biosíntesis de todos los compuestos betalactámicos ocurre mediante una serie de reacciones secuenciales. La primera de estas reacciones consiste en el ensamblaje del tripéptido (L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV) por una péptido sintasa no ribosomal multifuncional (Díez y col. 1990; Byford y col. 1997; van der Lende y col. 2002b) que a continuación es empleado como sustrato por una ciclasa oxidativa dependiente de Fe²⁺ para formar isopenicilina N (IPN) (Ramos y col. 1985; Barredo y col. 1989a; Barredo y col. 1989b; Álvarez y col. 1993; Roach y col. 1995; Schofield y col. 1997), la primera molécula con el núcleo *penam* (la primera betalactama) (Figura 9).

En algunos hongos, como *P. chrysogenum*, sobre la molécula de IPN actúan acil-transferasas para generar acil-penicilinas como la bencilpenicilina (PenG) (Álvarez y col. 1987; Barredo y col. 1989c) (Figura 9). En otros hongos y bacterias productores de betalactamas, la ruta se extiende más allá, existiendo enzimas que epimerizan la cadena lateral de la IPN para formar penicilina N (PenN). La PenN sufre una reorganización oxidativa que genera el núcleo *cefem* produciendo desacetoxi-cefalosporina C (DAOC) por acción de una oxigenasa dependiente de oxoglutarato, la DAOC-sintasa. La DAOC es hidroxilada en una reacción catalizada por una DAOC-hidroxilasa para dar desacetilcefalosporina C (DAC), siendo esta el intermediario común para la producción de diferentes tipos de betalactamas, como las cefalosporinas (en *A. chrysogenum*), las cefamicinas y las cefabacinas (en algunas bacterias) (Sohn y col. 2001; Demirev y col. 2006; Hamed y col. 2013).

Además de las reacciones vertebrales de la ruta de biosíntesis, para la producción de betalactamas es necesaria la participación de otras enzimas que también intervienen en el metabolismo primario, tales como 4'-fosfopantentenil transferasas (PPTasa), coenzima A ligasas (CoA-ligasas), tiorredoxina disulfuro reductasas (TrxA) y catalasas.



Figura 9. Representación de las rutas de biosíntesis de betalactamas en hongos. Las rutas de biosíntesis que conducen a la producción de diferentes betalactamas comparten las dos reacciones iniciales y luego se diversifican en función del antibiótico generado como producto final de la vía. En la imagen la reacción específica de la biosíntesis de penicilina G en *P. chrysogenum* y *A. nidulans* aparece sombreada en verde, mientras que las reacciones específicas de la biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum* aparecen sombreadas en naranja. Las dos reacciones comunes iniciales tienen lugar en el citosol y son catalizadas por la ACVS y la IPNS que producen ACV e IPN, respectivamente. En *P. chrysogenum* y *A. nidulans*, la ruta de biosíntesis continúa en el interior del peroxisoma con la transformación de IPN en PenG, mediante la formación de la molécula intermediaria 6-APA, mediada por la IAT. En *A. chrysogenum*, la ruta para la biosíntesis de cefalosporina C continúa con la epimerización de IPN a PenN catalizada por la IPN-CoA sintasa/epimerasa en el lumen peroxisomal. La ruta culmina con la intervención de tres enzimas de localización citosólica DAOC sintasa, DAC sintasa y DAC acetiltransferasa. (Abreviaturas: 6-APA: ácido 6 amino penicilánico; CoA: coenzima A; DAOC: desacetoxicefalosporina C; DAC: desacetilcefalosporina C; IPN: isopenicilina N).

3.2.1. Biosíntesis de cisteína, valina y L-α-aminoadipato.

La ruta de biosíntesis de los antibióticos betalactámicos se inicia con la condensación de tres precursores aminoacídicos, L- α -aminoadipato, L-cisteína y L-valina, para formar el tripéptido lineal _{LLD}-ACV, mediante una reacción catalizada por la ACV sintetasa (ACVS) (Martín, 2000; Evers y col. 2004). En *P. chrysogenum*, los aminoácidos L- α -aminoadipato, L-cisteína y L-valina pueden ser importados desde el medio de cultivo. Además, una parte importante de la cisteína y la valina, serían suministradas desde la vacuola al citosol, donde reside ACVS, procediendo estos aminoácidos de la actividad proteolítica vacuolar (Lendenfeld y col. 1993). *P. chrysogenum* también tiene la capacidad de llevar a cabo la síntesis *de novo* de estos tres aminoácidos.

La biosíntesis de cisteína en *P. chrysogenum* depende de la toma activa de sulfato $(SO_4)^{2-}$ a través del transportador SutB, que lleva a cabo un simporte H⁺/sulfato (van de Kamp y col. 1999b; van de Kamp y col. 2000). El sulfato es reducido a sulfito $(SO_3)^{2-}$ y sulfuro $(S)^{2-}$ para ser incorporado a la cisteína. Durante la biosíntesis de cisteína a partir de L-metionina, por transulfuración reversa, se forma S-adenosilmetionina y a continuación L-homoscisteína. La combinación de la L-homoscisteína con serina mediante una cistationina β -sintasa produce L-cistationina y esta a su vez es transformada en cisteína por acción de una cistationina γ -liasa. La cisteína también puede producirse a partir de serina, que es convertida en O-acetilserina tiol-liasa (Nuesch y col. 1987).

La biosíntesis de valina comienza con la condensación de piruvato e hidroximetiltiamina pirofosfato, lo que resulta en la formación de α -cetoglutarato. Este es convertido en dihidroxiisovalerato seguido por su transformación en α -cetoisovalerato y a continuación en L-valina. Todos estos pasos enzimáticos se piensa que tienen lugar en la mitocondria, por lo que la valina debería ser transportada al citosol para hacerse disponible para la biosíntesis de betalactamas (Kubicek-Pranz y Kubicek 1991).

El ácido L- α -aminoadípico es crucial para la biosíntesis de penicilina, de tal forma que un mutante bloqueado en la síntesis del mencionado aminoácido tan sólo produce penicilina cuando este es añadido al medio de cultivo (Coque y col. 1996). El L- α -aminoadipato, es un aminoácido no proteinogénico y dado su carácter ácido, no es probable que se acumule en la vacuola (Kitamoto y col. 1988). En los hongos filamentosos productores de betalactamas la síntesis de ácido L-α-aminoadípico y la síntesis de lisina están profundamente relacionadas, al ser el L- α -aminoadipato un intermediario en la biosíntesis de lisina (Zabriskie y Jackson 2000; Martín-Valmaseda y col. 2005). La síntesis de lisina en estos hongos comienza con la condensación citosólica de α -cetoglutarato y acetil-CoA en homocitrato por acción de una homocitrato sintasa (Bañuelos y col. 2002). En los siguientes pasos el homocitrato es convertido en homoisocitrato, α-cetoadipato y L-α-aminoadipato (Bañuelos y col. 1999). Las etapas finales de la biosíntesis de lisina consisten en la conversión de este L- α -aminoadipato en L- α -aminoadipato semialdehído, sacaropina y finalmente lisina. Los hongos filamentosos productores de betalactamas pueden obtener ácido L- α -aminoadípico catabolizando la lisina por acción de una ω -aminotransferasa codificada por el gen *oat*1(Naranjo y col. 2005) o mediante una ruta inversa a la de biosíntesis de lisina, en la que intervienen las dos últimas enzimas de dicha ruta, la sacaropina reductasa y la sacaropina deshidrogenasa (Esmahan y col. 1994).

La interrelación metabólica entre la lisina y el ácido L- α -aminoadípico explican por qué un exceso de lisina inhibe la producción de betalactamas al darse una inhibición por producto final de la propia vía de biosíntesis de lisina a nivel de la homocitrato sintasa (Demain y Masurekar 1974; Luengo y col. 1980). La disminución del flujo metabólico a través de esta vía limita la disponibilidad de L- α -aminoadipato para la biosíntesis de betalactamas (Demain, 1957). Por el contrario, la adición de ácido L- α -aminoadípico al medio de cultivo mejora, por sí sola, la productividad de betalactamas, lo que por otra parte indica que la disponibilidad de este precursor puede ser limitante en la biosíntesis de estos compuestos antibióticos (López-Nieto y col. 1985).

Las bacterias productoras de cefamicinas (como *A. lactamdurans, S. clavuligerus*) sintetizan lisina por la vía del ácido diaminopimélico, que es independiente del ácido L- α -aminoadípico (Coque y col. 1991; Madduri y col. 1991). Estos microorganismos presentan un sistema específico para sintetizar L- α -aminoadipato a partir de lisina mediante dos etapas enzimáticas catalizadas por una L-lisina-aminotransferasa [LAT, codificada por el gen *lat* (Kern y col. 1980)] y una piperidin-6-carboxilato deshidrogenasa [P6CD codificada por el gen *pcd* (Pérez-Llarena y col. 1998)]. A diferencia de lo que ocurre en los hongos productores, en las bacterias productoras la suplementación con lisina del medio de fermentación incrementa la producción de betalactamas (Leitao y col. 2001).

3.2.2. Biosíntesis de δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina.

La enzima multifuncional δ (L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa (ACVS) condensa los tres precursores aminoacídicos α -aminoadipato, L-cisteína y L-valina, para formar el tripéptido lineal _{LLD}-ACV, en una reacción que es dependiente de ATP y Mg²+ (Martín y col. 2000; Evers y col. 2004; Trip, 2005).

En *P. chrysogenum* la ACVS es codificada por el gen *pcbAB* que tiene 11373 pb y carece de intrones (Díez y col. 1990; Smith y col. 1990a; MacCabe y col. 1991; Zhang y col. 1992; Martín y col. 2000). El gen *pcbAB* aparece en los clusters de biosíntesis de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas de los hongos y bacterias productoras, mostrando los genes ortólogos un elevado grado de homología en todos los organismos (Kleinkauf y von Dohren 1990; Kleinkauf y Von Döhren 1996; Martín, 2000).

La ACVS de *P. chrysogenum*, es una enzima monomérica multifuncional de tipo NRPS (sintetasa de péptidos no ribosomales) de 424 KDa. Esta enzima consta de tres módulos diferentes (uno por cada aminoácido incorporado al tripéptido). Cada módulo alberga diferentes dominios catalíticos concatenados, especializados en llevar a cabo las reacciones parciales que conducen a la formación del tripéptido final _{LLD}-ACV (Figura 10) (Kleinkauf y Von Döhren 1996; Marahiel y col. 1997; Martín, 2000; Siewers y col. 2009). Estos dominios especializados son los siguientes:

- Dominio A, de adenilación: lleva a cabo la activación dependiente de ATP de los L-aminoácidos a sus formas tioéster aminoacil-CoA. Los dominios de adenilación de cada módulo de la ACVS tienen una elevada especificidad de sustrato, para admitir exclusivamente α-aminoadipato, L-cisteína o L-valina, respectivamente (Etchegaray y col. 1997). Estos dominios muestran homología con CoA-ligasas (Conti y col. 1997).
- Dominio P, de tiolación/pantotenilación/transporte de péptido: cuenta con un motivo de fosfopanteteína, organizado en un haz de cuatro hélices antiparalelas, como grupo prostético Este dominio de fosfopanteteína es capaz de actuar a modo de "brazo oscilante" debido a la

presencia de un tramo de aminoácidos flexible (Gidijala y col. 2010). Esto posibilita la transferencia de los aminoácidos activados, unidos covalentemente al motivo de fosfopanteteína mediante un enlace tioéster, desde el dominio A hasta el dominio C.

- Dominio C de condensación: lleva a cabo la formación del enlace peptídico entre aminoácidos sucesivos del tripéptido, procurando la elongación unidireccional del mismo. Los dominios C contienen un motivo de histidinas altamente conservado (de secuencia HHxxxDGWS, donde x equivale a cualquier aminoácido y las letras mayúsculas apuntan a un elevado grado de conservación en el resto de las posiciones), que también está presente en otras acil-transferasas dependientes de CoA. Estudios estructurales sugieren que estos dominios podrían presentar un canal donde entraría el brazo flexible de fosfopanteteína del dominio P, para dejar en proximidad el enlace tiol fosfopanteteína-aminoácido y las histidinas del motivo conservado, facilitando así la formación del enlace peptídico en el péptido en síntesis (Keating y col. 2002).
- Dominio E, de epimerización: materializa el cambio conformacional de la valina, de su forma L a su forma D. La conformación D de la valina proporciona mayor potencia antimicrobiana y mayor estabilidad al péptido formado (al aumentar la resistencia a la hidrólisis por peptidasas).
- Dominio TE, de tioesterificación: determina la finalización de la síntesis y la liberación del tripéptido final. El tripéptido en formación sería transferido a un residuo de serina del dominio TE, generándose un intermediario acil-O-TE inestable. Posteriormente este intermediario sería hidrolizado, produciéndose la liberación del tripéptido LLD-ACV (Kallow y col. 2000).

Los dominios catalíticos de los dos módulos N-terminales de la ACVS están organizados como A/P/C mientras que el módulo C-terminal contiene los dominios A, P y uno C-terminal donde ocurre la epimerización de la valina y la liberación del tripéptido final (Figura 10).



Figura 10. La ACV sintetasa de *P. chrysogenum* es una péptido sintetasa no ribosomal. Consta de tres módulos, uno por cada residuo aminoacídico del producto final, y cada módulo alberga tres dominios funcionales concatenados. La activación inicial de los precursores aminoacídicos tiene lugar en los dominios de adenilación (A). Los aminoácidos activados son unidos al motivo de fosfopanteteína del dominio de tiolación (P) que los transfiere al dominio de condensación (C) donde tiene lugar la formación de los puentes peptídicos entre los aminoácidos consecutivos del tripéptido final. La epimerización de la valina de su conformación L a su conformación D y la liberación del producto peptídico LLD-ACV tiene lugar en el domino tioesterasa carboxiterminal (TE).

En cuanto a su localización, estudios de inmunocitoquímica asociados a microscopía electrónica permitieron determinar que la ACVS es una enzima predominantemente citosólica (van der Lende y col.

2002b), en consonancia con sus características estructurales y funcionales. La ACVS presenta un bajo grado de glicosilación [típico de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico (Zhang y Demain 1992; Theilgaard y col. 1997)], se comporta como soluble (aunque inestable) tras su purificación (Baldwin y col. 1990), es altamente sensible a proteólisis y tiene carácter hidrofóbico, aunque no exhibe segmentos transmembranales o de asociación a membranas (Lendenfeld y col. 1993), ni tampoco señales reconocibles de direccionamiento a vacuolas o retículo endoplásmico (Klionsky y col. 1990; Gomord y Faye 1996; Harter y Wieland 1996; Pelham, 1996). El citosol proporcionaría el microambiente adecuado en cuanto a características de pH (en torno a la neutralidad), estabilidad molecular y disponibilidad de cofactores para una correcta funcionalidad de la ACVS.

Para ser funcional, la ACVS requiere ser activada por la trasferencia de un motivo de fosfopanteteína a sus dominios P. Esta transferencia la lleva a cabo una PPTasa. La PPTasa emplea CoA como sustrato y a costa del consumo de ATP permite la transferencia de la fosfopanteteína a un residuo de serina conservado en los dominios P de la ACVS (Schlumbohm y col. 1991; Stein y col. 1996). En *P. chrysogenum* la deleción del gen *ppt*, codificante de la PPTasa, suprime la producción de PenG, lo que indica que la PPTasa es esencial para la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* (García-Estrada y col. 2008b).

La PPTasa también participa en la ruta de biosíntesis de lisina, activando en el citosol a la α -aminoadipato reductasa (dependiente de fosfopanteteína) que convierte el ácido α -aminoadípico en α -aminoadipato semialdehído (Casqueiro y col. 1999; Guo y Bhattacharjee 2004).

3.2.3. Biosíntesis de isopenicilina N.

La isopenicilina N sintasa (IPNS) es una enzima con actividad oxidasa que lleva a cabo una ciclación oxidativa (desaturación) del tripéptido lineal _{LLD}-ACV para formar una penicilina hidrofílica. Dicha penicilina es la IPN y su cadena lateral hidrofílica la constituye el ácido α -aminoadípico (Kleinkauf y Von Döhren 199; 6Burzlaff y col. 1999).

La IPNS de *P. chrysogenum* tiene un peso molecular de 38 KDa y está codificada por el gen *pcbC* (Ramos y col. 1985; Carr y col. 1986; Ramón y col. 1987; Leskiw y col. 1988; Weigel y col. 1988; Barredo y col. 1989a;), el cual carece de intrones. El análisis de la secuencia de varias isoenzimas IPNS de otros hongos y bacterias productores de betalactamas, apunta a un alto grado de identidad entre las diferentes variantes enzimáticas originarias de distintos organismos. Este hecho apoyaría la hipótesis de la transferencia horizontal de los genes de biosíntesis de betalactamas desde organismos productores procarióticos a los hongos filamentosos (Cohen y col. 1990).

La IPNS es una enzima soluble citosólica, lo que implica que podría utilizar su sustrato (LLD-ACV) directamente, al encontrarse las actividades ACVS e IPNS en el mismo compartimento celular. De hecho, en ocasiones ha sido propuesto que ambas enzimas podrían estar asociadas constituyendo un gran complejo enzimático (metabolón), aunque no existen evidencias experimentales que lo confirmen (Müller y col. 1991). Además, la ausencia de señales de direccionamiento a orgánulos y de dominios transmembrana en la IPNS (Samson y col. 1985; Carr y col. 1986; Barredo y col. 1989a), así como que su pH óptimo de actuación (pH = 7,8) sea similar al citosólico (Martín y Liras 1989), son argumentos a favor de su localización citosólica. Dicha localización ha podido ser confirmada experimentalmente mediante estudios de inmunodetección combinados con microscopía electrónica (van der Lende y col. 2002a).

La reacción catalizada por la IPNS requiere un catión ferroso (Fe²⁺), oxígeno molecular (O₂) y ascorbato. El catión ferroso presente en el centro activo de la enzima es necesario para que esta pueda unir el tripéptido _{LLD}-ACV a través de un grupo tiol libre del sustrato. El oxígeno molecular actúa como cosustrato mientras que el ascorbato actúa como donador de electrones. La IPNS lleva a cabo una reacción enzimática poco usual, catalizando en un único paso la transferencia de cuatro átomos de hidrógeno desde el tripéptido _{LLD}-ACV (su sustrato) al oxígeno molecular. Mediante esta reacción, a la vez que se liberan dos moléculas de agua se constituye la estructura bicíclica característica de las penicilinas, conocida como núcleo *penam* (*ver*: Introducción - 1.4.1. Características estructurales de las penicilinas). La IPNS cataliza la síntesis del núcleo *penam* en dos etapas, formando primeramente el anillo betalactámico y a continuación el anillo tiazolidínico (Kleinkauf y Von Döhren 1996; Roach y col. 1997; Burzlaff y col. 1999).

3.2.4. Biosíntesis de penicilina G.

En *P. chrysogenum* la isopenicilina N aciltransferasa (IAT) cataliza el intercambio del ácido L-α-aminoadípico (cadena lateral hidrofílica de la IPN), por un grupo fenilacetilo apolar, derivado del PAA, para formar la PenG, de carácter hidrofóbico (Barredo y col. 1989c; Tobin y col. 1990; Luengo, 1995;).

En *P. chrysogenum* la IAT es codificada por el gen *penDE*, que posee 3 intrones en su mitad N-terminal (Barredo y col. 1989c; Tobin y col. 1990).

La IAT purificada presenta diversas actividades catalíticas: (i) IPN aciltransferasa, por la que convierte IPN en PenG; (ii) IPN amidohidrolasa, por la que convierte IPN en ácido 6-aminopenicilánico (6-APA); (iii) 6-APA aciltransferasa, mediante la que convierte 6-APA en PenG; (iv) penicilina transacilasa, por la que interconvierte penicilinas hidrofóbicas y también 6-APA y penicilinas y (v) penicilina amidasa, por la que convierte PenG en 6-APA (Ozcengiz y Demain 2013).

En la reacción llevada a cabo por la IAT para la síntesis de PenG como producto final, primero interviene la actividad isopenicilinil-N-amidohidrolasa, por la cual la cadena lateral L- α -aminoadipil de la IPN es eliminada, formándose 6-APA. A continuación el 6-APA es convertido en PenG por la incorporación de la cadena lateral derivada del fenilacetato, mediante la actividad acil-CoA:6-APA aciltransferasa (Álvarez y col. 1993). En esta reacción secuencial de dos pasos para la síntesis de PenG, la actividad amidohidrolasa es mucho más baja que la actividad aciltransferasa. Sólo en ausencia de una cadena lateral hidrófoba activada, utilizable por la IAT, se liberaría 6-APA de forma espontánea, por lo que el 6-APA libre no es considerado como un verdadero intermediario precursor de la PenG (Ozcengiz y Demain 2013).

La IAT es sintetizada como una proenzima inactiva de 40 kDa y para ser funcional ha de experimentar un procesamiento autocatalítico entre los residuos conservados Gly^{102} - Cys^{103} , lo que da lugar a un heterodímero $\alpha\beta$ maduro y activo (Aplin y col. 1993a; Aplin y col. 1993b). El heterodímero ha de ser importado al interior del peroxisoma (McNew y Goodman 1994; Walton y col. 1995; Waterham y Cregg 1996; García-Estrada y col. 2008a), donde reside mayoritariamente la IAT. El estado funcional de esta enzima depende de su autoprocesamiento, pero no ocurre igual con el proceso de importación al interior del peroxisoma. Tal y como describen García-Estrada y col. (2008) una variante artificial no procesable de la IAT, nombrada IATC¹³⁰⁵, es importada eficientemente al lumen peroxisomal, pero la síntesis de bencilpenicilina se ve afectada negativamente, debido a que esta versión mutada de la IAT no puede auto-activarse.

En su forma de heterodímero activo, la IAT presenta una subunidad α N-terminal y una subunidad β C-terminal, de 11 kDa y 29 kDa respectivamente, siendo la subunidad β la depositaria exclusiva de la actividad catalítica (Tobin y col. 1990; Whiteman y col. 1990; Fernández y col. 2003). La subunidad α presenta en su extremo carboxilo una señal PTS1, de secuencia ARL en *P. chrysogenum*, que determina su importación a la matriz peroxisomal. La localización intraperoxisomal de la IAT ha sido comprobada mediante inmunocitoquímica y microscopía electrónica (Müller y col. 1991). Más recientemente, el análisis del proteoma de la fracción peroxisomal pura de *P. chrysogenum* permitió detectar la IAT entre las enzimas presentes en estos orgánulos [así como enzimas con actividad fenilacetil-CoA ligasa, también relevantes para la biosíntesis de PenG] (Kiel y col. 2009).

P. chrysogenum posee al menos una proteína homóloga a la IAT, denominada IAL (del inglés *IAT-like*). Esta enzima contiene el motivo conservado Gly/Cys, esencial para el autoprocesamiento y activación enzimática, pero no posee ninguna señal de direccionamiento a peroxisomas y no se expresa, por lo que es poco probable que intervenga en la biosíntesis de PenG. Por otro lado, *P. chrysogenum* carece de genes ortólogos a los que codifican a AatB, una proteína con actividad IAT a nivel citosólico presente en *A. nidulans* (García-Estrada y col. 2009).

3.2.5. Activación del ácido fenilacético, precursor de la cadena lateral de la PenG.

Antes de que el precursor fenilacetilo sea empleado en la reacción de sustitución de la cadena lateral catalizada por la IAT sobre la IPN, el residuo fenilacetilo ha de ser activado a su correspondiente tioéster-CoA, formándose fenilacetil-CoA (van de Kamp y col. 1999a).

La reacción de activación es catalizada por miembros de la superfamilia de enzimas formadoras de adenilato con actividad fenilacetil-CoA ligasa y consiste en la incorporación de un nucleótido de adenosina (AMP) al PAA, a expensas del consumo de ATP. La activación continúa con la liberación del residuo AMP recién incorporado, y el posterior establecimiento de un enlace tioéster entre un grupo tiol de una molécula de CoA y un residuo carboxilo del fenilacetato, sintetizándose así la versión activada del ácido fenilacético [PAA-CoA; (Lamas-Maceiras y col. 2006)]. La formación del tioéster de CoA del fenilacetato es un paso esencial en la ruta de biosíntesis de PenG, constituyendo un paso limitante en dicha ruta.

El genoma de *P. chrysogenum* alberga varios genes codificantes de fenilacetil-CoA ligasas (PCLs) (van den Berg y col. 2008) habiendo sido clonados y caracterizados tres de estos genes: *phl* (Lamas-Maceiras y col. 2006), *phlB* (Wang y col. 2007) y *phlC* (Yu y col. 2011) La expresión de estos tres genes es inducida significantemente por la presencia de PAA, pero ninguno forma parte del cluster de biosíntesis de penicilinas. Ciertos ensayos de cinética enzimática han demostrado que Phl (con una K_{cat}/K_m de 0,402 L mmol-1 s-1) es la más eficiente de las tres PCLs a la hora de activar el PAA (frente a valores de 0.043 L mmol-1 s-1 y 0.124 L mmol-1 s-1 para PhlB y PhlC, respectivamente), lo que concuerda con la mayor incidencia de esta ligasa sobre la producción de PenG (Yu y col. 2011).

La proteína Phl tiene 578 aminoácidos de longitud. Su peso molecular es de 62.639 kDa y el gen que la codifica presenta 5 intrones. En *P. chrysogenum* el nivel de expresión de *phl* es proporcional al nivel de actividad fenilacetil-CoA ligasa por lo que Phl, en consonancia con su apetencia por el PAA, se postula como la vía primordial de activación del PAA. Sin embargo, Phl no sería la única vía de activación del fenilacetato, puesto que la delección del gen codificante en *P. chrysogenum* sólo provoca un 40 % de

reducción de la producción de PenG. También se ha encontrado una relación positiva entre el nivel de producción de penicilina y la capacidad de resistencia a concentraciones elevadas de PAA, por lo que se considera que Phl podría actuar también en una vía de degradación del PAA para evitar sus efectos tóxicos (Lamas-Maceiras y col. 2006).

La proteína PhIB, tiene 562 aminoácidos, una masa molecular de 62.628 kDa y presenta un porcentaje de identidad del 35 % con PhI. El gen *phIB* contiene 2 intrones. Experimentalmente se ha comprobado que la actividad de PhIB apenas tiene efecto sobre el rendimiento de la ruta de biosíntesis de PenG (Koetsier y col. 2010). De hecho, se la ha perfilado como una acil-CoA-ligasa de amplio espectro, que utiliza ácidos grasos de cadena media como sus mejores sustratos (Koetsier y col. 2009). También parece estar implicada en la activación del ácido adípico, precursor de la cadena lateral en antibióticos con núcleo *cefem* (Koetsier y col. 2010).

La proteína PhlC tiene 556 aminoácidos y una masa molecular de 61.634 kDa. Presenta una identidad del 37 % con Phl y del 38 % con PhlB. El verdadero impacto de esta CoA-ligasa sobre la ruta de biosíntesis de PenG aún está por determinar (Yu y col. 2011).

Tanto Phl como PhlB y PhlC presentan en su extremo C-terminal una señal de direccionamiento a matriz peroxisomal de tipo PTS1 (Lamas-Maceiras y col. 2006; Wang y col. 2007; Yu y col. 2011). En el caso de Phl y PhlB la localización peroxisomal ha podido ser confirmada experimentalmente (Kiel et al., 2009). Esta localización peroxisomal de las PCLs es ventajosa, ya que así, en el interior del peroxisoma, la concentración de precursores de la cadena lateral activados, requeridos por la IAT (enzima peroxisomal) sería elevada, lo cual es energéticamente favorable para la célula. Además los intermediarios fenilacetilo presentan una mayor facilidad para difundir a través de la membrana peroxisomal que los correspondientes intermediarios activados (formas tioéster CoA). Esto permitiría explicar coherentemente que al peroxisoma entrase el precursor fenilacetilo, donde se acumularía en mayor concentración que en citosol, pero que su correspondiente forma activada quedara retenida en el interior del orgánulo donde podría ser utilizada por la IAT.

Compartimentación de la biosíntesis de penicilina G

4.1. Compartimentación de la ruta de biosíntesis de PenG en P. chrysogenum.

Un rasgo característico y tremendamente importante de la ruta de biosíntesis de las betalactamas en *P. chrysogenum* es que está compartimentada, pues las reacciones que la componen transcurren en diferentes compartimentos celulares. El hecho de que se dé esta compartimentación en el proceso de biosíntesis permite la separación espacial de los precursores y enzimas involucrados en las diferentes etapas, así como una regulación y optimización diferencial de cada reacción en particular (van de Kamp y col. 1999; Martín y col. 2000).

Tal y como se ha indicado en apartados anteriores, la condensación no ribosomal de los tres precursores aminoacídicos para formar el tripéptido lineal LLD-ACV (catalizada por la ACVS) y su posterior ciclación oxidativa para formar IPN (catalizada por la IPNS) son procesos citosólicos, mientras que la activación de la cadena lateral hidrófoba y su incorporación al 6-APA para la formación de penicilinas aromáticas (reacciones en las que intervienen PCL e IAT) son procesos que transcurren en el interior de los peroxisomas de forma natural (Müller y col. 1991; Müller y col. 1992; van der Lende y col. 2002a). Otras enzimas primariamente implicadas en el metabolismo primario, pero indispensables para la biosíntesis de penicilina, como la PPTasa y la TrxA, también residen en el citosol.

A pesar del amplio conocimiento que se tiene sobre la ruta de biosíntesis de betalactamas aún no se ha esclarecido el porqué se da esta compartimentación de las etapas enzimáticas que la integran. Una de las explicaciones de por qué distintas reacciones ocurren en compartimentos diferenciados es que en cada compartimento se dan un conjunto de condiciones concretas, estableciéndose microambientes distintos, óptimos para las distintas reacciones. Otra de las razones que se argumentan es que la compartimentación propicie de alguna forma la canalización del flujo metabólico a través de la ruta de biosíntesis de penicilina.

4.2. El transporte celular en la ruta de biosíntesis de PenG.

La simple existencia de la compartimentación en la ruta de biosíntesis de PenG hace imprescindible la existencia de toda una red de transporte para la movilización, entre los diferentes compartimentos subcelulares implicados, de las enzimas, los precursores, los intermediarios y los cofactores que han de intervenir para que la ruta de biosíntesis pueda ser llevada a término. Por tanto, los procesos de transporte celular son un fenómeno indispensable en la biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*.

A nivel celular, se considera que el transporte es el movimiento de moléculas a través de una biomembrana que separa dos compartimentos diferentes (Krämer, 1996). En el caso de la ruta de biosíntesis de PenG son importantes los procesos de transporte a través de la membrana plasmática y de las membranas de vacuolas y peroxisomas.

4.2.1. Visión general del transporte celular.

Las membranas biológicas son bicapas lipídicas que mantienen separados ambientes químicamente distintos en las células. Son estructuras de permeabilidad selectiva y regulan el paso de diferentes moléculas o compuestos entre diferentes compartimentos celulares (a través de membranas intracelulares) o entre la célula y el medio externo (a través de la membrana plasmática). De hecho, sólo un número limitado de especies químicas de bajo peso molecular y apolares pueden difundir libremente a través de las membranas biológicas. El resto está sometido a un transporte selectivo, mediado por una gran variedad de proteínas específicas con función transportadora presentes en todas la células vivas (Saier, 2000). Las proteínas transportadoras son proteínas transmembranales con regiones hidrofóbicas inmersas en la bicapa lipídica, que franquean el paso de sus sustratos a través de la membrana en la que se encuentran embebidas.

El transporte de moléculas y compuestos en general a través de las membranas biológicas es vital para todas la células, teniendo importantes implicaciones en diferentes funciones como la toma de nutrientes e iones, la excreción de productos finales del metabolismo y sustancias dañinas e incluso en la comunicación intercelular o para la relación de la célula con el medio externo (Saier, 2000).

4.2.1.1. Modalidades de transporte a través de membranas biológicas.

Existen dos modalidades de transporte a través de las membranas biológicas en función del requerimiento energético del proceso:

- 1. **Transporte pasivo**: consiste en el transporte de sustratos a favor de su gradiente de concentración (en sentido del gradiente de concentración decreciente), por lo que no requiere aporte de energía externa. El transporte pasivo presenta dos variantes, que son:
 - Difusión simple: es un transporte espontáneo que no requiere la intervención de proteínas transportadoras, ocurre directamente a través de la membrana. Se trata de un transporte inespecífico y no saturable. El sustrato, generalmente apolar, es transportado a favor de su gradiente de concentración y la velocidad de difusión está influenciada por las características de la sustancia a transportar (tamaño, hidrofobicidad, concentración, etc.).
 - Difusión facilitada: el sustrato es transportado a favor de su gradiente de concentración a través de una proteína que forma un poro o vía hidrófila que permite el paso de moléculas, que aunque son de pequeño tamaño, no pueden atravesar la membrana por sí mismas. La apertura de esta vía hidrófila puede ser constitutiva (continua y desregulada, como en el caso de las proteínas "*canal*") o puede requerir una señal de apertura o cierre (como en el caso de los denominados "*carriers*", que pueden responder a cambios en el potencial de membrana o a la interacción con ligandos). La carga eléctrica del sustrato a transportar influye también en el sentido del transporte. La difusión facilitada es un transporte más

específico que la difusión simple y es saturable, puesto que los puntos de paso a través de la membrana son limitados.

- 2. **Transporte activo**: está mediado por proteínas transportadoras y se da cuando el transporte del sustrato se hace en contra de su gradiente electroquímico. Por ello las proteínas transportadoras han de consumir energía metabólica para poder materializar el transporte. Existen dos tipos de transporte activo (Figura 11: 11 A):
 - **Transporte activo primario**: se consume energía directamente para hacer pasar el sustrato de un lado a otro de la membrana. La energía puede ser química (como la almacenada en enlaces químicos, como los enlaces difosfato del ATP), eléctrica (generada por el flujo de electrones en las reacciones *redox*) o solar (derivada de la absorción de fotones). En este tipo de transporte sólo se moviliza un sustrato, por lo que habla de uniporte.



Figura 11. Las proteínas transportadoras, son proteínas transmembranales hidrofóbicas que posibilitan la translocación a través de las membranas biológicas de moléculas que no pueden atravesarlas por sí mismas mediante difusión. (A) El transporte activo se da cuando se requiere el consumo de energía para el transporte energéticamente desfavorable de un sustrato en contra de su gradiente de concentración. Se denomina transporte activo primario a aquel en el que el aporte de energía se produce directamente (bien por hidrólisis de ATP, absorción de luz o mediante reacciones redox) y transporte activo secundario al proceso en el que la energía procede de la disipación de un gradiente electroquímico establecido previamente. (B) Según el sentido de movilización de los sustratos transportados se distinguen diferentes modalidades de transporte: uniporte (si se transporta un único sustrato), simporte (si se transportan dos sustratos en el mismo sentido) y antiporte (si se transportan dos sustratos en sentido contrario).

Transporte activo secundario: la energía necesaria para el transporte procede del acoplamiento de un gradiente electroquímico preexistente para la movilización de un sustrato. Es decir, se emplea la energía generada por la disipación de gradientes de determinados solutos (generalmente de iones, transportados a favor de su propio gradiente) para impulsar el transporte de determinados sustratos en contra de su propio gradiente. Los transportadores implicados en el transporte activo primario son los responsables de generar, a costa del consumo de energía, los gradientes empleados por los transportadores del transporte activo secundario. Es por eso que el transporte activo secundario también consume energía, aunque de forma indirecta. Puesto que en esta modalidad de transporte se movilizan simultáneamente dos sustratos, a las proteínas que lo llevan a cabo se las denomina co-transportadores y se habla también de co-transporte y co-sustratos.

Según la direccionalidad del transporte (Figura 11: 11 B), dentro del transporte activo secundario se distinguen:

- > Antiporte: los co-sustratos son transportados en sentidos opuestos, siendo uno de ellos transportado a favor de gradiente (proporciona la energía) mientras que el otro es transportado en contra de su gradiente (los gradientes de los co-sustratos transportados son contrapuestos).
- Simporte: los dos sustratos son transportados en el mismo sentido, pero uno de ellos es transportado en contra de su gradiente mientras que el otro es desplazado a favor de su gradiente (los gradientes de los dos sustratos son equivalentes en el caso del simporte).

4.2.1.2. Transportadores de resistencia multidroga.

I. Descripción general de los transportadores MDR.

Algunos transportadores son capaces de movilizar compuestos estructuralmente diferentes y potencialmente tóxicos o dañinos para las células. Estos transportadores, al llevar a cabo la secreción de estos compuestos orgánicos tóxicos, evitan su acumulación intracelular y previenen sus efectos nocivos, por lo que son denominados transportadores de resistencia a múltiples drogas (de la traducción del inglés *Multiple Drug Resistance*, abreviado MDR). Los MDR son transportadores activos primarios o secundarios, en cuyo caso aprovecharían la disipación de un gradiente transmembrana para llevar a cabo el transporte del sustrato tóxico. Los transportadores MDR están presentes en todos los Reinos naturales, lo que sugiere un origen temprano en la escala evolutiva, previo a la divergencia de estos Reinos. Además, en el genoma de la mayoría de los organismos están codificados varios transportadores de este tipo, lo que apunta a una relevancia biológica importante de los MDRs, aunque en muchos casos no se haya podido determinar el rol fisiológico concreto de cada uno de ellos.

Los sustratos transportables por los MDR suelen ser moléculas parcialmente hidrófobas y con carga eléctrica, lo que les permite interaccionar con residuos de aminoácidos cargados y polares del transportador MDR durante el proceso de transporte. La simplicidad del mecanismo de unión sustrato-transportador, que se basa en interacciones atómicas simples, sería una de las razones que explicaría la abundancia y ubiquidad de este tipo de transportadores.

Los transportadores MDR poseen una gran cámara hidrofóbica con residuos aminoacídicos cargados y aromáticos expuestos en la pared de dicha cámara. El ligando, para ser transportado, penetra en el interior de esta cámara empujado por un fenómeno de efecto hidrofóbico: debido al carácter parcialmente hidrófobo del sustrato este prefiere el ambiente hidrófobo reinante en el interior de la cámara del transportador al ambiente acuoso que se extiende a ambos lados de la membrana (medios intracelular o extracelular). Una vez en el interior de la cámara, entre los residuos cargados y polares del sustrato y los residuos cargados y polares de la pared del transportador, se establecen fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas, potenciadas por el ambiente hidrofóbico, que fijan el sustrato a la proteína transportadora. Algunas partes de la pared de la cámara del transportador son flexibles y hacen que esta pueda cambiar de conformación. Gracias a esta adaptabilidad, la cámara puede acomodar moléculas con estructuras muy diferentes o puede acomodar la misma molécula en diferentes orientaciones, de forma que el transportador interactúa cada vez mediante diferentes grupos de residuos cargados con su

sustrato, incrementando así la versatilidad del transportador (Paulsen, 2003). Ya que su gran cámara hidrofóbica flexible les permite transportar una amplia variedad de sustratos, los MDR son considerados transportadores poliespecíficos, pero no inespecíficos, ya que no cualquier sustrato es susceptible de ser transportado por ellos. Esta promiscuidad en cuanto a los sustratos transportables se piensa que también está relacionada con el mecanismo molecular de transporte, que es similar en todos los transportadores de este tipo.

Se cree que la capacidad de los MDR para transportar sustratos tóxicos diversos pudo aparecer independientemente varias veces a lo largo de la evolución de estos transportadores, ya que mutaciones puntuales en los sitios de unión al sustrato son suficientes para modificar la especificidad del transportador. Así el rango de sustratos susceptibles de ser transportado por un determinado MDR ha podido restringirse o ampliarse repetidas veces debido a estas mutaciones. Dichas mutaciones, que habrían afectado al sitio de unión al sustrato, pudieron aparecer en respuesta a ciertas presiones evolutivas y así algunos transportadores preexistentes pudieron adaptarse oportunísticamente a transportar ciertos compuestos tóxicos bajo determinadas condiciones (Paulsen y col. 1996; Saier, 2000; Paulsen y Lewis 2001; Paulsen y col. 2001).

Los transportadores MDR se subclasifican en 5 familias que se diferencias entre sí por distintos rasgos estructurales y funcionales: ABC (*ATP Binding Cassette*), MATE (*Multidrug and Toxic Compounds Efflux*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance Nodulation Division*) y SMR (*Small Multidrug Resistance*) (Pao y col. 1998). Los miembros de la familia ABC llevan a cabo el transporte a costa de hidrolizar ATP, es decir que son transportadores activos primarios. El resto de las familias comprenden transportadores activos secundarios que acoplan el transporte energéticamente desfavorable de su sustrato principal en contra de gradiente, al transporte energéticamente favorable de otro sustrato para el que se disipa su gradiente de concentración (Neyfakh, 2002).

II. La superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily).

La superfamilia MFS constituye una de las familias más numerosa y antigua de transportadores moleculares que se conocen. Está presente desde procariotas hasta eucariotas superiores y muestra funcionalidades diversas en la naturaleza. Se estima que existen más de 10000 MFSs secuenciados y la cifra aumenta a medida que aumenta el número de genomas cuya secuencia se descifra (Pao y col. 1998; Yan, 2013). Se estima que alrededor del 25 % de los transportadores conocidos son de tipo MFS (Saier y col. 1999; Law y col. 2008a).

Los transportadores MFS están constituidos por un sólo polipéptido, de 400 a 600 aminoácidos de longitud. Pueden ejecutar tres tipos de transporte: uniporte, simporte o antiporte, estos dos últimos sostenidos por un gradiente electroquímico transmembrana. A nivel de superfamilia, la homología de secuencia es baja entre los MFSs, pero se considera que existen 74 familias diferentes de MFSs dentro de las cuales el grado de homología si es relevante y cuyos miembros exhiben la misma funcionalidad (Pao y col. 1998; Saier y col. 2006). Muchas de estas familias están relacionadas estructural y evolutivamente (Lolkema y Slotboom 2003; Lolkema y Slotboom 2008). Las familias DHA1 y DHA2, por ejemplo, presentes en hongos y bacterias, están implicados en la resistencia a compuestos tóxicos en estos organismos y llevan a cabo un antiporte droga:H+ (Dias y col. 2010; Hassan y col. 2011; Dias y Sá-Correia 2013).

A pesar de ser proteínas abundantes y funcionalmente relevantes, apenas se han podido desarrollar estudios estructurales o funcionales directos con proteínas MFS. Al igual que todas las proteínas de membrana, dada su hidrofobicidad intrínseca, los MFSs son recalcitrantes en cuanto a su purificación y cristalización que permitirían llevar a cabo este tipo de estudios. Así los datos que se manejan se basan en evidencias indirectas derivadas de estudios bioquímicos y biofísicos con un grupo restringido de MFSs, que permiten el establecimiento de modelos teóricos que se extrapolan al conjunto de transportadores (Yan, 2013).

i. Características estructurales de los MFSs.

A pesar de la baja conservación de secuencia entre los MFSs, mediante la determinación de sus perfiles de hidrofobicidad y el estudio de su topología, se ha comprobado que la gran mayoría de ellos comparten una misma organización estructural. Esta organización consiste en 12 regiones altamente hidrofóbicas, que constituirían segmentos transmembranales (TMS) organizados como hélices alfa en la proteína nativa (Figura 12). Los 12 TMS de los transportadores MFS, se agrupan en dos dominios estructurales de 6 TMS consecutivos y conectados entre sí mediante segmentos hidrofílicos cortos (Paulsen y col. 1996; Pao y col. 1998; Saier y col. 1999). En la proteína nativa, los dominios N-terminal y C-terminal de 6 TMSs están separados por un segmento hidrofílico largo (entre los TMS 6 y 7) de 30 a 100 residuos aminoacídicos, generalmente citoplásmico y sin estructura secundaria (Figura 12: 12 A). La longitud de este lazo permite el movimiento, independiente pero coordinado, de cada bloque de 6 TMS con respecto al otro durante el ciclo de transporte, lo que es imprescindible para el proceso de translocación del sustrato (Law y col. 2008a). Aunque la topología más habitual de los MFSs responde al modelo organizativo 6TMS/6TMS, existen también MFSs con 14 TMSs, en los que los 2 TMSs adicionales se presentan, típicamente, entre los dos módulos de 6 TMS (Figura 12: 12 B). Aún menos frecuentes son los transportadores con 13, 15 o 16 TMSs (Reddy et al., 2012). Ya que todos los MFSs conocidos presentan al menos 12 TMSs, se presume que el bloque de estos 12 segmentos transmembranales hidrofóbicos es imprescindible para la funcionalidad del transportador.

Los dos bloques de 6 TMS de cada transportador muestran cierta homología entre sí, por lo que se considera que los MFS surgieron mediante un evento de duplicación y posterior fusión génica, a partir de un gen ancestral que codificaría una proteína de 6 TMS. Se estima que esta duplicación conducente a los MFS de 12 TMS ocurrió hace 3000 millones de años. La divergencia evolutiva entre eucariotas y procariotas ocurrió hace 2000 millones de años, lo que explicaría por qué este tipo de transportadores está tan ampliamente extendido en la naturaleza. Cada dominio de 6 TMS, a su vez, derivaría, o bien de la duplicación de un elemento precursor con 3 TMS, o de la triplicación de un elemento precursor de 2 TMS. Estas replicaciones estructurales, aparecen con orientaciones antiparalelas entre sí dentro del segmento de 6 TMSs (Boudker y Verdon 2010). La hipótesis de la subunidad precursora de 3 TMS la apoyan estudios funcionales y estructurales, ya que los TMSs equivalentes de cada repetición parecen desempeñar un rol estructural y funcional similar (Hvorup y Saier 2002; Hirai y col. 2003). La hipótesis del elemento precursor de 2 TMS la respaldan, sobre todo, estudios de homología de secuencia y análisis bioinformáticos para la detección de los eventos de duplicación más probables (Reddy y col. 2012; Yan, 2013). Según esta última hipótesis, en los transportadores con 14 TMSs, los 2 TMSs adicionales serían el resultado de una multiplicación adicional del primordio de 2 TMS.

En los transportadores MFS conocidos la mitad N-terminal está más conservada que la mitad C-terminal, aunque esta también exhibe cierto grado de conservación. Esto sugiere que la mitad N-terminal (conservada) estaría implicada en la disipación del gradiente electroquímico y por tanto en el suministro energético al proceso de transporte, mientras que la región C-terminal (más variable) estaría implicada en determinar la especificidad de sustrato de cada transportador en concreto (dado el amplio rango de sustratos transportados). El tipo o conjunto de sustratos que son transportados por un determinado MFS, no puede ser inferido ni de su secuencia específica ni de su filogenia, lo que hace pensar que la especificidad de sustrato ha podido cambiar y readaptarse repetidamente durante la evolución de los MFS. La secuencia tampoco aporta datos sobre el tipo o la direccionalidad del transporte ejecutado por un transportador determinado.



Figura 12 Los transportadores MFS no muestran entre sí una alta homología de secuencia pero sí una organización común consistente en, al menos, 12 segmentos hidrofóbicos transmembranales, con un estructura secundaria en α -hélice en la proteína nativa. Los segmentos hidrofóbicos aparecen conectados por lazos hidrófilos, más o menos largos, sin estructura secundaria. En la imagen se muestra la disposición topológica en la membrana de un MFS con 12 TMS (A) y de otro MFS con 14 TMS (B). En el MFS con 12 TMS se observa el largo segmento hidrofílico entre el TMS 6 y el TMS 7. El mencionado segmento hidrofílico no aparece en el MFS de 14 TMS debido a la duplicación extra de un elemento de 2 TMS. En ambos se marca la posición aproximada de motivos conservados entre los MFS, con presuntas implicaciones funcionales y/o estructurales [A y B tomadas y modificadas de (Putman y col. 2000a)].

A pesar de la baja homología de secuencia entre los miembros de la superfamilia MFS, se han identificado en ellos una serie de motivos característicos, cuya conservación apunta a que juegan un papel importante en estos transportadores (Putman y col. 2000a). Para algunos de estos motivos se desconoce su función exacta, pero para otros se han podido determinar implicaciones funcionales y/o estructurales.

Motivo A (entre el TMS 2 y el TMS 3): controla el tráfico de sustratos. Promueve cambios conformacionales en el transportador que posibilitan la translocación del sustrato a través de la membrana. Su secuencia consenso es GxLaDrxGrkxx(x)l (donde x equivale a cualquier aminoácido y las letras mayúsculas o minúsculas hacen referencia al mayor o menor grado de conservación del

aminoácido en la posición indicada). Entre TMS 8 y TMS 9, puede aparecer otro motivo, considerado como una replicación C-terminal del motivo A, cuya secuencia sería GxxxDRKxCGRRL (Griffith y col. 1992). Estos dos motivos están altamente conservados, sobre todo el motivo A, apareciendo prácticamente en todos los MFS conocidos.

- **Motivo B** (en el TMS 4): implicado en el acoplamiento de la energía al transporte. Su secuencia conservada es lxxxRxxqGxgaa.
- Motivo C (en el TMS 5): sólo aparece en MFSs que llevan a cabo un antiporte droga:H+, por lo que se piensa que podría estar implicado en acoplar la translocación de H+ al antiporte (pero no al simporte). Determinaría la orientación del sitio de unión al sustrato cuando este está desocupado, rigiendo por tanto el sentido del transporte. Su secuencia consenso responde al esquema gxxxGPxxGGxl.
- Motivos D (en TMS 1): existen dos versiones de este dominio D, una características de MFSs con 12 TMSs, denominada D2 y de secuencia lgxxxxxPvxP, y otra característica de MFSs con 14 TMSs denominada D1 cuya secuencia es IDxTvxnvAIP.
- Motivo H (en el TMS 6): su secuencia conservada corresponde a la estructura WxwxFllNvPig.
- Motivo E (en el TMS 7): su secuencia consenso es DxxGxxL.
- **Motivo F** (en el TMS 13): tendría una función similar al motivo C y su secuencia es lgxxxGxavxgxl.
- **Motivo G** (en el TMS 11): considerado un duplicación C-terminal del motivo C, tendría también una función similar a este y su secuencia consenso sería GxxxGPL.

Los motivos A, B y C son motivos comunes a los MFS tanto de 12 TMS como de 14 TMS. Los motivos D2 y G son exclusivos de los MFS de 12 TMS, mientras que son característicos exclusivamente de los MFS con 14 TMS los motivos D1, E, F y H.

ii. Mecanismo de transporte de los MFSs.

El mecanismo molecular de transporte de los MFSs es aún poco entendido. Solamente se tiene una visión preliminar y seguramente bastante incompleta del mismo.

En los transportadores MFSs, los 12 TMS delimitan un vestíbulo o canal central hidrofóbico, a través del que se produce la translocación del sustrato de un lado a otro de la membrana. El sitio de unión del sustrato está alojado en esta cámara hidrofóbica y lo componen residuos aminoacídicos de los segmentos transmembranales expuestos a la luz de dicha cámara. Estos residuos reactivos son los responsables de interactuar directamente con el sustrato, aunque los residuos aminoacídicos situados alrededor del sitio de unión también influyen en la unión transportador-sustrato, creando las condiciones que determinan y regulan la especificidad de esta unión. Los residuos con carga y aromáticos son especialmente importantes en la interacción transportador-sustrato (Hall y col. 1999; Hall y Maloney 2001). Aunque solo son unos pocos residuos del la proteína transportadora los que participan en la interacción directa transportador-sustrato, el proceso de transporte en sí requiere cambios conformacionales que afectan a toda la proteína.

En base a simulaciones de dinámica molecular a partir de investigaciones bioquímicas y biofísicas y a partir del análisis de la conformación de estructuras cristalizadas aisladas obtenidas para diferentes transportadores MFS se ha propuesto un mecanismo modelo de transporte denominado "de accesibilidad alterna con movimiento *rocker-switch*". Según este modelo, durante el ciclo de transporte el transportador

atraviesa una serie de estados conformacionales que le llevan desde tener el sitio de unión del sustrato accesible desde el lado de reclutamiento de la molécula transportada (conformación C_i o *inward open*), hasta tenerlo accesible desde el lado de liberación de la molécula transportada (conformación C_{0} o *outward open*). En la conformación C_i el transportador tiene el sitio de unión al sustrato desocupado y accesible desde el lado de la membrana donde se produce la carga del sustrato. En la conformación C_0 el transportador tiene el sitio de unión vacante y accesible desde el lado de descarga del sustrato, tras haber sido liberada la molécula transportada en el lado correspondiente de la membrana (Figura 13: 13 A). El paso de una conformación a otra, implica una serie de conformaciones intermedias, denominadas ocluidas o cerradas, conocidas como Ci-S ("inward occluded") y Co-S ("outward occluded"). En estas conformaciones cerradas el sustrato está ocupando su sitio de unión en el transportador (Law et al, 2008a). Así, durante un ciclo de transporte se observaría la siguiente secuencia conformacional de la proteína transportadora: $C_i \rightleftharpoons C_i$ -S \rightleftharpoons C_0 -S \rightleftharpoons C_0 . Cuando el transportador queda libre tras la desunión del sustrato (C_0), debe recuperar de nuevo la conformación de partida (C_i) para poder ejecutar otro ciclo de transporte cuando sea preciso (Figura 13: 13 B). Realmente no se dispone de evidencias tangibles de la secuencia de todas las diferentes conformaciones que adquiere un transportador MFS concreto durante un ciclo de transporte. Además, probablemente el proceso real de transporte no se ciña estricta y exclusivamente a la secuencia de conformaciones $C_i \rightleftharpoons C_i$ -S $\rightleftharpoons C_o$ -S $\rightleftharpoons C_o$, así que este mecanismo de transporte por "accesibilidad alterna con movimiento rocker-switch" es sólo un modelo teórico del proceso de translocación que llevan a cabo los MFS (Law y col. 2008a; Law y col. 2008b).

Los cambios conformacionales implican la rotura y creación de nuevos enlaces atómicos entre las regiones TMS del transportador y entre el transportador y el sustrato. Al considerar en conjunto varios ciclos de transporte esta reorganización de enlaces generaría un movimiento similar al de un balanceo (movimiento al que hace referencia el término *rocker-switch*) de las mitades N-terminal y C-terminal del transportador hacia adelante y hacia atrás, con respecto a un eje teórico, perpendicular al plano de la membrana y que atravesaría el vestíbulo hidrofóbico por el que es transportado el sustrato. Este balanceo, centrado en el sitio de unión del sustrato, es inducido por la propia molécula transportada. La energía liberada por la rotura de unos enlaces es invertida en el establecimiento de nuevos enlaces para materializar así los cambios conformacionales sufridos por la proteína MFS (Law y col. 2008a; Law y col. 2008b).

La existencia de una serie de enlaces atómicos intra- e inter-TMS estabiliza la conformación C_i, manteniendo el canal de transporte abierto hacia el lado de carga del sustrato pero cerrado hacia el lado opuesto (el de descarga). Cuando el sustrato accede a su sitio de unión provoca la reestructuración de diversas interacciones atómicas. Por un lado, el transportador fija el sustrato mediante el establecimiento de nuevos enlaces atómicos con él. Pero, por otro lado, se debilitan los puentes estabilizadores de la conformación C_i. Esto hace que los dominios N-terminal y C-terminal del transportador comiencen a rotar, seguramente a través del establecimiento de nuevas interacciones atómicas, lo que provoca el cierre del vestíbulo hidrofóbico por el extremo de carga del sustrato, debido a la aproximación de los extremos de los TMS que lo delimitan. El transportador adquiere así la conformación cerrada C_i-S, en la que el vestíbulo hidrofóbico está cerrado por ambos extremos (tanto por el de carga y como por el de descarga del sustrato). El movimiento de las mitades N-terminal y C-terminal progresa, de tal forma que los extremos de los TMS que delimitan el vestíbulo hidrofóbico en el lado de carga del sustrato se aproximan cada vez más. Al mismo tiempo se produce una separación paulatina de los extremos de los TMS que delimitan el vestíbulo hidrofóbico esta por esta parte. Esta es la conformación cerrada C₀-S, en la cual el sustrato puede desunirse del transportador y quedar libre, habiéndose producido así la translocación del sustrato de un lado al otro de la membrana. El transportador libre, está ahora en su conformación C₀, con el canal de transporte abierto hacia el lado de descarga del sustrato pero cerrado hacia el lado de carga. La desunión del sustrato se debe a una reducción de la afinidad transportador-sustrato, por las condiciones en el lado de descarga de la membrana. En el caso de transportadores que ejecutan un antiporte, este cambio de afinidad también puede ser inducido por el acceso del co-sustrato al transportador, lo que puede provocar cambios en la basicidad/acidez en torno al sitio de unión del sustrato o provocar cambios alostéricos que faciliten su liberación (Figura 13: 13 B) (Hildebrand y col. 2005; Hong y col. 2006; Law y col. 2007; Law y col. 2008a).



Figura 13. El modelo de transporte de acceso alternante con movimiento "rocker switch" supone que en un ciclo de transporte el transportador pasaría por una serie de estados conformacionales. Estos estados marcarían la accesibilidad al sitio de unión al sustrato localizado en la cámara hidrofóbica delimitada por los TMS de transportador. (A) Representación tridimensional de la estructura de dos transportadores en diferentes estados conformacionales. En la conformación C_i (o C_o) el sitio de unión estaría accesible desde el lado de carga del sustrato e inaccesible desde el lado opuesto (al contrario en la conformación Co). Esto es porque los extremos de los TMS que delimitan la entrada al canal hidrofóbico están separados (permitiendo el acceso) por el lado de carga del sustrato y juntos (impidiendo el acceso) los extremos de los TMS que delimitan la entrada al canal por el lado de descarga. Por eso el perfil del MFS en esta conformación toma aspecto de trapecio. En la conformación Ci-S (o C₀-S) el sitio de unión del sustrato está inaccesible desde ambos lados de la membrana porque los extremos de los TMS que delimitan la entrada al canal, tanto de un lado como del otro de la membrana, están próximos. En este caso el perfil del MFS tiene forma de paralelogramo. Las mitades N-terminal y C-terminal están coloreadas en morado y verde, respectivamente. (B) Representación esquemática simplificada de los cambios conformacionales experimentados por un transportador que lleva a cabo un mecanismo de antiporte según el modelo de acceso alternante. En el esquema S1 (representado por un triángulo) es el sustrato transportado a favor de su gradiente electroquímico y S2 (representado por disco coronado por un triángulo) es el sustrato transportado en contra de su gradiente electroquímico, gracias a la energía aportada por la disipación del gradiente de S1. Co (conformación outward open); Ci (conformación inward open) (A y B tomadas y modificadas de (Law y col. 2008a)).

Algunos transportadores, tendrían una disposición espacial alternativa, según la cual solo los TMS 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11 formarían el canal hidrofóbico por el que pasaría el sustrato a través de la membrana. Los otros cuatro TMS, a través de residuos reactivos, colaborarían en el reclutamiento inicial del sustrato, para luego dirigirlos al canal hidrofóbico, donde se encuentra el sitio de unión (Boudker y Verdon 2010).

En los transportadores activos secundarios (que movilizan dos sustratos en cada ciclo de transporte) la incorporación de los co-sustratos a la proteína transportadora ha de estar estrictamente coordinada, de

tal forma que el transportador tan sólo sea competente para la translocación cuando los sitios de unión a los co-sustratos estén debidamente ocupados o desocupados (Law y col. 2008a; Boudker y Verdon 2010). Por ejemplo, en el caso de un antiportador (que carga sus dos sustratos en lados opuestos de la membrana), cuando el sitio de unión está orientado hacia el lado de descarga del primer sustrato este ha de desunirse del transportador y el segundo sustrato ha de unirse antes de que la proteína pueda hacer el movimiento de translocación. En el caso de un simportador, que carga sus dos sustratos en el mismo lado de la membrana, ambos han de estar ocupando sus sitios de unión en la proteína transportadora antes de que esta los pueda transportar al otro lado de la membrana.

4.2.1.3. Transportadores MDR en P. chrysogenum.

En el genoma de *P. chrysogenum* hay codificadas al menos 830 proteínas transportadoras. De esos transportadores 688 serían transportadores activos, la mayoría pertenecientes a las familias de transportadores ABC (51) y MFS (415) (van den Berg y col. 2008). En cepas de *P. chrysogenum* productoras de penicilina el fenilacetato hace que se incremente la transcripción de numerosos agrupaciones de genes involucrados en el metabolismo, el transporte y la detoxificación de sustancias nocivas. Algunos genes de estos *clusters* presentan secuencias homólogas a las de genes que codifican MDRs conocidos. Los genes codificantes de proteínas transportadoras también están sobrerrepresentados entre aquellos que se expresan más en las cepas de alta producción de penicilina (en comparación con las cepas de menor capacidad productiva) con independencia de la exposición a PAA (van den Berg y col. 2008).

4.3. Compartimentos subcelulares importantes en la ruta de biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*.

4.3.1. La membrana plasmática en la ruta de biosíntesis de PenG.

Las células de los hongos filamentosos poseen una pared celular que permite el paso libre de moléculas de hasta 700 kDa. La pared celular envuelve la célula por fuera de la membrana plasmática, que es la que actúa como una auténtica barrera entre los medios externo e interno (Kuhn y col. 1990; Gooday, 1995; van der Rest y col. 1995a). En los hongos filamentosos la membrana plasmática es especialmente rica en esteroles, sobre todo en ergosterol, lo que aumenta el empaquetamiento de la fase fosfolipídica de la membrana, haciendo que se incrementen su rigidez e impermeabilidad (Hillenga y col. 1994; Gooday, 1995; van der Rest y col. 1995b).

Las moléculas que atraviesan la membrana plasmática podrían hacerlo por difusión pasiva, sobre todo en el caso de compuestos hidrofóbicos, o mediante un transporte mediado por proteínas transportadoras, en el caso de compuestos poco hidrofóbicos o de gran tamaño. La hidrólisis de ATP (transporte primario) o el gradiente electroquímico transmembrana de H+ (transporte secundario) proporcionan la energía necesaria para la translocación de las moléculas sustrato del transporte transmembrana. En este último caso el pH citosólico afecta a los procesos de transporte (van der Rest y col. 1995a; Krämer, 1996). En *P. chrysogenum* el pH se mantiene aproximadamente estable entre 7.0-7.2 unidades (Henriksen y col. 1996; Brakhage, 1997; Chu y col. 1997; Brakhage, 1998).
4.3.1.1. Transporte a través de la membrana plasmática.

A través de la membrana plasmática han de importarse compuestos tales como fuentes de carbono, nitrógeno y azufre. En relación directa con la ruta de biosíntesis de penicilinas han de ser importados moléculas reguladoras y precursores directos de la misma, como aminoácidos o precursores de la cadena lateral. A través de la membrana plasmática también han de llegar al medio extracelular tanto el producto final (PenG) como los intermediarios _{LLD}-ACV, IPN y 6-APA, de forma que estos puedan ejercer su actividad antibiótica o simplemente para no llegar a acumularse hasta niveles nocivos en el interior de la célula (Figura 14).

I. Transporte de aminoácidos.

Los aminoácidos son incorporados a la célula desde el medio extracelular a través de permeasas aminoacídicas. La mayoría de las permeasas de hongos filamentosos presentan una elevada homología entre sí y forman parte de una familia denominada AAP (las siglas del inglés *Amino Acid Permease*), que constituye una subfamilia de la familia APC (las siglas del inglés *Amino acid Polyamine Cation*) (André y col. 1993; Jack y col. 2000). Las permeasas de la familia AAP presentan una organización estructural común, que consiste en 12 segmentos hidrofóbicos transmembranales organizados en α -hélices y con los extremos amino y carboxilo hidrofílicos de la proteína orientados hacia el citosol (Sophianopoulou y Diallinas 1995; Gilstring y Ljungdahl 2000). Las permeasas AAP llevan a cabo un transporte secundario, generalmente mediante un simporte o un antiporte con protones, aprovechando la fuerza protón motriz para importar los aminoácidos en contra de su gradiente de concentración (Seaston y col. 1973; André y col. 1993; Jack y col. 2000).

Se han identificado diversos sistemas de transporte de aminoácidos que difieren entre sí por la especificidad y afinidad de sustrato, así como por su patrón de expresión (Horak, 1986): sistema I para metionina (Benko y col. 1969), sistema II para L-cisteína (Skye y Segel 1970), sistema III para todos los aminoácidos, incluso no proteinogénicos (Benko y col. 1969; Hunter y Segel 1971), sistema IV para aminoácidos ácidos (Trip y col. 2004), sistema V para L-prolina, sistema VI para L-lisina y L-arginina, sistema VII para L-arginina, sistema VII para L-Lisina y sistema IX para L-cisteína (Horak, 1986).

En *P. chrysogenum* han sido clonadas y caracterizadas cuatro permeasas para aminoácidos: la permeasa general PcGap1 (Benko y col. 1969; Hunter y Segel 1971), la permeasa para aminoácidos ácidos PcDip5 (Trip y col. 2004), la permeasa para leucina y aminoácidos aromáticos Arl1P (Trip y col. 2002; Trip y col. 2004) y PcMtr. una permeasa para aminoácidos aromáticos y alifáticos neutros (Dillon y Stadler 1994; Stadler, 1966). No obstante estas permeasas no serían las únicas presentes en este hongo para la adquisición de aminoácidos (Bañuelos y col. 2000). PcGap1, PcDip5 y Arl1 pertenecen a la familia AAP, pero PcMtr formaría parte de la familia AAAP (de las siglas en inglés *Amino Acid Auxin Permease*). La familia AAAP de permeasas aminoacídicas, relacionada también con la familia APC, es específica de eucariotas. Sus miembros no presentan un grado de homología elevado pero si comparten una organización topológica similar, con 11 o 10 TMS y llevan a cabo un simporte H+/aminoácido (Young y col. 1999).

II. Transporte de ácido fenilacético.

El PAA es un ácido débil capaz de atravesar la membrana plasmática de *P. chrysogenum* mediante difusión pasiva, distribuyéndose equilibradamente a ambos lados de la misma, de acuerdo al gradiente de pH transmembranal (Hillenga y col. 1995; Eriksen y col. 1998). Durante la biosíntesis de PenG se consume una gran cantidad de PAA, pues este es incorporado como cadena lateral a la PenG. Durante las fermentaciones se hace un aporte importante de fenilacetato al medio de cultivo, para forzar la rápida interiorización de este precursor mediante difusión pasiva cuando la vía de biosíntesis de penicilina esta activada y por tanto la célula registra un alto consumo de PAA (Evers y col. 2004). De esta forma se persigue que la disponibilidad de PAA no sea un factor limitante para la producción de PenG.

Durante un tiempo se pensó que podría existir algún mecanismo especializado para la importación activa de PAA, ya que cuando su concentración extracelular es reducida, extracelularmente se acumula mayor cantidad de fenilacetato en las cepas no productoras (que consumirían menos cantidad de PAA extracelular por la menor activación de la vía biosintética de PenG) que en las cepas productoras (Fernández-Cañón y col. 1989; Eriksen y col. 1998).

La dificultad en determinar la modalidad de transporte a la que se encuentra sujeto el PAA en los organismos productores de PenG radica en que este compuesto está sometido a dos fenómenos de transporte consecutivos: primero ha de atravesar la membrana plasmática y luego la membrana peroxisomal para hacerse accesible a las PCLs que han de activarlo para su incorporación al 6-APA, un paso necesario conducente a la formación de PenG.

III. Transporte de intermediarios de la biosíntesis de PenG.

Durante las fermentaciones para la producción de PenG, *P. chrysogenum* secreta al caldo de cultivo LLD-ACV (López-Nieto y col. 1985), IPN y 6-APA (Demain, 1983), además de la mencionada PenG. La secreción de los intermediarios _{LLD}-ACV, IPN y 6-APA podría ser un fenómeno forzado y deberse a un exceso de flujo metabólico a través de la ruta biosintética de penicilinas en las cepas de alta producción o podría ser un proceso natural (ya que este fenómeno también se da en cepas de baja producción), con un significado ecológico, debido a la bioactividad de algunos de estos compuestos. En cualquier caso, la secreción tanto de _{LLD}-ACV, como de IPN y 6-APA supone una pérdida de intermediarios valiosos para la producción de PenG.

En el trabajo de García-Estrada y col. (2007) se describen una serie de ensayos para la determinación del tipo de transporte que rige *in vivo* la movilización de las moléculas intermediarias _{LLD}-ACV, IPN y 6-APA. Para llevar a cabo estos ensayos, utilizaron cepas de *Penicillium* modificadas genéticamente, partiendo de la cepa *npe10 pyrG*⁻, en la cual la copia del cluster de biosíntesis de PenG ha sido eliminada.

El tripéptido LLD-ACV es sintetizado en el citosol. Aunque no existen evidencias, se ha propuesto que su exportación al exterior de la célula podría ocurrir a través del mismo sistema dependiente de ATP que lleva a cabo la exportación del glutatión (que al igual que LLD-ACV es un tripéptido). En cuanto a su importación a través de la membrana plasmática, tal y como se demostró en el estudio *in vivo* del transporte, una vez en el exterior de la célula, el LLD-ACV no vuelve a ser interiorizado, ni en su forma monomérica reducida, ni en su forma dimérica oxidada (bis-ACV). Al incubar la cepa *P. chrysogenum npe10*-C·DE (que porta una copia de los genes *pcbC* y *penDE*, pero no del gen *pcbAB*, por lo que es incapaz

de sintetizar LLD-ACV) con diferentes concentraciones de LLD-ACV y bis-ACV, no se detectó producción de PenG en ningún caso. Esto significaba que ni LLD-ACV ni bis-ACV habrían accedido al citosol, donde podrían haber sido incorporados a la ruta de biosíntesis de PenG al haber sido utilizados por las enzimas citosólicas IPNS y/o TrxA (que podría reducir el bis-ACV a 2 LLD-ACV) (García-Estrada y col. 2007).

La IPN, también es sintetizada en el citosol. Ha sido demostrado que el transporte de IPN a través de la membrana plasmática es muy pobre, ya que al suplementar el medio de cultivo de la cepa *npe10 pyrG*-(incapaz de sintetizar LLD-ACV endógenamente puesto que carece del cluster de biosíntesis de PenG completo) con diferentes concentraciones de IPN, no se detectó ningún incremento de los niveles de IPN intracelular (García-Estrada y col. 2007). Este experimento puso de manifiesto que el transporte de la IPN hacia el interior de la célula a través de la membrana plasmática muestra dificultades. Puesto que la IPN es parciamente secretada por *P. chrysogenum* y en vista de las dificultades que presenta para atravesar la membrana plasmática, se presume que su secreción debe de estar mediada por algún tipo de proteína transportadora que facilite el paso a través de esta membrana.

A diferencia de lo que ocurre con la IPN, el 6-APA traspasa eficientemente la membrana plasmática. Este hecho se comprobó determinando la evolución de los niveles intracelulares de 6-APA al suministrar diferentes concentraciones extracelulares de este ácido a la cepa *npe10 pyrG*. Se observó que los niveles intracelulares de 6-APA se incrementaban con el tiempo y de forma dependiente de la dosis de 6-APA suministrada (a mayor dosis, mayor acúmulo intracelular). La internalización eficiente del 6-APA apunta a que este está sujeto a un transporte por difusión pasiva a través de la membrana plasmática.

IV. Transporte de PenG.

La PenG es una molécula anfipática, moderadamente hidrofóbica (debido a su cadena lateral poco polar derivada del ácido fenilacético) y cargada negativamente a pH citosólico. Al igual que ocurre con los intermediarios _{LLD}-ACV, IPN y 6-APA, el conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos que regirían la secreción de la PenG es bastante escaso (Martín y col. 2010). Diferentes autores han especulado con que esta secreción podría implicar procesos de difusión pasiva, transporte mediado por proteínas transportadoras e incluso transporte vesicular (Evers y col. 2004).

El transporte vesicular está implicado en muchos procesos en las células, como la síntesis de la pared celular, la secreción de feromonas, la liberación de neurotransmisores o la liberación de ácidos biliares. Mediante la secreción mediada por vesículas la PenG sintetizada en el peroxisoma llegaría al medio extracelular sin haber permanecido libre en el citoplasma, gracias a una vesícula que se escindiría del peroxisoma y se desplazaría hasta la membrana plasmática. Esta vesícula fusionaría su membrana con la membrana plasmática y así se liberaría su contenido al exterior de la célula (Müller y col. 1991; Martín y col. 2012). Todo este sistema requeriría un complejo mecanismo de reclutamiento y retención de la PenG en la región del peroxisoma que va a formar la vesícula, así como toda un serie específica de señales y receptores moleculares que permitieran a la vesícula peroxisomal cargada con el antibiótico llegar a la membrana plasmática. Hasta el día de hoy, nada de esto ha sido descrito todavía en relación con la secreción de la PenG.

El mecanismo de difusión pasiva está condicionado por las características físico-químicas de la membrana a atravesar (fluidez, grado de saturación y tamaño de las cadenas de los ácidos grasos de la membrana) y

por las propiedades intrínsecas del compuesto a transportar (carga, tamaño, hidrofobicidad). El alto grado de empaquetamiento de la membrana plasmática de *P. chrysogenum* debido a su enriquecimiento en ergosterol y diferentes factores superficiales y electroquímicos serían suficientes para inhibir la difusión pasiva de la PenG (Hillenga, 1999). La difusión pasiva tampoco sirve para explicar como la PenG alcanza concentraciones mucho más elevadas extracelularmente que en el interior de la célula (van de Kamp y col. 1999a). Si la PenG estuviera sujeta a difusión pasiva se distribuiría a ambos lados de la membrana plasmática de acuerdo al gradiente de pH existente y su concentración interna sería muy superior a su concentración en el medio de cultivo. Esto resultaría perjudicial para el organismo por la toxicidad intrínseca de la PenG para la célula. Además niveles intracelulares elevados de penicilina, harían que esta fuera utilizada como sustrato por enzimas como penicilina acilasas, lo que conduciría a la generación de cantidades significativas de 6-APA y otros derivados inútiles.

Estas razones parecen apuntar a que la PenG estaría sujeta a una extracción eficiente de la célula, es decir a un transporte activo mediado por proteínas transportadoras. Esta extracción se efectuaría a través de transportadores de tipo MDR (Pao y col. 1998; Saier y col. 1999; Putman y col. 2000b).

4.3.2. El citoplasma y la ruta de biosíntesis de PenG.

En el citoplasma de los organismos productores de penicilina residen enzimas biosintéticas como la ACVS y la IPNS, así como las enzimas accesorias como la PPTasa, TrxA y acilasas de penicilina. Las condiciones del citoplasma, como el valor de pH (7.0-7.2) son favorables para la estabilidad de estas enzimas, pero además, para que estas puedan llevar a cabo su actividad sus cofactores y sustratos han estar también accesibles en el citoplasma.

4.3.3. La vacuola en la biosíntesis de PenG.

4.3.3.1. Papel fisiológico de las vacuolas fúngicas.

Las vacuolas son orgánulos fisiológicamente esenciales en las células vegetales y fúngicas. También pueden estar presentes en células bacterianas y en las de otros organismos eucariotas. Las vacuolas están rodeadas por una membrana simple y de permeabilidad selectiva que aisla el contenido vacuolar del resto de la célula. Son compartimentos acídicos, rellenos de agua con enzimas y moléculas orgánicas e inorgánicas disueltas. No tienen forma ni tamaño definidos y son orgánulos dinámicos que pueden cambiar su morfología según las necesidades de la célula. Estos orgánulos son tremendamente versátiles, pudiendo desarrollar diferentes funciones. Intervienen en la regulación osmótica y del pH del citoplasma mediante el transporte de protones hacia su interior. La acumulación de protones en el interior de la vacuola genera un gradiente que puede ser empleado en el transporte de nutrientes hacia o desde la vacuola, empleando esta fuerza protón motriz. Este transporte de protones también hace que el pH intravacuolar se mantenga ácido, lo que posibilita la actuación de enzimas de degradación en su interior.

Las vacuolas también actúan como almacén de calcio, fosfato y aminoácidos e intervienen en el mantenimiento y regulación de los niveles citosólicos de estos elementos (Klionsky y col. 1990; Kane, 2006).

En los hongos las vacuolas son compartimentos especialmente dinámicos y participan en procesos que implican el tráfico de membranas, como las vías endocítica (para la toma de material extracelular),

autofágica (para llevar hasta la vacuola sustancias y estructuras celulares para su degradación) y secretora que lleva a la vacuola las proteínas residentes desde el retículo endoplásmico (donde se sintetizan y comienzan a madurar) o desde el aparato de Golgi (donde maduran y se clasifican). Estas proteínas pueden ser tanto solubles (proteasas, aminopeptidasas, α -manosidasa) como de membrana (aminopeptidasas, fosfatasa alcalina) (Klionsky y col. 1990). Las vacuolas fúngicas desempeñan también funciones específicas durante el crecimiento del hongo, participando en el transporte a larga distancia de nutrientes a través del micelio, en la regulación de la elongación y ramificación de las hifas, así como en el control temporal del ciclo celular y de la virulencia en especies de hongos fitopatógenos (Veses y col. 2008).

I. La vacuola como compartimento para el almacenamiento de aminoácidos.

En los hongos productores de penicilinas, las células necesitan aminoácidos para sintetizar proteínas y también como sustratos iniciadores de la biosíntesis de estos antibióticos (Figura 14).

En los hongos la acumulación de aminoácidos en las células puede ser conseguida por la toma de estos directamente desde el medio extracelular o mediante su biosíntesis *de novo* (Forsberg y Ljungdahl 2001; Sekito y col. 2008). Intracelularmente se da una compartimentación de aminoácidos existiendo dos reservorios aminoacídicos diferenciados: uno citosólico, minoritario y de disposición inmediata para el metabolismo y la biosíntesis de proteínas, y otro vacuolar, mayoritario (60 % de los aminoácidos totales) y metabólicamente inerte (Oaks y Bidwell 1970; Davis, 1972; Stebbing, 1974). El reservorio vacuolar está constituido sobre todo por aminoácidos básicos, mientras que los aminoácidos con carácter ácido (glutamato y aspartato) son excluidos de dicho conjunto (Wiemken y Durr 1974). La vacuola participa en la regulación de la concentración citosólica de aminoácidos de aminoácidos provoquen efectos negativos sobre el metabolismo y sobre la supervivencia celular (Bernard y Andre 2001; Magasanik y Kaiser 2002; Hinnebusch, 2005).

La importación de aminoácidos a la vacuola ocurre, en la mayoría de los casos, mediante un transporte activo dependiente del gradiente protónico establecido a través de la membrana vacuolar por la acción de una ATPasa localizada en dicha membrana (Kakinuma y col. 1981; Ohsumi y Anraku 1981; Uchida y col. 1985). Los aminoácidos son importados por transportadores, en su mayoría pertenecientes a la familia AAAP y a la superfamilia MFS (Paulsen y col. 1998; Saier, 2000; Russnak y col. 2001; Shimazu y col. 2005), que actúan mediante un mecanismo de simporte H+/aminoácido (Sato y col. 1984).

II. La vacuola como compartimento para el almacenamiento de cationes.

En la célula es muy importante regular la concentración citosólica de iones. Algunos iones son potencialmente tóxicos por si mismos (Sr²⁺, Co²⁺, Pb²⁺) y han de ser retirados del citosol. Otros iones fisiológicamente útiles (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn⁺²) podrían tener efectos perjudiciales si alcanzaran una concentración citosólica inadecuada. Si los iones participan en procesos de regulación metabólica, actuando, por ejemplo, como cofactores enzimáticos, se debe mantener un control preciso de su concentración para que su efecto sobre el metabolismo sea el adecuado (White y Gadd 1986; Cornelius y Nakashima 1987; Raguzzi y col. 1988; Kleinkauf y von Döhren 1990).

Los cationes citosólicos excedentes son importados a la vacuola mediante un antiporte con protones y son retenidos en su interior al interactuar con macromoléculas de polifosfato. Estas macromoléculas se forman en condiciones de disponibilidad de fosfato cuando este se almacena y polimeriza en la vacuola, constituyendo cadenas aniónicas de decenas de residuos de longitud (Klionsky y col. 1990). Debido a su carácter aniónico, los polifosfatos pueden interactuar con cationes presentes en la vacuola formando complejos que facilitan la retención de los mismos en el interior del orgánulo (Indge, 1968; Urech y col. 1978; Dürr y col. 1979; Cramer y Col. 1980; Cramer y Davis 1984).

III. Estado de desarrollo de la hifa y morfología de las vacuolas.

Como ya fue descrito anteriormente, las vacuolas en *P. chrysogenum* están en estrecha relación con el estadio de desarrollo fúngico y con la producción de betalactamas (*ver*: Introducción - 2.1.3.1. Morfofisiología del micelio y producción de penicilinas). Las regiones apicales jóvenes del micelio, donde se da el crecimiento de las hifas, apenas presentan vacuolas. A medida que el micelio madura, aumenta la fracción vacuolar de tal forma que en las regiones del micelio más antiguas, el espacio del citoplasma es ocupado casi totalmente por vacuolas. La producción de penicilina tiene lugar en fracciones subapicales de las hifas, en células con cierto nivel de vacuolización pero que no están en crecimiento activo.

4.3.4. El peroxisoma en la biosíntesis de PenG.

4.3.4.1. Visión general del peroxisoma.

Los peroxisomas están presentes prácticamente en todas las células eucariotas. Son orgánulos vesiculares, con un diámetro de 0.1-1 µm y morfológicamente simples. Consisten en una matriz rica en proteínas, esencial para la función peroxisomal, rodeada por una bicapa lipídica simple, de unos 7 nm de espesor (Subramani, 1993). Los peroxisomas desempeñan numerosas funciones metabólicas, que varían en función de los organismos. Están implicados en el catabolismo de los ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos ramificados, D-aminoácidos y poliaminas. En las células animales albergan la primera reacción de la biosíntesis de plasmalógeno, el fosfolípido más abúndate de la mielina, una sustancia imprescindible para la transmisión eficiente de los impulsos eléctricos en el sistema nervioso. También en las células animales podrían estar implicados en la síntesis de isoprenoides y colesterol. Además contienen enzimas oxidativas, como oxidasas y catalasas, lo que les permite participar en la detoxificación de compuestos nocivos, sobre todo en las células renales y hepáticas (del Río y col. 1992; Alberts y col. 2002). En los seres humanos, defectos funcionales en los peroxisomas se asocian a enfermedades graves de carácter hereditario, caracterizadas por alteraciones en cerebro, riñones, hígado y esqueleto. Algunas de estas enfermedades peroxisomales son la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X y el síndrome de Zellweger (o síndrome cerebro-hepato-renal), entre otras muchas (Depreter y col. 2003; Thoms y col. 2009).

En las plantas los peroxisomas albergan reacciones del ciclo del glioxilato en las células de las semillas y de la fotorrespiración en las células de las hojas. Además, contienen enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasa y NADP-deshidrogenasa de la ruta de las pentosas fosfato, por lo que generan radicales superóxido y óxido nítrico (Corpas y col. 2001). En los tripanosomas la glucólisis ocurre en el interior de los peroxisomas (Alberts y col. 2007).

En los hongos la β -oxidación de ácidos grasos ocurre exclusivamente en peroxisomas y estos orgánulos son también cruciales para el metabolismo de metanol y purinas. En hongos filamentosos los peroxisomas intervienen en la formación de los cuerpos de Woronin, unos orgánulos exclusivos de estos organismos, cuya función principal es sellar los poros septales para minimizar la pérdida de citoplasma cuando se producen daños en las hifas (Managadze y col. 2010; Jedd, 2011). Además juegan un papel crucial en la formación de varios metabolitos secundarios como penicilinas, cefalosporinas, poliquétidos y terpenos (Maggio-Hall y col. 2005; Saikia y Scott 2009; Imazaki y col. 2010).

I. Biogénesis y degradación de peroxisomas en hongos filamentosos.

Los nuevos peroxisomas se generan por fisión de los peroxisomas preexistentes o a partir del retículo endoplásmico. En *P. chrysogenum* la formación de nuevos peroxisomas ocurre principalmente en el ápice de las hifas en crecimiento (Meijer y col. 2010).

Los procesos de formación de nuevos peroxisomas están regidos por unas proteínas específicas denominadas peroxinas, codificadas por los denominados genes PEX. Se han identificado más de 30 peroxinas, la mayoría relacionadas con la biogénesis de la membrana peroxisomal y con la importación de las proteínas del lumen al interior del orgánulo (Kiel y col. 2006). Los genes PEX, por lo general, están evolutivamente conservados en todos los organismos.

Los peroxisomas son orgánulos dinámicos que pueden adaptar su número y forma según las necesidades metabólicas de la célula en un momento dado. El número de peroxisomas es estrictamente regulado por la combinación equilibrada de procesos de biogénesis y de degradación peroxisomal, como parte de un mecanismo para mantener una población de peroxisomas en buen estado y funcionales para evitar el daño celular (Aksam y col. 2007).

4.3.4.2. El papel de los peroxisomas en la ruta de biosíntesis de betalactamas.

Ciertas enzimas de localización peroxisomal son cruciales para la síntesis de antibióticos betalactámicos en los hongos filamentosos, pues como se ha explicado en apartados anteriores, las enzimas IAT y Phl, responsables de las etapas finales de la ruta biosintética de penicilinas, se encuentran y actúan en el interior de los peroxisomas en *P. chrysogenum* (van de Kamp y col. 1999a; Gidijala y col. 2009; Hamed y col. 2013; Ozcengiz y Demain 2013).

La presencia de estas enzimas (IAT y PhI) en el lumen de los peroxisomas parece deberse a que este reúne unas condiciones específicas favorables para el desarrollo de las reacciones que estas catalizan (van de Kamp y col. 1999a; Evers y col. 2004). En *P. chrysogenum* el pH luminal de los peroxisomas es ligeramente alcalino y ronda valores de 7,5-8, según estudios de fluorescencia (van der Lende y col. 2002a). Este pH intraluminal es compatible con el pH óptimo de actuación tanto de la IAT como de la PhI, que se determinaron mediante ensayos enzimáticos en torno a 8 y 8.5 unidades, respectivamente (Álvarez y col. 1987; Lamas-Maceiras y col. 2006). Otra ventaja de la compartimentación en peroxisomas de estas etapas enzimáticas clave sería lograr la concentración adecuada tanto de las enzimas como de sus sustratos en un entorno delimitado. A la vez se evitaría la incorporación de los intermediarios catalíticos a otras rutas metabólicas no deseadas, impidiendo su aprovechamiento en la de biosíntesis de betalactamas o evitar una regulación indeseada de la ruta por procesos de retroalimentación negativa (Evers y col. 2004; Bartoszewska y col. 2011a; Weber y col. 2012a). Los peroxisomas no son esenciales para la producción de penicilinas hidrofílicas (como por ejemplo la IPN), pero si constituyen un factor determinante a la hora de lograr una alta eficiencia productiva de PenG, no sólo en P. chrysogenum, sino también en otros microorganismos. En Penicillium, cuando a la enzima IAT le es suprimida la señal PTS1, que determina su localización en la matriz de peroxisomas, la enzima IAT no alcanza este destino y la biosíntesis de penicilinas se suprime por completo (Müller y col. 1992). Este hecho es probablemente debido a que la activación de la cadena lateral de la PenG, mediada por Phl, sí que ocurre en el interior del orgánulo y por tanto la IAT (retenida en el citoplasma al carecer de la señal PTS1) no tiene acceso a su co-sustrato activado, el PAA-CoA. En Aspergillus nidulans existe actividad IAT tanto a nivel citosólico como a nivel peroxisomal. En ausencia de la IAT asociada a peroxisomas, aún se registra producción de penicilina gracias a la función IAT citosólica y a que posiblemente exista, en este organismo, un mecanismo de activación de las cadenas laterales dependiente de Co-A en el citosol (Spröte y Brakhage 2007; Weber y col. 2012a). Más aún, cuando los genes pcbAB, pcbC, penDE y phl de P. chrysogenum se expresan heterólogamente en una cepa mutante de la levadura Hansenula polymorpha incapaz de producir peroxisomas, se detecta producción de penicilina. Sin embargo, esta producción es mucho menor en comparación con la producción observada en una cepa de H. polymorpha con peroxisomas funcionales, en la que también se expresan los genes pcbAB, pcbC, penDE y phl de P. chrysogenum (Gidijala y col. 2009).

Todos los ejemplos expuestos en el párrafo previo demuestran que la existencia de peroxisomas intactos y funcionales es estrictamente necesaria para la producción eficiente de penicilina. La ausencia de peroxisomas viables o la existencia de peroxisomas malfuncionantes provocan una importante caída de la producción de penicilinas (Meijer y col. 2010; Opalinski y col. 2010). Todo ello viene a confirmar que los peroxisomas crean un microambiente bioquímico único, propicio para el funcionamiento óptimo de las enzimas biosintéticas vinculadas a la biosíntesis de penicilina que se localizan en ellos.

No sólo la presencia de peroxisomas intactos, sino que también el volumen de la fracción peroxisomal tiene influencia en la producción eficiente de antibióticos en los hongos filamentosos. De hecho una de las características que distingue a las cepas de alta y baja producción de penicilina de *P. chrysogenum*, como ya se ha apuntado anteriormente, es que las cepas de alta producción presentan un mayor número de peroxisomas (van den Berg y col. 2008). A mayor volumen de la fracción peroxisomal, se entiende que habrá una mayor superficie de membrana peroxisomal, lo cual es favorable para la producción de betalactamas, puesto que se amplifica potencialmente el flujo de entrada al peroxisoma de intermediarios, precursores y cofactores que participan en la ruta biosintética a nivel peroxisomal (Gidijala y col. 2010; Weber y col. 2012a).

Mediante la sobreexpresión de peroxinas vinculadas a la proliferación peroxisomal, se ha evidenciado la relevancia del volumen de la fracción peroxisomal en la producción de betalactamas. Pex11 es una peroxina que forma parte de la maquinaria de fisión que hace posible la proliferación peroxisomal (Kiel y col. 2005; Opalinski y col. 2010; Opalinski y col. 2012). Cuando Pex11 se sobreexpresa en *P. chrysogenum* se consigue incrementar de 2 a 3 veces la producción de penicilina. Este incremento productivo no se debe a variaciones en los niveles de las enzimas biosintéticas asociadas a los peroxisomas, ya que estos no se ven alterados (Kiel y col. 2005). Pex14/17 es una peroxina específica de *P. chrysogenum* y formaría parte del complejo proteico encargado de promover la translocación de proteínas de la matriz peroxisomal, una vez que estas han sido sintetizadas en el citoplasma y reconocidas

por el receptor soluble Pex13 (Opalinski y col. 2010). Cuando Pex14/17 se sobreexpresa en la cepa Wisconsin 54-1255, también se obtienen incrementos en el rendimiento de betalactamas. Puesto que la tasa de importación de proteínas al interior del peroxisoma es muy eficiente *en P. chrysogenum*, el incremento de la producción que se observa es atribuido más al incremento de la fracción peroxisomal que a la mejora de la tasa de importación de proteínas (Opalinski y col. 2010).

Sin embargo, no todas las condiciones que favorecen la proliferación peroxisomal se asocian a incrementos productivos. Por ejemplo, la suplementación con ácido oleico (que se procesa en los peroxisomas como posible fuente de carbono) o la sobreproducción de dinamina Dnm1 (proteína con actividad GTPasa involucrada en los procesos de fisión de peroxisomas) estimulan la proliferación peroxisomal, pero a la vez tienen efectos negativos sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*. Probablemente esto se deba a que estas condiciones interfieren en el equilibrio global de la célula, por ejemplo, alterando el metabolismo de ácido oleico o afectando a la homeostasis de otros orgánulos (Dnm1 también está implicada en la fisión de mitocondrias).

I. Autofagia de peroxisomas y su influencia en la producción de penicilinas.

La autofagia es un mecanismo implicado en muchos procesos celulares, como la supervivencia ante la escasez de nutrientes, la eliminación de orgánulos y proteínas dañadas, la remodelación celular (Nakatogawa y col. 2009) y la protección contra el estrés oxidativo (Yorimitsu y Klionsky 2005). Mediante la autofagia los componentes celulares son degradados y reciclados en el lumen vacuolar posibilitando un reemplazo continuo de materiales celulares. Este fenómeno constituye un mecanismo crucial para el mantenimiento de la homeostasis celular y la supervivencia en condiciones de escasez de nutrientes (Meijer y col. 2007).

Aunque en general la autofagia es un mecanismo pro-supervivencia también puede estar implicado en procesos de muerte celular, como ocurre en *P. chrysogenum*. En condiciones de producción de penicilinas, en este hongo se dan constitutivamente procesos de autofagia, sobre todo en las células hifales subapicales donde tiene lugar la síntesis de penicilinas (Paul y Thomas 1996; Jüsten y col. 1998), lo que contribuye al progresivo deterioro de estas células. En estas células subapicales maduras y vacuolizadas se da una degradación autofágica exhaustiva de materiales citosólicos y de peroxisomas. La autofagia de estos componentes podría afectar a la eficiencia de producción de penicilina teniendo en cuenta que se estarían causando variaciones en los niveles de enzimas citosólicas (como ACVS e IPNS) y en la dotación de peroxisomas.

Para probar el efecto de la autofagia sobre la biosíntesis de betalactamas se creó una cepa de *P. chrysogenum* defectiva en Atg1 (Bartoszewska y col. 2011b). El gen *atg1*, codifica una serin-treonin quinasa, implicada en las etapas iniciales de la autofagia en levaduras y hongos filamentosos, por lo que su inactivación implica una disfunción de la autofagia en las células de estos organismos (Kamada y col. 2004; Liu y col. 2007; Cheong y Klionsky 2008). En el mutante en *atg1* de *P. chrysogenum*, el bloqueo de los procesos autofágicos consiguió retardar el deterioro de las células subapicales donde se desarrolla la ruta biosintética de betalactamas. Mediante microscopía de fluorescencia, en estas células se constató un incremento de la fracción peroxisomal así como, mediante "*western blot*", un incremento de los niveles de las enzimas IPNS e IAT, con respecto a la cepa control (con la proteína Atg1 funcional). Ambos fenómenos explican porqué que la inhibición de la autofagia lleva asociado un incremento de la producción de

penicilina. En vista de que la inhibición de la autofagia prolonga la vida y funcionalidad de las células, el bloqueo de este proceso degradativo podría tener un aprovechamiento industrial para la mejora de la tasa de producción durante las fermentaciones (Bartoszewska y col. 2011b).

4.3.4.3. Transporte de betalactamas y sus intermediarios a través de la membrana peroxisomal.

Debido a la compartimentación de la biosíntesis de betalactamas algunos sustratos e intermediarios importantes para la ruta, como el PAA o la IPN, necesitan entrar en el peroxisoma, para lo cual han de atravesar la membrana de este orgánulo. Igualmente, la PenG también tendría que atravesar la membrana peroxisomal para ser secretada al medio externo (Figura 14).



Figura 14. La ruta de biosíntesis de PenG es una vía metabólica compartimentada, es decir, que diferentes reacciones transcurren en diferentes compartimentos subcelulares donde se dan las condiciones específicas adecuadas para cada reacción. Esto supone que ha de haber procesos de transporte, en ocasiones mediados por proteínas transportadoras, a través de la membrana plasmática y de membranas intracelulares, tanto de los sustratos como de los productos de las reacciones para dar continuidad a la ruta biosintética. En la imagen, que representa esquemáticamente una célula de P. chrysogenum se muestra donde se desarrollan las diferentes reacciones que integran la ruta biosintética de PenG. En el citosol, la ACV-sintetasa (ACVS-OH) pasa a su forma activa (ACVS-SH) por acción de la fosfopantetenil transferasa (PPTasa) y produce d-(L-a-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) a partir de tres moléculas precursoras: ácido a-aminoadípico (a-AA), cisteína (cys) y valina (val). A continuación la enzima IPN- sintasa (IPNS) convierte ACV en la betalactama isopenicilina N (IPN9, que es transportada al interior del peroxisoma. En este orgánulo el ácido fenilacético (PAA) es activado por una fenilacetil-CoA ligasa (PCL) a PAA-CoA, que es empleado por la IPN aciltransferasa (IAT) para sintetizar penicilina G (PenG) formándose ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) como intermediario precursor de PenG. La PenG ha de ser luego exportada del peroxisoma y secretada al medio de cultivo. También son secretados parcialmente al medio extracelular los intermediarios ACV, IPN y 6-APA. En la figura, mediante corpúsculos de color naranja, se indican los puntos donde presuntamente habría un transporte transmembranal mediado por una proteína transportadora [Basado en (Gidijala y col. 2010)].

La membrana peroxisomal fúngica tiene un ratio proteína/fosfolípido relativamente bajo, lo que la convierte en una estructura fluida. Además su contenido en ergosterol es menor que el de la membrana plasmática y por tanto debería ser más permeable que esta, pero aún así la membrana del peroxisoma constituye un barrera efectiva. Moléculas como acetil-CoA, NAD(H), NADP(H) y ATP no pueden difundir libremente a través de ella (van Roermund y col. 1995). Tampoco los protones tienen libertad de paso a través de la membrana peroxisomal, por lo que todas estas especies químicas requieren la existencia de

transportadores para poder atravesar la membrana del orgánulo. Apenas se han descrito transportadores localizados en la membrana peroxisomal. En *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrito el transportador Ant1p, que está implicado en la translocación de ATP desde el citosol al lumen peroxisomal al intercambiarlo por el AMP que se genera en el interior del peroxisoma durante la activación de ácidos grasos (Palmieri y col. 2001). Sin embargo, para muchos otros metabolitos, como las betalactamas y sus intermediarios, aún no se han identificado sistemas específicos de transporte.

El PAA, sustrato de la Phl peroxisomal, es una molécula hidrofóbica pequeña y podría atravesar la membrana peroxisomal por difusión simple. No así su versión activada, el PAA-CoA.

La IPN, cosustrato de la IAT, es una molécula hidrofílica y de peso molecular elevado, lo que hace improbable que pueda atravesar la membrana sin la participación de una proteína facilitadora. De hecho, mediante ensayos *in vivo* de transporte se demostró que la tasa de importación de IPN a través de la membrana peroxisomal por difusión simple es muy pobre (García-Estrada y col. 2007).

En cuanto a la PenG, que es una penicilina hidrofóbica, tampoco se ha concretado su vía de salida del peroxisoma (Hillenga, 1999).

Dado el contenido relativamente bajo de proteínas integrales de membrana presentes en la membrana peroxisomal (como sugieren imágenes de microscopía de barrido), se ha sugerido que tanto el producto final como los intermediarios de la ruta de biosíntesis de penicilina serían transportados a través de proteínas transportadoras generalistas, por ejemplo a través de transportadores MDR pertenecientes a la superfamilia MFS (Bartoszewska y col. 2011a). Esta hipótesis la apoya el experimento llevado a cabo con *H. polymorfa*, en el que se consiguió la secreción eficaz de penicilina tras la expresión heteróloga de la ruta de biosíntesis completa en la levadura (Gidijala y col. 2009). La secreción de penicilina tuvo que llevarse a cabo a través de transportadores no especializados en el transporte de penicilinas puesto que *H. polymorpha* no produce betalactamas de forma natural. Este resultado, sin embargo, no excluye el hecho de que las cepas de *Penicillium* empleadas a nivel industrial hayan desarrollado transportadores se específicos para el transporte de las betalactamas y sus intermediarios o que ciertos transportadores se expresen en mayor medida para la movilización de estos sustratos.

Estudios transcriptómicos han permitido comprobar que en condiciones que favorecen la producción de penicilinas, esto es, en cepas superproductoras y en presencia de PAA, se produce un incremento de la expresión de proteínas con función transportadora con respecto a las condiciones control. Teniendo en cuenta la importante fracción que representan los transportadores de tipo MFS entre todos los transportadores codificados en *P. chrysogenum* y sabiendo que la producción de PenG es sensible a verapamilo (un antagonista de transportadores MDR), se refuerza la hipótesis de que la secreción de este antibiótico estaría mediada por este tipo de transportadores.

4.4. Proteínas transportadoras de membrana con influencia sobre la ruta biosintética de betalactamas.

Las proteínas transportadoras, como se ha expuesto en los apartados previos, juegan un papel muy relevante en la ruta de biosíntesis de betalactamas y su caracterización permitiría comprender mejor el proceso biosintético de las mismas. Por eso muchos estudios se han dedicado a la búsqueda y análisis de transportadores específicos involucrados en esta ruta. Todo el interés volcado en la búsqueda y análisis de proteínas transportadoras vinculadas a la ruta de biosíntesis de betalactamas, ha permitido describir solo unas cuantas proteínas transportadoras, cuya función tiene cierto impacto sobre el rendimiento productivo de antibióticos en diferentes microorganismos productores.

En algunos organismos productores de betalactamas, en los *clusters* de biosíntesis, además de los genes estrictamente biosintéticos, aparecen genes que codifican proteínas transportadoras. Los genes que las codifican, teóricamante, se expresarían para evitar el suicidio de los organismos productores al otorgarles resistencia a los metabolitos secundarios que ellos mismos producen.

Uno de estos genes es *cmcT* presente en el *cluster* de biosíntesis de cefamicinas de las bacterias productoras *S. clavuligerus* y *A. lactamdurans.* CmcT es un transportador de tipo MFS localizado en la membrana plasmática bacteriana y encargado de la secreción de cefamicinas (Coque y col. 1993; Liras, 1999).

En *A. chrysogenum* el gen *cefT* fue identificado dentro del *cluster* temprano de biosíntesis de cefalosporinas y codifica para una proteína de tipo MFS (Ullán y col. 2002). CefT está probablemente implicada en la secreción de betalactamas hidrofílicas, cuya cadena lateral es un residuo de aminoadipato, como IPN, PenN y DAC (Ullán y col. 2008a).

También en *A. chrysogenum* e incluido en la misma sección del *cluster* de biosíntesis de cefalosporinas que *cefT*, se encontró el gen *cefM*, codificando otra proteína de la familia MFS con 12 TMS hidrofóbicos (Teijeira y col. 2009). La supresión funcional de este gen causa un drástica reducción de la producción de cefalosporinas y a la vez genera un acúmulo intracelular de PenN siete veces superior al de la cepa de referencia *A. chrysogenum* C10. Experimentos de microscopía confocal de fluorescencia revelan que la proteína CefM se localiza en los peroxisomas. Puesto que la reacción de epimerización de IPN a PenN tiene lugar en el interior de los peroxisomas, parece que CefM estaría implicada en la translocación de PenN desde el lumen peroxisomal al citosol, donde la PenN podría ser convertida en CPC (Teijeira y col. 2009).

También en el *cluster* temprano de biosíntesis de cefalosporinas se detectó otro gen, nombrado como *cefP*, que codifica otro transportador MFS con 11 TMS. CefP es esencial en la biosíntesis de cefalosporinas, de tal forma que una cepa mutante interrumpida en *cefP* es incapaz de sintetizar cefalosporinas y por el contrario secreta una cantidad significativa de IPN, lo que apuntaría a un bloqueo en la conversión de IPN a PenN en el mutante interrumpido. Estudios de microscopía de fluorescencia permitieron determinar que la proteína CefP tiene una localización peroxisomal (Ullán y col. 2010). En este hongo filamentoso y en el mismo *cluster* temprano de biosíntesis, se localizó el gen *cefR* (Teijeira y col. 2011). La interrupción del gen *cefEF* e incrementa la secreción de PenN, provocando la reducción de la producción de cefalosporinas. Por el contrario, su sobreexpresión causa un incremento de la producción

de cefalosporinas al evitar la secreción del intermediario PenN. El análisis del nivel de expresión de *cefR* muestra que la proteína que este codifica se comporta como un represor de los genes *cefM* y *cefT* en *A. chrysogenum*, que codifican proteínas implicadas en la secreción de PenN y de las betalactamas hidrofílicas IPN, PenN y DAC, respectivamente. El gen *cefR* constituye el primer caso en que se describe un sistema molecular de regulación de transportadores de betalactamas (Teijeira y col. 2011).

En otros microorganismos productores, se han caracterizados proteínas transportadoras, codificadas por genes que no pertenecen a las agrupaciones biosintéticas, pero que aún así influyen sobre la producción antibiótica, por lo que se las supone vinculadas de una u otra forma a la ruta de biosíntesis.

En *P. chrysogenum* CGMCC 3.5129 el gen *penT*, homólogo a *cefT* de *A. chrysogenum*, codifica una proteína MFS con 12 TMS hipotéticamente localizada en la membrana plasmática. La atenuación de la expresión de *penT* disminuye la producción de penicilina, mientras que su sobreexpresión aumentan la producción de penicilina y la sensibilidad del hongo al PAA. PenT estimularía la producción de penicilina al participar en la importación de PAA a través de la membrana plasmática, lo que explicaría el efecto simultáneo sobre la ruta biosintética y el perfil de sensibilidad al ácido fenilacético (Yang y col. 2012).

También en relación con el transporte de fenilacetato en *P. chrysogenum*, el transportador ABC40 actúa como un sistema dependiente de ATP para la extracción eficiente de algunos ácidos débiles, entre ellos el PAA, protegiendo así a las células de una acidificación del citoplasma que tendría fatales consecuencias metabólicas. La expresión de *abc40* es estimulada enormemente por la exposición a altas concentraciones de PAA. Sin embargo, la delección de este gen no afecta a la producción de betalactamas, por lo que ABC40 no desempeñaría un papel esencial en el proceso de biosíntesis. El gen *abc40* se expresa más en cepas de *P. chrysogenum* de menor producción de penicilinas. Esto podría ser debido a que en estas cepas la neutralización del efecto toxico del fenilacetato a través de su incorporación a la biosíntesis de betalactamas es menos eficiente que en las cepas de alta producción de tal forma que en el medio de cultivo permanece una mayor cantidad de PAA que puede ejercer su efecto inductor sobre la expresión de *abc40* (Weber y col. 2012b).

En *A. nidulans* el gen *atrD* codifica un transportador de tipo ABC. El nivel de expresión de *atrD* se incrementa frente a la exposición a compuestos tóxicos lo que confirma su función como MDR. Cepas mutantes defectivas en AtrD muestran hipersensibilidad a compuestos tóxicos como nigericina, valinomicina y cicloheximida, por lo que AtrD participaría en la protección frente a estos compuestos. Además el mutante en AtrD exhibe una producción de penicilina disminuida, lo que indicaría que este transportador ABC tomaría parte en la secreción de penicilina en *A. nidulans* (Andrade y col. 2000).

Objetivos y metodología

5

5.1. Presentación de los objetivos de la presente tesis doctoral.

Dada su valor farmacológico, la necesidad de producir penicilina a gran escala para cubrir las necesidades sociales, impulsó el rápido desarrollo de su producción industrial, lo que además supuso en nacimiento de la industria farmacológica moderna. Así la penicilina también resultó ser un bien de mercado, con las implicaciones económicas que ello conlleva y no sólo una sustancia de interés médico.

El interés que despertó la penicilina en los ámbitos clínico y económico promovió la investigación y el desarrollo del conocimiento sobre aspectos directamente relacionados con su producción, como por ejemplo la biología del hongo productor por excelencia, *P. chrysogenum*. Debido a su capacidad para producir penicilina los investigadores han perseguido incansablemente descifrar los entresijos de este hongo filamentoso. Ha suscitado interés desde su clasificación taxonómica y su relación filogenética con otras especies hasta la determinación del conjunto de reacciones enzimáticas que conducen a la obtención de penicilina como producto final y los factores que influyen en la eficiencia de esta valiosa ruta anabólica del metabolismo secundario.

En lo que respecta a la ruta de biosíntesis de penicilina, a día de hoy se sabe que en *P. chrysogenum* la vía metabólica implica a tres genes estructurales pcbAB, pcbC y penDE, que codifican las enzimas ACVS, IPNS e IAT respectivamente. Todos estos elementos están perfectamente caracterizados en la actualidad (los genes se han clonado y secuenciado, las enzimas se han purificado conociéndose tanto su estructura como su funcionalidad y además se ha determinado su localización subcelular). Aparte de las tres enzimas biosintéticas, para la biosíntesis de penicilinas también es imprescindible la intervención de enzimas implicadas inicialmente en el metabolismo primario como Phl, PPTasa y tiorredoxina-reductasas. Además, la ruta de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* está compartimentada: las reacciones iniciales que conducen a la formación de LLD-ACV e IPN transcurren en el citosol, mientras que las fases finales de la síntesis, que conducen a la producción de PenG, tienen lugar en el interior de peroxisomas. El fenómeno de compartimentación metabólica es característico de organismos eucariotas. Se considera que la compartimentación de esta ruta biosintética estaría en línea con una tendencia global generalizada hacia la optimización de la eficiencia metabólica y energética que la adaptación evolutiva ha impuesto en todos los organismos vivos. La compartimentación es posible gracias a la existencia de membranas biológicas, que constituyen barreras semipermeables que permiten el mantenimiento de microambientes diferenciados a uno y otro lado de la misma. La distribución de las enzimas de la ruta de biosíntesis de penicilina en diferentes compartimentos supone que estas y sus sustratos pueden estar físicamente separados por membranas biológicas. Para dar continuidad a la vía metabólica, los intermediarios de la ruta han de atravesar estas membranas biológicas. Para ello existen proteínas transmembranales con

función transportadora encargadas de transferir de un lado de la membrana al otro los compuestos que no pueden atravesarla por sí mismos.

Los procesos de transporte y por tanto las proteínas transportadoras son importantes para llevar a término la biosíntesis de penicilina. Diferentes evidencias apuntan a que los transportadores activos serían los responsables mayoritarios de los procesos de transporte involucrados en esta ruta de biosíntesis. A pesar de su relevancia, son muy pocas las proteínas transportadoras que han podido ser asociadas a la producción de betalactamas siendo esta la tesis que sustenta el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Como punto de partida a este trabajo fueron detectados genes que codificaran proteínas transportadoras en *P. chrysogenum*. Para acotar la búsqueda inicial se contrastó el proteoma de *P. chrysogenum* (deducido de su secuencia genómica, publicada en 2008) con proteínas transportadoras de *A. chrysogenum* para las que se había demostrado previamente su implicación en la biosíntesis de cefalosporinas (otro tipo de antibióticos betalactámicos). Estas proteínas de *A. chrysogenum*, caracterizadas en los últimos años por el grupo de investigación en cuyo seno se ha desarrollado este trabajo son CefT, CefP y CefM. Una vez descubiertas las proteínas de *Penicillium* con un mayor grado de homología a CefT, CefP y CefM de *A. chrysogenum* se identificaron los correspondientes genes codificantes y se aplicaron estrategias para la caracterización funcional de los mismos. Se generaron cepas genéticamente modificadas en las que la expresión del gen diana estaba alterada y se analizó el efecto que tenía esta alteración sobre la ruta de biosíntesis de penicilina. Además se llevó a cabo la localización subcelular de cada proteína mediante la expresión heteróloga de proteínas de fusión fluorescentes, para ayudar en la caracterización funcional del gen analizado.

Para cada uno de los tres genes analizados a lo largo de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos experimentales:

- 1. Rastreo informático del proteoma de *Penicillium chrysogenum* en busca de proteínas homólogas a las proteínas transportadoras de referencia de *A. chrysogenum* e identificación de los genes que codifican a dichas proteínas.
- 2. Silenciamiento de los genes diana de *Penicillium chrysogenum* mediante la estrategia de ARN de interferencia mediada por siARNs (ARNs interferentes pequeños).
- 3. Análisis de los efectos genotípicos y fenotípicos del silenciamiento de los genes diana en *Penicillium chrysogenum*.

- 4. Sobreexpresión de los genes diana de *Penicillium chrysogenum* mediante el uso de un promotor fúngico de expresión fuerte.
- 5. Análisis del efecto genotípico y fenotípico de la sobreexpresión de los genes diana en *Penicillium chrysogenum*.
- 6. Localización de la proteína diana en *Penicillium chrysogenum* mediante la expresión heteróloga de proteínas fluorescentes y visualización de las muestras al microscopio confocal de fluorescencia.

5.2. Procedimiento para la caracterización de los genes y proteínas diana de *P. chrysogenum.*

Para la caracterización de las tres proteínas de *P. chrysogenum* y sus correspondientes genes codificantes, se aplicó una estrategia experimental con cuatro ejes de actuación comunes:

I – Determinación de la proteína de *P. chrysogenum* con mayor homología a la proteína de referencia (de *A. chrysogenum*) y del gen que la codifica y caracterización *in silico* de ambos.

II – Silenciamiento de gen diana mediante siRNAs (*small interference RNAs,* ARNs de interferencia pequeños) y determinación del efecto del silenciamiento sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de betalactamas.

III – Sobreexpresión del gen diana mediante el uso de un promotor de expresión fuerte y caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG.

IV – Determinación de la localización *in vivo* de la proteína diana empleando proteínas de fusión fluorescentes.

Cada eje de la estrategia experimental se describe muy brevemente a continuación, y en la figura 15, se presenta un esquema mostrando con algo más de detalle cada uno de los pasos implicados en cada técnica aplicada, todo ello para dar una visión de conjunto de la estrategia experimental global (Figura 15).



Figura 15: Diagrama del flujo de trabajo desarrollado en la presente tesis. El conjunto de tareas individuales que forman una estrategia concreta aparecen recuadradas por un marco de color y el marco aparece rotulado con el nombre de la estrategia correspondiente.

I – Determinación de la proteína de *P. chrysogenum* con mayor homología a la proteína de referencia (de *A. chrysogenum*) y del gen que la codifica y caracterización *in silico* de ambos

La secuencia del genoma de *P. chrysogenum* fue publicada en el año 2008 (van den Berg y col. 2008). Esto hizo posible hacer un alineamiento de la secuencia de la proteína de referencia de *A. chrysogenum* con las secuencias de todas la proteínas deducidas de *P. chrysogenum*. Para ello se empleó el algoritmo BLASTp (protein-protein *Basic Local Alignment Search Tool*) de la plataforma en Internet Pubmed (Biblioteca Nacional del Instituto de Salud Pública) del Centro Nacional para la Información en Biotecnología estadounidense (NCBI, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed]) y estableciendo "*P. chrysogenum*" como el taxón a analizar. De las proteínas alineadas de *P. chrysogenum*, la de mayor nivel de homología con la proteína de referencia de *A. chrysogenum* en cada caso, fue la que se seleccionó para su caracterización y la del gen codificante correspondiente.

En la misma plataforma, la secuencia del gen diana se empleó para hacer un alineamiento global con las secuencias nucleotídicas recogidas en las bases de datos, para determinar qué tipo de genes se asemejaban al gen de interés (NCBI>Blast>Nucleotide blast).

También a través de la plataforma del NCBI, la secuencia de la proteína diana fue analizada para determinar la presencia de dominios característicos (NCBI>Protein>Structure>Conserved Domain Search Results). Igualmente, mediante otros recursos informáticos se analizó el perfil de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica de interés (SACS HMMTOP: Transmembrane Prediction Page; TMHMM Server v. 2.0: Prediction of transmembrane helices in proteins; TopPred 0.01: Topology prediction of membrane proteins and SOUSI Proteome, PsiPred MEMSAT-SVM) así como la posible presencia en ella de péptidos señal en general (PSORT II, [psort.hgc.jp]) y para el direccionamiento a peroxisomas en particular (Peroxisome DB>Predictive tool>PTSs predictor, [http://www.peroxisomedb.org/]). En los casos en los que fue posible también se obtuvo un modelado tridimensional de la proteína (swissmodel.expasy.org/)

II – Silenciamiento de gen diana mediante siARNs y determinación del efecto del silenciamiento sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibióticos.

Para llevar a cabo el silenciamiento génico se construyeron plásmidos integrativos portadores del casete para el silenciamiento del gen diana, a partir del vector pJL43RNAi (Ullán y col. 2008b), que además porta también un casete de resistencia a fleomicina para la selección de los transformantes positivos. El casete de silenciamiento consiste en un fragmento exónico corto (de 250 a 500 pb) del gen diana subclonado bajo el control de dos promotores de expresión antiparalelos: el P*gpd* [(el promotor de la gliceradehido-3-fosfato deshidrogenasa de *A. nidulans* (Punt y col. 1992)] y el P*pcbC* [(el promotor de la IPNS de *P. chrysogenum* (Gutiérrez y col. 1997)]. El fragmento exónico es obtenido mediante una reacción de PCR para la amplificación de dicho fragmento a partir del gen nativo.

La expresión del casete de silenciamiento permite la amplificación del fragmento exónico correspondiente al gen diana. La utilización simultánea de los dos promotores antiparalelos genera dos hebras de ARN complementarias que se hibridan entre sí, dando lugar a moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc), que son los que van a desencadenar el mecanismo de silenciamiento dirigido de la expresión del gen diana. El plásmido de silenciamiento se transformó en protoplastos obtenidos de la cepa Wisconsin 54-1255. Los protoplastos se seleccionaron por su resistencia a fleomicina, tras varios pases en un medio mínimo suplementado con dicho compuesto. En este medio selectivo se desarrollarían, generando colonias, únicamente aquellos protoplastos que hubiesen incorporado el vector transformado. De las colonias obtenidas se hizo una selección al azar y mediante una hibridación de Southern se determinaría si el patrón de restricción de su ADN genómico era coincidente con el patrón esperado para una cepa verdaderamente transformada (transformante positivo). En ese caso, la cepa se fermentaría en condiciones de producción de penicilinas, suplementando el medio de cultivo con ácido fenilacético. A lo largo de la fermentación se realizarían muestreos periódicos. Las muestras extraídas se procesarían para determinar el efecto del silenciamiento sobre la biosíntesis de penicilina por comparación con lo observado en la cepa parental (Wisconsin 54-1255). A partir del caldo de cultivo de las muestras de fermentación se midió la producción de antibióticos mediante diferentes procedimientos, extrapolando las mediciones a una recta patrón para hacer las estimaciones de producción. El antibiograma frente a *M. luteus* se aplicó para determinar la producción de compuestos betalactámicos. Mediante HPLC, se pudo valorar la producción de IPN y PenG en cada caso. Mediante la técnica de TLC, también se analizó la producción de ACV.

A partir del micelio de las muestras fúngicas positivas se hizo una extracción de ARN y se cuantificó el nivel de transcripción del gen diana mediante *northern blot* o RT-PCR semicuantitativa. Mediante estas técnicas se pretendía determinar si, en realidad, en los transformantes se estaba produciendo una reducción del nivel de expresión del gen diana en comparación con la cepa parental. Las mismas técnicas se aplicaron, en algunos casos, para la cuantificación del nivel transcripcional de los genes biosintéticos en los transformantes silenciados.

También a partir del micelio de las cepas transformantes, se hizo una extracción de proteínas totales que se analizaron mediante una hibridación de "*western*" para determinar la presencia/ausencia de una determinada proteína.

III – Sobreexpresión del gen diana mediante el uso de un promotor de expresión fuerte y caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG.

Para llevar a cabo la sobreexpresión de los genes diana se construyeron plásmidos integrativos a partir del vector pIBRC43*BglII* (Kosalková y col. 2009). En el plásmido de sobreexpresión el gen diana íntegro, obtenido mediante PCR a partir del ADN genómico de *P. chrysogenum*, queda bajo el control del promotor P*gdh* (el promotor de la glutamato deshidrogenasa de *Aspergillus awamori* (Cardoza y col. 1998)) y el terminador T*cyc1* [el terminador del citocromo c1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Russo y col. 1991)]. El P*gdh* es un promotor de alta eficiencia que permite incrementar el nivel de expresión de gen que controla y por tanto provocar un esperable incremento del nivel intracelular de la proteína correspondiente y por ello un aumento de la actividad proteica correspondiente.

Los plásmidos de sobreexpresión se utilizarían para transformar protoplastos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, junto con el plásmido auxiliar pJL43 (Gutierrez y col. 1991), que porta un casete de resistencia a fleomicina (del que carece pIBRC43*BglII*) para la selección posterior de los transformantes. Los protoplastos transformados se seleccionaron por su resistencia a fleomicina y las cepas resistentes se sometieron al mismo tipo de análisis que en el caso del silenciamiento, para determinar el efecto de la

sobreexpresión del gen diana en las cepas modificadas genéticamente (en comparación con la cepa de referencia Wisconsin 54-1255). Concretamente se realizó un análisis de la expresión del gen diana y de los genes biosintéticos en condiciones de producción de penicilina mediante hibridación de "*northern*" y/o RT-PCR semicuantitativa. También se estudió el perfil de producción de metabolitos mediante antibiograma y/o HPLC.

IV – Determinación de la localización *in vivo* de la proteína diana empleando proteínas de fusión fluorescentes.

Para cumplir este objetivo se construyeron vectores en los que el gen diana y el gen DsRed de Discosoma sp., que codifica una proteína fluorescente roja (Clonetech), están fusionados en marco bajo el control del promotor Pgdh (Cardoza y col. 1998) y el terminador Tcyc1 (Russo y col. 1991). La expresión del casete Pgdh-gen diana-Tcyc1 da lugar a una proteína quimérica fluorescente roja cuya localización en la célula marcará el emplazamiento original de la proteína nativa de interés. El plásmido para la expresión de esta proteína fluorescente se utilizó para transformar protoplastos de P. chrysogenum junto con el plásmido p43EGF-SKL (Ullán y col. 2010). Este plásmido porta un casete de resistencia a fleomicina y además codifica una proteína fluorescente verde con una señal de tipo PTS1 (de secuencia SKL) que determina su localización peroxisomal. La proteína fluorescente verde se empleó a modo de testigo, para ayudar a determinar la localización subcelular de la proteína fluorescente roja derivada de la proteína de interés. Los protoplastos transformados se seleccionaron por su resistencia a fleomicina (codificada en el plásmido p43EGFP-SKL), por lo que se asume que han incorporado dicho plásmido. Mediante una hibridación de Southern se determinó que clones habían incorporado el casete de expresión para la proteína fluorescente roja derivada de la proteína de interés y el de la proteína EGFP-SKL. Los clones positivos se crecieron en medio mínimo CCM (Minuth y col. 1982) y tras un periodo de crecimiento determinado se tomaron muestras que se examinaron con el microscopio de fluorescencia.

En algún caso se llevó a cabo una tinción de las muestras con un colorante lipofílico fluorescente rojo, el FM-4-64, con afinidad selectiva por la membrana vacuolar al ser interiorizado por las células vivas. Esta tinción ayudó a confirmar el emplazamiento de la proteína de fusión fluorescente roja de interés.

5.3. Silenciamiento mediante ARNi mediado por siARN

La caracterización funcional de los transportadores CefT, CefP y CefM de *A. chrysogenum*, llevada a cabo por este grupo de investigación en el pasado, se hizo mediante la interrupción del gen codificante empleando la técnica del doble marcador. Esta técnica clásica es adecuada y efectiva para la determinación de la función de genes concretos, puesto que logra la supresión total de la expresión del gen diana (fenotipo *"knock-out"*) al romper el marco de lectura del gen en cuestión. Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de ser una estrategia de difícil realización: los plásmidos para la interrupción suelen ser de gran tamaño, lo que complica su construcción y la interrupción en sí misma requiere de una doble recombinación homóloga entre el plásmido y el gen diana endógeno. Los hongos filamentosos como *A. chrysogenum* y *P. chrysogenum* muestran una baja frecuencia de recombinación homóloga, lo que aumenta la dificultad para llevar a cabo la interrupción génica por este método. Por todo ello, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se decidió variar el procedimiento habitual para la

caracterización de genes, y se aplicó la estrategia de silenciamiento génico mediado por siARN, que por otra parte ya había demostrado ser eficiente para la caracterización de los genes *pcbC* en *P. chrysogenum* y *cefEF* de *A. chrysogenum* (Ullán y col. 2008b).

El mecanismo de ARN de interferencia (ARNi) se da de forma espontánea en la naturaleza, constituyendo un mecanismo biológico muy conservado en los organismos eucariotas. En hongos filamentosos el mecanismo de ARNi puede ser desencadenado por una amplia variedad de moléculas de ADN exógeno (transgenes, plásmidos, virus y transposones), en cuyo caso el mecanismo de silenciamiento tiene la finalidad de proteger y mantener la integridad del genoma fúngico frente estos ácidos nucleicos invasivos. El mecanismo de ARNi también puede ser desencadenado por pequeños ARNdc endógenos, sintetizados en la propia célula. En este caso el proceso de silenciamiento está implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con diversos procesos como el desarrollo, la diferenciación celular, la adaptación a los cambios ambientales y los procesos de infección (Francisco y Ruiz-Vázquez 2013).

Los componentes enzimáticos centrales del mecanismo de ARNi (Dicer, Argonauta y RdRP) han sido identificados en la mayoría de los taxones de eucariotas, sugiriendo que el ARNi constituye un mecanismo ancestral defensivo o regulatorio, que ya estaría presente en el ancestro común de todos los eucariotas (Cerutti y Casas-Mollano 2006; Shabalina y Koonin 2008). Los hongos filamentosos y las levaduras han sido organismos modelo para el estudio de los componentes y las funciones de estos en los mecanismos de ARNi. Por eso el estudio de estos organismos ha contribuido significativamente al entendimiento de esta estrategia y su cometido biológico. En los hongos filamentosos, los mecanismos de ARNi provocan el silenciamiento génico a nivel post-transcripcional, a través de la destrucción dirigida de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) correspondientes al gen diana (Chicas y col. 2005).

5.3.1. Mecanismo de interferencia mediado por siARN.

Aunque existen algunas variantes, el mecanismo canónico de ARN de interferencia desencadenado por una molécula de ADN exógena transcurre según se describe a continuación.

Uno de los componentes implicados en el mecanismo de ARNi, la helicasa QDE-3, se asocia a las moléculas de ADNdc exógenas que entran a la célula y rompe los puentes de hidrógeno intercatenarios del ADNdc generando moléculas de ADN de cadena sencilla (ADNsc). Estas moléculas son estabilizadas por proteínas RPA (proteína A de replicación). QDE-3 y RPA reclutan a la polimerasa QDE-1. Esta polimerasa tiene una ambivalencia catalítica, pudiendo actuar como una ARN polimerasa dependiente de ADN (DdRP) o como una ARN polimerasa dependiente ARN (RdRP). Esta doble funcionalidad permite a QDE-1 generar un dúplex ADN/ARN (por su actividad DdRP) empleando como molde el ADN exógeno que desencadena el proceso de silenciamiento y a continuación otro dúplex ARN/ARN (mediante su actividad RdRP) (Lee y col. 2010; Dang y col. 2011). Estas moléculas de ARNdc son reconocidas por las células como moléculas aberrantes (Cogoni y Macino 1997; Novina y Sharp 2004) y son unidas por la enzima Dicer (Hannon, 2002).

Dicer es una ribonucleasa citoplásmica de tipo III (ARNasa III), que presenta los siguientes dominios: i) dos motivos ARNasa III, denominados RIIIa y RIIIb; ii) un dominio amino terminal con actividades ATPasa y ARN helicasa y iii) un dominio carboxilo terminal de unión al ARNdc. La ribonucleasa Dicer interactúa con diferentes proteínas colaboradoras para unir las moléculas de ARNdc (Filipowicz y col. 2005) y una

vez que las ha unido, cada uno de los dominios ARNasa de Dicer provoca cortes sobre una de las hebras del ARNdc, a costa de un consumo de ATP. El resultado es la generación de fragmentos ARN bicatenario, de 22-26 nucleótidos de longitud, con extremos 5'-P y 3'-OH, que son los denominados siARNs (Bernstein y col. 2001). El dominio ARNasa RIIIa regula la distancia entre el centro activo de Dicer y el sitio de corte en el ARN, que es lo que hace posible que las moléculas de siARN se generen siempre con una longitud similar.

Las moléculas siARN generadas por Dicer, se incorporan a un complejo multicomponente denominado RISC (las siglas del inglés <u>RNA Induced Silencing Complex</u>), por asociación entre una endonucleasa de la familia argonauta (QDE-2) perteneciente al complejo RISC y la hebra antisentido del siARN (Hammond y col. 2000; Hannon, 2002). La hebra sentido, que no se asocia a la proteína argonauta de RISC, es mellada por la proteína argonauta QDE-2, lo que permite su degradación por acción de la exonucleasa QIP, que es otro de los componentes del complejo RISC (Catalanotto y col. 2002; Maiti y col. 2007). La estabilidad de los pares de bases del extremo 5' de ambas hebras del siARN, determina cuál de ellas es la que se asocia a RISC (aquella con el extremo 5' menos estable, hebra antisentido) y cuál de ellas es destruida (hebra sentido, con el extremo 5' más estable). La unión entre la proteína argonauta y la hebra antisentido del siARN, se produce al introducirse el extremo 5'-P de la hebra en una hendidura de superficie básica de la proteína argonauta, altamente conservada en múltiples proteínas homólogas. En esta hendidura, a través de un catión divalente (como el Mg²⁺), el nucleótido 5' de la hebra antisentido hace contacto con un residuo de tirosina de la proteína argonauta (Ma y col. 2005).

La hebra antisentido asociada a RISC se utiliza para rastrear y unir de forma específica el ARNm con una secuencia complementaria a la de la hebra antisentido. La proteína argonauta provoca cortes en el ARNm diana y los fragmentos generados son destruidos por la maquinaria celular. Cuando RISC se encuentra asociado a la hebra antisentido del siARN, puede participar en repetidos ciclos de degradación específica del ARNm diana, generándose así un silenciamiento de la expresión del gen que codifica el ARNm destruido (Hammond y col. 2000). En algunos casos, después de que Dicer ha procesado el ARNdc original, la hebra antisentido de los siARNs es unida por una QDE-1 (ARN polimerasa dependiente de ARN) con actividad polimerasa 3'-5'. La hebra antisentido se aparea con el ARNm complementario y la RdRP los utiliza como cebador y molde, respectivamente, para sintetizar nuevas moléculas de ARNds. Entonces, Dicer actúa sobre estas nuevas moléculas para generar más fragmentos siARN, amplificándose el efecto de silenciamiento de la expresión génica (Fire y col. 1998; Cogoni y Macino 1999a; Cogoni y Macino 2000; Dalmay y col. 2000).

5.3.2. Inducción del mecanismo de ARNi

La inducción del mecanismo de ARN de interferencia mediada por siARNs, persigue suprimir selectivamente la expresión de un gen concreto, a nivel post-transcripcional, puesto que se destruye el ARNm endógeno (Hannon, 2002). El nivel de reducción de la expresión génica conseguido, será de diferente intensidad, en función de la eficacia del proceso, lográndose desde reducciones parciales en diferente grado (fenotipos *knock down*) hasta reducciones totales (fenotipo *knock out*) de la expresión génica. Esta técnica permite determinar la función fisiológica de la proteína codificada por un gen mediante el estudio del fenotipo causado por la represión de la expresión del gen en cuestión (Harborth y col. 2001; Nakayashiki, 2005).

La estrategia de ARNi proporciona un efecto de silenciamiento génico efectivo y predecible, basado en el reconocimiento base a base entre las moléculas de siARN y del ARNm diana. El silenciamiento mediado por ARNi generalmente no causa cambios en la estructura genómica del gen diana, por lo que es una buena alternativa a la clásica interrupción génica y es muy útil en la caracterización funcional de genes. Existen dos vías principales para inducir el silenciamiento génico mediante ARNi en hongos: i) la expresión de una horquilla a partir de una secuencia repetida invertida en la que ambas repeticiones aparecen separadas por un espaciador intrónico y ii) la expresión de un fragmento codificante de ADN a partir de promotores duales de expresión convergente (Dang y col. 2011).

En *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* se desarrolló y optimizó la técnica de silenciamiento mediante ARNi a través de la vía de los promotores duales como alternativa a la interrupción génica clásica (Ullán y col. 2008b), debido a que ésta mostraba un porcentaje de ineficiencia relativamente elevado a causa de la baja tasa de recombinación homóloga exhibida por estos hongos filamentosos (Romano y Macino 1992; van West y col. 1999; Liu y col. 2002; Kadotani y col. 2003; Fitzgerald y col. 2004; Mouyna y col. 2004). La puesta a punto de esta técnica resultaba factible en vista de que muchos hongos filamentosos presentan la información genética codificante de la maquinaria implicada en el proceso de silenciamiento génico, dada la conservación del mecanismo en la mayoría de los eucariotas.

Objetivos y metodología ------



Capítulo 2 Publicaciones originales

Imagen portada Capítulo 2: Matraces lisos conteniendo medio liquido MPPY recién inoculado con esporas frescas de diferentes de cepas derivadas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 para la obtención de los micelios fúngicos correspondientes. Observar la característica coloración verde del contenido de los matraces proporcionada por las esporas.

De acuerdo a la normativa vigente para la presentación de Tesis Doctorales por *Compendio de Publicaciones*, a continuación se presentan en esta memoria, como parte de la misma, tres artículos originales en inglés, junto con el material suplementario de cada uno, según han sido aceptados y publicados en la correspondiente revista especializada.

Publicaciones originales ------

Una proteína vacuolar afecta drásticamente a la biosíntesis del tripéptido ACV y a la ruta de biosíntesis de betalactamas en *Penicillium chrysogenum.*

(A vacuolar membrane protein affects drastically the biosinthesis of the ACV tripeptide and the betalactam pathway of *Penicillium chrysogenum*. (2013). Applied Microbiology and Biotechnology.97(2):795-808.

Autores: Marta Fernández Aguado, Fernando Teijeira Romón, Juan Francisco Martín, Ricardo Vicente Ullán. Publicaciones originales —

_

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY

A vacuolar membrane protein affects drastically the biosynthesis of the ACV tripeptide and the beta-lactam pathway of *Penicillium chrysogenum*

Marta Fernández-Aguado • Fernando Teijeira • Juan F. Martín • Ricardo V. Ullán

Received: 4 April 2012 / Revised: 15 June 2012 / Accepted: 19 June 2012 © Springer-Verlag 2012

Abstract The knowledge about enzymes' compartmentalization and transport processes involved in the penicillin biosynthesis in Penicillium chrysogenum is very limited. The genome of this fungus contains multiple genes encoding transporter proteins, but very little is known about them. A bioinformatic search was made to find major facilitator supefamily (MFS) membrane proteins related to CefP transporter protein involved in the entry of isopenicillin N to the peroxisome in Acremonium chrvsogenum. No strict homologue of CefP was observed in P. chrysogenum, but the penV gene was found to encode a membrane protein that contained 10 clear transmembrane spanners and two other motifs COG5594 and DUF221, typical of membrane proteins. RNAi-mediated silencing of penV gene provoked a drastic reduction of the production of the δ -(L- α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine) (ACV) and isopenicillin N intermediates and the final product of the pathway. RT-PCR and northern blot analyses confirmed a reduction in the expression levels of the *pcbC* and *penDE* biosynthetic genes, whereas that of the *pcbAB* gene increased. Localization studies by fluorescent laser scanning microscopy using

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-012-4256-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Teijeira · R. V. Ullán (⊠)
Institute of Biotechnology of León (INBIOTEC),
Av. Real s/n,
24006 León, Spain
e-mail: rvicu@unileon.es

M. Fernández-Aguado · J. F. Martín Area of Microbiology, Department of Molecular Biology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain Dsred and GFP fluorescent fusion proteins and the FM 4-64 fluorescent dye showed clearly that the protein was located in the vacuolar membrane. These results indicate that PenV participates in the first stage of the beta-lactam biosynthesis (i.e., the formation of the ACV tripeptide), probably taking part in the supply of amino acids from the vacuolar lumen to the vacuole-anchored ACV synthetase. This is in agreement with several reports on the localization of the ACV synthetase and provides increased evidence for a compartmentalized storage of precursor amino acids for non-ribosomal peptides. PenV is the first MFS transporter of *P. chrysogenum* linked to the beta-lactam biosynthesis that has been located in the vacuolar membrane.

Keywords *Penicillium chrysogenum* · Penicillin biosynthetic pathway · MFS transporter · Vacuolar membrane protein

Introduction

Penicillium chrysogenum is a filamentous fungus widely used for the production of benzylpenicillin (Aharonowitz et al. 1992; Demain and Elander 1999) and also for foodrelated enzymatic processes (Jami et al. 2010b). The interest in strain improvement has led to a good knowledge of the biochemistry of the penicillin biosynthetic pathway (Martín et al. 2010). However, there are still obscure points concerning the compartmentalization of precursors and intermediates of the pathway (Evers et al. 2004; Martín et al. 2012). In recent years, considerable progress has been made at the molecular genetics level (Fierro et al. 1995, 2006), including the elucidation of the full genome sequence (van den Berg et al. 2008) and the proteome map of the soluble protein fraction (Jami et al. 2010a). The genes and enzymes involved in penicillin biosynthesis have been studied in detail (Ramos et al. 1985; Carr et al. 1986; Barredo et al. 1989a, b, c; Díez et al. 1990; Roach et al. 1995, 1997). P. chrysogenum, Penicillium nalgiovense, Penicillium griseofulvum, Aspergillus nidulans (Emericella nidulans), and Aspergillus oryzae (Laich et al. 1999, 2002) contain three clustered genes responsible for the main reactions of the penicillin biosynthesis: (1) pcbAB, which encodes the δ -(L- α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine) (ACV) synthetase that catalyzes the non-ribosomal activation and condensation of the three constituent amino acids to form the tripeptide ACV (Díez et al. 1990; Smith et al. 1990); (2) pcbC, encoding the isopenicillin N (IPN) synthetase involved in the oxidative cyclization of the ACV tripeptide (Ramos et al. 1985) in order to form a bicyclic structure known as the penam nucleus; and (3) penDE, coding for the IPN-acyltransferase that catalyzes the transference of the lateral chain from phenylacetic acid to the penam nucleus to finally form benzylpenicillin (PenG) (Álvarez et al. 1987).

The additional, but necessary, reaction of the activation of the lateral chain (Lamas-Maceiras et al. 2006; Wang et al. 2007; Koetsier et al. 2009; Yu et al. 2011) has also been characterized, but surprisingly, the availability and possible compartmentalization of the precursors L-valine and L-cysteine received less attention. L- α -Aminoadipic acid is known to be formed through the initial steps of the lysine biosynthetic pathway (Bañuelos et al. 1999; Casqueiro et al. 1999).

Another complexity level in the penicillin pathway arose when the compartmentalization of the penicillin biosynthetic pathway was evidenced (Müller et al. 1991, 1992; van de Kamp et al. 1999; Evers et al. 2004; Martín et al. 2010). The discussions about the localization of the ACV synthetase have been maintained for many years. Kurylowicz et al. (1987) proposed that it was located in Golgi-derived organelles, and Lendenfeld et al. (1993) reported that it was located within or associated to the vacuolar membrane. Later, van der Lende et al. (2002) proposed that this enzyme is cytosolic. A report in the cyclosporine synthetase (another large NRPS) clearly shows that it is associated with the external side (cytoplasmic) of vacuoles (Hoppert et al. 2001). This appears to be related to the use of amino acids from vacuoles, which are well known to store some type of amino acids. It is now recognized that the synthesis of ACV and IPN takes place in the cytosol (Müller et al. 1991; van der Lende et al. 2002), whereas the final benzylpenicillin is formed inside peroxisomes (Müller et al. 1991, 1992; van de Kamp et al. 1999; Evers et al. 2004; Meijer et al. 2010). For this reason, transport processes are necessary in order to introduce precursors into these organelles, to keep the intermediates within them (as a mean to optimize their further use in the pathway) and to export the final product, benzylpenicillin (Martín et al. 2010). In most cases, these movements are mediated by transmembrane transporter proteins, since the passive diffusion of polar compounds is unlikely in fungi given the characteristics of low permeability and rigidity of their membranes (van de Kamp et al. 1999; Evers et al. 2004; Martín et al. 2005, 2010).

In recent years, our group has described three transporter proteins related to the beta-lactam biosynthesis in the fungus *Acremonium chrysogenum*, which has contributed to a better understanding of the cephalosporin route. These transporters are CefT (Ullán et al. 2002), CefM (Teijeira et al. 2009), and CefP (Ullán et al. 2010), all of which are members of the proton gradient-driven major facilitator supefamily (MFS). These proteins and the AtrD protein described in *A. nidulans* (Andrade et al. 2000) constitute the only described examples of proteins involved in beta-lactam secretion in filamentous fungi, but probably other proteins with related functions still remain uncharacterized.

The vacuoles are simple membrane organelles which store basic amino acids, polyphosphates, sulfate, and ions like calcium (Klionsky et al. 1990). They have many different functions including the detoxification of harmful compounds, protein degradation, and ionic homeostasis (Cole et al. 1998). In *P. chrysogenum*, vacuoles change their size and number depending on the developmental state of the fungus (Paul and Thomas 1996). The putative role of the vacuoles in the benzylpenicillin biosynthesis is to supply precursor amino acids to the ACV synthetase (Lendenfeld et al. 1993). Honlinger and Kubicek (1989) described that the α -aminoadipate formed in the mitochondria or in the cytosol is sequestered into vacuoles.

To extend the knowledge of cellular localization of the penicillin pathway, a deeper study of the transporters involved is required. It is very important to know how precursors and intermediates are translocated and the final products secreted; this information will be useful to improve the production of beta-lactams in ways unexplored until now (van de Kamp et al. 1999; Evers et al. 2004; Martín et al. 2010). In this article, we describe for the first time a gene (*penV*) that encodes a vacuolar membrane protein which affects clearly ACV biosynthesis and, therefore, penicillin production.

Materials and methods

Strains and media

P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089/DSM 1075), a low penicillin production strain (800 mg/l in CP medium) which contains a single copy of the penicillin gene

cluster (Fierro et al. 1995; Cantoral et al. 1987) and transformants derived from it, was used in this study. The selection of the transformants, containing the plasmid carrying the *ble* marker, was made in Czapek minimal medium (30 g/ 1 sucrose, 2 g/l NaNO₃, 0.5 g/l K₂HPO₄, 0.5 g/ 1 MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/l FeSO₄) supplemented with 30 μ g/ml of phleomycin.

P. chrysogenum liquid cultures were initiated by inoculating fresh spores from a complex Power medium plate (Casqueiro et al. 1999) into either defined inoculum medium or complex inoculum medium. After incubations at 25 °C for 24 h in an orbital shaker (250 rpm), aliquots were inoculated either in defined production (DP) medium or complex production (CP) medium (Ullán et al. 2008a, b). Samples were taken every 24 h, and penicillin production was determined by bioassays against *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and confirmed by HPLC analyses as described previously (Ullán et al. 2008a, b).

DNA isolation and southern blotting

Genomic DNA from all the *P. chrysogenum* strains was isolated from mycelium grown in MPPY medium following the protocol described by Casqueiro et al. (1999). Samples $(2-4 \mu g)$ of *P. chrysogenum* genomic DNA were digested with appropriate endonucleases and separated in 0.7 % agarose gels. The gels were blotted onto Hybond-NX membranes (Amersham Biosciences) and hybridized with different probes (see "Results") as described before (Ullán et al. 2007).

Plasmid constructions

ppenV-RNAi A 443-bp exonic fragment of *penV* (from nucleotides 1,033 to 1,476) was amplified by PCR using as template genomic DNA of *P. chrysogenum* and as primers oligonucleotides SilP4-F (5'-CCATG<u>CCATGGG</u>-CAGTGCGGACGATGAGC-3') and SilP4-R (5'-CCATG<u>CCATGGAGGGAGGGAGGAGGACCAAGAGAA</u> CAG-3') (sequences corresponding to the *NcoI* restriction sites are underlined). The 443-bp PCR product was cloned into the *NcoI* site of pL43RNAi vector (Ullán et al. 2008a). This plasmid was designed to silence the *penV* gene.

pSpenV This plasmid was constructed to increase the expression of the penV gene. It contains the penV gene under control of the strong fungal promoter of the gdh (glutamate dehydrogenase) gene of *Aspergillus awamori* (Cardoza et al. 1998) and the transcriptional terminator of the cycl (cytochrome c1) gene of *Saccharomyces cerevisiae* (Russo et al. 1991). The 2.6-kb penV gene was amplified by PCR using genomic DNA of *P. chrysogenum* and oligonucleotides ST3-P4-F (5'-CGCGGATCCATGTCTCTCCGGCAT

CAGC-3') and ST3-P4-R (5'-ACACAA<u>CCCCGGG</u>AAAT CAAAC-3') as primers (sequences corresponding to the *Bam*HI and *Sma*I restriction sites are underlined). The 2.6kb PCR product was cloned in the *BgI*II–*Stu*I sites of pIBRC43BgIII plasmid (Kosalkova et al. 2009).

ppenV-DsRed The fused penV-DsRed gene was made by inserting a 2.6-kb BamHI-SmaI DNA fragment, obtained by PCR using oligonucleotides ST3-P4-F and T3-P4-DSRED-R (5'-TCCCCCGGGAACATTCTGTGTCTGAT GAA-3') as primers (sequence corresponding to the SmaI restriction site are underlined) and genomic DNA of the parental strain as template, into the BglII-SmaI sites of pExpDsRed (Ullán et al. 2010), which carries the DsRed gene from Discosoma sp. (Clontech). The T3-P4-DSRED-R primer allows the generation of a version of *penV* which lacks its stop translation signal, which permits the transcriptional fusion of *penV* and *DsRed* genes. In this way, the definitive ppenV-DsRed carries the version of penV fused in frame with dsred gene. Both genes appear under the control of the gdh promoter of A. awamori (Cardoza et al. 1998) and the cycl terminator of S. cerevisiae (Russo et al. 1991). The expression of this cassette generates the chimeric hybrid red fluorescent protein PenV-DsRed.

RNA extraction and northern blot and RT-PCR analyses

Total RNA from P. chrysogenum was isolated from mycelium grown in CP medium for 48 h. Total P. chrysogenum RNA extraction and northern blotting hybridization were carried out as described previously (Ullán et al. 2007). For hybridizations, the following probes were used: (1) a 443-bp NcoI DNA exonic fragment of penV gene; (2) a 538-bp DNA fragment of *penDE* gene obtained by PCR using oligonucleotides RT/penDE-F (5'-CGGCTACGAA CATGGCTCTGC-3') and RT/penDE-R (5'-TTATGAATTT GATGGTGGGAAGTC-3') as primers and genomic DNA of the parental strain as template; and (3) a 526-bp DNA fragment of actA gene obtained by PCR using the oligonucleotides RT/actA-F (5'-CTGGCCGTGATCTGACCGAC TAC-3') and RT/actA-R (5'-GGGGGGGGGGGGGGTGATCTT GACCT-3') and genomic DNA of the parental strain as template.

For RT-PCR analysis, 6 µg of total RNA isolated from the transformants and the Wisconsin 54-1255 strain were treated with 10 U of RNase-free DNase (RQ1, Promega) for 30 min at 37 °C according to the manufacturer's protocol. Semiquantitative RT-PCR experiments were carried out using 200 ng of DNase-treated RNA with the oligonucleotides RT/actA-F and RT/actA-R (designed to amplify 456 bp from the *actA* coding sequence); RT/pcbAB-F (5'-AACT CACGCCGCACCGCTTCATT-3') and RT/pcbAB-R (5'- CCGCCTTCCCGTTCACATTCACTG-3') (designed to amplify 426 bp from the pcbAB coding sequence); RT/ pcbC-F (5'-GTGGCCGGACGAGAAGAAGCATC-3') and RT/pcbC-R (5'-TGGGAGCGGGGGTAGTAGTTGTTGG-3') (designed to amplify 422 bp from the pcbC coding sequence); RT/penDE-F and RT/penDE-R (designed to amplify 399 bp from the penDE coding sequence); and RT/ penV-F (5'-GCACGCACGCCACGGGAATA-3') and RT/ (designed to amplify 464 bp from the penV coding sequence) following the manufacturer's instructions of the "SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq" system (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). The signals provided by the RT-PCR assays were quantified by densitometry using the Gel-Pro Analyzer 3.1 program (Media Cybernetics) and normalized with values obtained from the actA as described previously (Ullán et al. 2008a).

P. chrysogenum transformation

The transformation of *P. chrysogenum* protoplasts was performed as described previously (Ullán et al. 2007). Transformants were selected in solid Czapek minimal medium supplemented with sorbitol (1 M) as osmotic stabilizer and phleomycin (30 μ g/ml) as the selection agent.

HPLC determination of IPN and PenG

The concentrations of IPN and PenG in *P. chrysogenum* strains were determined by HPLC as described previously by Ullán et al. (2008a).

Thin layer chromatography (TLC) determination of ACV

The samples of *P. chrysogenum* culture broths were taken after 72 h of growth in CP medium and were filtered and concentrated 5- and 10-fold using a lyophilizer. The original broth and the concentrated samples were charged (2 μ l) on a TLC plate. The chromatography was developed using an Nbutanol–acetic acid–water (2:1:1) mobile phase. The plate was dried and revealed using a solution of ninhydrine in 0.2 % acetone (*w*/*v*). Solutions of pure ACV and bis-ACV (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich) were used as controls.

Determination of intracellular beta-lactam intermediates

Mycelia from *P. chrysogenum* cultures in CP medium were collected after 72 h, washed with 0.9 % NaCl, frozen, and then disrupted by grinding them in a mortar with liquid nitrogen. Cell extracts were suspended in 10 mM Tris–HCl pH 7 and centrifuged at 13,200 rpm for 5 min at 4 °C. The accompanying proteins were precipitated by adding 1 volume of cool methanol and centrifuged at 13,200 rpm for

10 min at 4 °C. Then, the supernatant was collected and the methanol removed under reduced pressure conditions using a Speed Vac concentrator. Penicillin G and isopenicillin N were extracted with ethyl-acetate. Benzylpenicillin is soluble in the organic phase while IPN is soluble in the aqueous phase. The concentration of each antibiotic was determined by HPLC.

Fluorescence microscopy

For confocal laser scanning microscopy studies, the *P. chrysogenum* strains were grown in complex culture medium (CCM) (Minuth et al. 1982). For this purpose, *P. chrysogenum* liquid cultures were initiated by inoculating fresh spores from a complex power medium plate into CCM medium. After incubations at 27 °C for 24 h in an orbital shaker (180 rpm), aliquots [0.05 % (w/v)] were inoculated in the same medium. Samples were taken after 36 h and the fluorescence observed using a Laser Confocal Microscope ECLIPSE TE2000-U C1 (Nikon). Green fluorescent protein (GFP) was visualized with a filter CH2 (488 nm; 590/ 50 nm), whereas Red fluorescent protein (DsRed) and the FM 4-64 staining were observed with a filter CH3 (543 nm; 650/LP). The images obtained were processed using the Nikon EZ-C1 3.6 software.

FM 4-64 dye staining

Staining with the lipophilic dye FM 4-64 was done by growing the strains under the same conditions described above and then mixing a sample with the dye at a final concentration of 8 μ M, followed by 30 min of incubation under the same conditions used for growth. Excess dye was eliminated by washing the cells twice with CCM medium. Samples were suspended in 2 ml of CCM medium and visualized using a microscope.

Results

Identification and characterization of a novel *P. chrysogenum* membrane protein of the MFS family

In order to clarify the role of organelles involved in penicillin biosynthesis and secretion, a search of genes encoding membrane proteins related to the MFS protein CefP (an *A. chrysogenum* transporter which translocates IPN from the cytosol to the peroxisomal lumen) (Ullán et al. 2010) was made in the *P chrysogenum* genome. Five MFS membrane proteins were found with a percentage identity with CefP between 13.5 and 39.3 %. None of them gave a high identity indicating that a peroxisomal transport protein homologous to CefP is absent in *P. chrysogenum*. The protein which showed the highest percentage identity, CAP99503, was studied in detail. This protein has 832 amino acid residues and a deduced molecular mass of 91.2 kDa. The CAP99503 protein shows a high percentage identity throughout its entire sequence with other membrane proteins of Aspergillus clavatus (XP 001269921) (79.5 % identical amino acids; 90.5 % similar amino acids), Aspergillus niger (XP 001389037) (73.8 %; 90.2 %), Aspergillus fumigatus (XP 749963) (72.7 %; 89.4 %), A. oryzae (XP 001817894) (72.1 %; 89.8 %), and Penicillium marneffei (XP 002143747) (62.7 %; 85.9 %) (Electronic Supplementary Material, Fig. S1). These are putative membrane proteins but their function in these fungi has not been defined yet. The ORF Pc22g22150 encoding the protein CAP99503 is located in the supercontig 22 (van den Berg et al. 2008) and surrounded by ORFs that are not functionally related to it. This ORF is not located in the DNA region containing the penicillin biosynthetic cluster (Fierro et al. 2006; van den Berg et al. 2007).

The topology of the protein was analyzed using five different computer programs [TopPred2 (http://bioweb.pasteur.fr/ seqanal/interfaces/toppred.html), SOSUI (http://bp.nuap.na goya-u.ac.jp/sosui/sosui submit.html), TMHMM (http:// www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), HMMTOP (http:// www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html), and TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED form.html)]. The protein, CAP99503, contains from 10 to 12 transmembrane spanners (TMSs). The bioinformatic tool Pfam ("Protein families" database of alignments; http:// www.sanger.ac.uk/Pfam) assigned to protein CAP99503 two motifs typical of membrane proteins: COG5594 (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=35153; amino acids 38 to 748) characteristic of integral membrane proteins and DUF221 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam02714&seltype=1; http://pfam.sanger.ac.uk/family/DUF221; amino acids 377 to 707) which is found in membrane proteins with an unknown function.

Silencing of ORF Pc22g22150

In order to study the role of ORF Pc22g22150 (renamed *penV*; see below) in relation to the penicillin biosynthesis, the expression of this gene was silenced using small interference RNAs, a technique that has been successfully used in *P. chrysogenum* and *A. chrysogenum* as an alternative to targeted inactivation of genes in these filamentous fungi (Ullán et al. 2008a; Kosalkova et al. 2009; García-Estrada et al. 2011). This technique is more suitable than targeted inactivation for those genes that have a crippling effect on growth. In fact, targeted gene disruption of *penV* gene was lethal in repeated experiments in *P. chrysogenum* (data not shown), but its silencing was satisfactory. For the silencing

strategy, ppenV-RNAi vector was constructed (see "Materials and methods" section) (Fig. 1a, b), and transformants of P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 were selected by their resistance to phleomycin. The correct integration of the PgpdApenVexonic fragment-PpcbC silencing cassette (Fig. 1b) was analyzed by Southern blot hybridization in 10 transformants and the parental strain (negative control). These 10 transformants showed different degrees of penicillin production reduction. Genomic DNA of the transformants and the parental strain were digested with a PvuI-EcoRV mixture and hybridized with a 443-bp exonic fragment of penVas probe (Fig. 1a). Results showed a 5.0-kb hybridization band corresponding to the endogenous gene in all transformants (Fig. 1c, lanes 1-11), which indicates that the endogenous penV gene remains intact. Several transformants showed an additional band of 2.3 kb corresponding to the correct integration of the silencing cassette in their genome without any reorganization (Fig. 1c, lanes 1, 3, 9, and 10). In some transformants, additional bands were observed probably originated by ectopic integrations of the ppenV-RNAi vector in the genome (Fig. 1c, lanes 5 and 6). Three transformants, TAT-1 (lane 1), TAT-65 (lane 9), and TAT-69 (lane 10), were selected at random to continue the following analyses.

The penV gene is silenced in TAT-1 transformant

The silencing of the *penV* gene expression was analyzed by RT-PCR and northern blot hybridization using total RNA extracted at 48 h from the TAT-1, TAT-65, and TAT-69 transformants and the Wisconsin 54-1255 strain. The expression level of P. chrysogenum actA gene was used as control in both analyses. Results showed a poor expression of *penV* even in the parental strain and an effective silencing mechanism in the transformant TAT-1, but not in the rest of the strains tested. Northern blot hybridization results showed a significant reduction (65 %) in the expression level of penV in TAT-1 (Fig. 2a, b) with respect to the parental strain. Similar results were obtained by RT-PCR analysis with a clear reduction of 70 % in the penV expression level in TAT-1 transformant (Fig. 2d, e). The other two transformants TAT-65 and TAT-69 did not show attenuation of penV. Non-silenced transformants are useful as control of the lack of effect of the transformation procedure.

To confirm a possible connection between the silencing of penV and the reduction of the penicillin production, the expression level of the biosynthetic genes in the transformants and the parental strain was analyzed using northern blot hybridization and RT-PCR. In the TAT-1 silenced strain, northern studies revealed a 50 % reduction of the expression of penDE (Fig. 2a, c). Interestingly, the RT-PCR analysis indicated that pcbAB expression level was increased in the TAT-1 transformant in comparison with the parental strain (Fig. 2d, f), whereas the expression of the second (pcbC) Fig. 1 Silencing strategy for the Pc22g22150 ORF (penV) gene in P. chrysogenum and molecular analysis of the transformants. a Map of the 5.0-kb genomic fragment containing the Pc22g22150 ORF (penV) showing the 443bp exonic DNA fragment used as a probe. **b** Physical map of the ppenV-RNAi plasmid which bears the silencing cassette PgpdA-penV (exonic fragment)-PpcbC. c Southern blot hybridizations of PvuI + EcoRV-digested genomic DNA from several transformants with an internal probe to the penVgene. Lane M, size markers (Lambda DNA/HindIIIdigested); lane 1, transformant TAT-1; 2, TAT-14; 3, TAT-16; 4, TAT-18; 5, TAT-19; 6, TAT-60; 7, TAT-62; 8, TAT-64; 9, TAT-65; 10, TAT-69; and 11, P. chrysogenum Wisconsin 54-1255. Note that the full integration of the silencing cassette (2.3 kb) is achieved with transformants TAT-1, TAT-16, TAT-60, TAT-65, and TAT-69



and third (*penDE*) biosynthetic genes decreased by 60 % (Fig. 2d, g) and 50 % (Fig. 2d, h), respectively. These results indicate that the expression of the three penicillin biosynthetic genes is differently affected by the *penV* gene silencing (see "Discussion").

The penV silenced mutant showed a drastic reduction in beta-lactam production

P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 (parental strain) and the derived transformants (TAT-1, TAT-65, and TAT-69) were cultured under PenG production conditions in defined DP and complex CP mediums. The results of the fermentations in DP medium showed a slightly delayed growth of the TAT-1 strain which did not show the characteristic lysis phase of the parental strain after 72 h (Fig. 3a). The growth rate of the *penV* TAT-1 silenced transformant in CP medium is slightly higher than that of the parental strain and the other transformants along all the fermentation (Fig. 3b). The penicillin production was determined by two different methods:

bioassays and HPLC. The bioassays of penicillin showed that the specific PenG biosynthesis in the silenced strain was drastically reduced (approx. a reduction of 83 % in the production of PenG by the transformant TAT-1 compared with the parental strain) in both penicillin production media (Fig. 3c, d). The good TAT-1 growth rate in CP medium excludes any indirect growth effect on penicillin production. TAT-65 (poorly silenced) and TAT-69 (non-silenced) transformants showed a similar growth and PenG production rate to that of the parental strain in both culture media (Fig. 3). Also, the analysis by HPLC (that excludes any other compound interfering in the bioassay procedure) of TAT-1 culture broths showed 83 and 74 % reduction in the specific production of PenG in DP (Fig. 4a, c) and CP (Fig. 4b, d) media, respectively, in comparison with the parental strain. In addition, there was a clear reduction of the intermediate IPN (Fig. 4e) in the TAT-1 transformant in comparison with the parental strain, when grown in CP medium. The IPN and PenG intracellular levels in the transformant TAT-1 were also reduced (IPN 54 % and PenG 77 %), suggesting that


Fig. 2 Northern blot and RT-PCR analyses showing the expression of the *penV* gene and the penicillin biosynthetic genes in *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 and its transformants TAT-1, TAT-65, and TAT-69. **a** Northern hybridization of total RNA of *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (WIS-54), TAT-1, TAT-65, and TAT-69 with DNA probes of the *actA* (encoding the γ -actin), *penDE*, and *penV* genes. Transcript levels of the *penV* (**b**) and *penDE* (**c**) genes quantified by northern hybridization. **d** Expression of the *penV*, *pcbAB*, *pcbC*, and *penDE* genes was tested by semiquantitave RT-PCR carried out with total RNA of the TAT-1, TAT-65, and TAT-69 transformants and Wisconsin

54-1255 (WIS-54) strain. Assessment of RT-PCR products after electrophoresis in 0.8 % agarose gels of pcbAB (e), pcbC (f), penDE (g), and penV (h) genes of *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (WIS-54), TAT-1, TAT-65, and TAT-69. The quantification of the gene expression levels of both northern hybridization and semiquantitave RT-PCR analysis was done by measuring the integral optic density (IOD) using the Gel-Pro Analyzer 3.1 program (Media Cybernetics) and normalized with values obtained from the *actA*. Note that RNAs were extracted after 48 h of culture in CP medium

the effect is exerted on the early steps of the pathway (Electronic Supplementary Material, Fig. S2).

To analyze the ACV production in the silenced transformant TAT-1, the CP culture broth was tested by TLC as described in "Materials and methods." Results showed a drastic reduction in the content of ACV and bis-ACV (Fig. 4f, lanes 1–3) in the TAT-1 transformant in comparison with the parental strain (Fig. 4f, lanes 4–6). These results suggest that the primary site of action of PenV is related to the ACV synthesis and that it affects the expression of other penicillin biosynthetic genes, probably by reducing an inducer level. Other minority tri- and tetrapeptides supposedly formed by the ACV synthetase due to its low substrate specificity (Martín 2000) also decreased in parallel to ACV in the TAT-1 transformant.

Overexpression of the *penV* gene does not modify the penicillin production

The effect of penV overexpression on penicillin formation was examined using the pSpenV plasmid (see "Materials and methods") which contains the penV gene under the Fig. 3 Growth kinetics and specific PenG production of untransformed*P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 and its transformants. Growth kinetics in DP (a) and CP (b) media. Specific PenG (measured by bioassay) production in DP (c) and CP (d) media. The *error bars* indicate the standard deviations of data from three independent cultures



control of the strong *A. awamori gdh* gene promoter (Fig. 5a). This plasmid was cotransformed together with the helper plasmid pJL43 (which carries the phleomycin resistance cassette for transformant selection (Gutiérrez et al. 1997) into *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 strain. The integration of the *penV* overexpression cassette (Pgdh–*penV*–Tcyc1) in the phleomycin-resistant transformants was checked by Southern hybridization (Fig. 5b).

Hybridization results revealed the presence of two positive transformants: TSV-118 (Fig. 5b, lane 9) and TSV-125 (Fig. 5b, lane 8), which showed a 2.4-kb band that contained the full Pgdh–*penV*–Tcyc1 integrative cassette, in addition to the band containing the endogenous *penV* gene (8.0 kb). The number of intact additional copies of the Pgdh–*penV*– Tcyc1 integrative cassette in both TSV-118 and TSV-125 transformants was estimated by comparing the intensity of the 8.0-kb genomic hybridization band (present as a single copy) with that of the 4.3-kb band (Fig. 5b) using a scanner (Hewlett-Packard) connected to Gel-Pro Analyzer 3.1 software (Media Cybernetics). This analysis revealed the presence of a single copy of the penV overexpression cassette in TSV-118 and between two and three copies in TSV-125. The result of the fermentations in CP medium showed (Fig. 5c, d) that in the multicopy transformant TSV-125, the effect over the penicillin production was equivalent to that observed with the silencing strategy, as a result of a probable quelling phenomenon described previously in other processes of gene overexpression in filamentous fungi (Ullán et al. 2004). This phenomenon is a posttranscriptional mechanism of gene silencing initially discovered in the filamentous fungus Neurospora crassa (Romano and Macino 1992). Quelling was identified as a result of the transformation with transgenes which, instead of enhancing gene expression by increasing the gene dosage, caused the silencing of the duplicated genes by a reduction of mRNA homologous to the introduced transgenes. Nevertheless, in the TSV-118 transformant, the PenG production did not increase with respect to the untransformed strain, indicating that PenV

Fig. 4 PenG, IPN, and ACV production in the *penV* silenced transformant TAT-1. PenG production measured by HPLC in DP (a) and CP media (b). Superposition of chromatograms from the culture broths of the parental strain (solid line) and the transformant TAT-1 (discontinuous line) in DP (c) and CP (d) media. e IPN production measured by HPLC in CP medium. f ACV/Bis-ACV levels in the culture broths of TAT-1 and the parental strain measured by TLC. Lane 1, non-concentrated sample of TAT-1 broth; 2, culture broth of TAT-1 $(5\times)$; 3, culture broth of TAT-1 (10×); 4, nonconcentrated sample of Wisconsin 54-1255 (WIS-54) broth; 5, culture broth of WIS-54 (5×); and 6, culture broth of WIS-54 (10 \times). The controls for ACV and bis-ACV (Sigma-Aldrich) are shown on the right lanes. Note that in the standard of ACV, a small part of the ACV has been oxidized to bis-ACV



Fig. 5 Overexpression of the penV gene in P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 showing the specific PenG production in the parental strain and the penVoverexpressing transformants TSV-118 and TSV-125. a Plasmid pSpenV showing the 3.7-kb band that corresponds to the overexpressing Pgdh-penV-Tcyc1 cassette. b Southern blot hybridizations of KpnI + SmaIdigested genomic DNA from several transformants with an internal probe to the penV gene. Lane M. size markers (Lambda DNA/HindIII-digested); lane 1, transformant TSV-1; 2, TSV-10; 3, TSV-24; 4, TSV-55; 5, TSV-60; 6, TSV-74; 7, TSV-110; 8, TSV-118; 9, TSV-125; and 10, P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 (WIS-54). c PenG specific production of the WIS-54 strain and the growth of penV-overexpressed transformants (TSV-118 and TSV-125) in CP medium and measured by bioassay (c) and HPLC (d). Error bars indicate the standard deviation of three determinations made from three independent cultures



content in the parental strain is not limiting for penicillin biosynthesis.

The PenV protein is located in the vacuolar membrane

The subcellular location of PenV protein was studied in vivo using DsRed fluorescent protein from Discosoma sp. (Clonetech) as reporter. For this purpose, protoplasts of the parental strain P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 were cotransformed with the integrative plasmids ppenV-DsRed (carrying the expression cassette for the hybrid fluorescent protein PenV-DsRed; Electronic Supplementary Material, Fig. S3A) and p43-EGFP-SKL (containing the cassettes for the peroxisome-targeted green fluorescent protein EGFP-SKL and for phleomycin resistance) (Ullán et al. 2010). Positive transformants were selected by their phleomycin resistance, and eight transformants were selected randomly in order to analyze the integration of the PgdhpenV-DsRed-Tcyc1 cassette in the genome. Total DNA was extracted and the correct integration of the cassette was tested by PCR analysis using PgdhF (5'-GGACTCCC TAATGGATTCCGAG-3') and TcycR (5'-GAAAAGGGG GACGGATCTCCTCCG-3') as oligonucleotides (Electronic Supplementary Material, Fig. S3A). Results showed that two transformants, TVRed-15 (Electronic Supplementary Material, Fig. S3B, lane 2) and TVRed-39 (Electronic Supplementary Material, Fig. S3B, lane 5), had a 4.3-kb band corresponding to the correct integration of the cassette of interest (Electronic Supplementary Material, Fig. S3B, lane 10). The PCR product was completely sequenced confirming this correct integration in both TVRed-15 and TVRed-39 strains.

The positive transformant TVRed-39 and the parental strain were analyzed by fluorescent laser scanning microscopy (Fig. 6). Images obtained revealed that PenV is not located in peroxisomes since the red fluorescence (coming from PenV-DsRed protein) (Fig. 6b) and the green fluorescence (coming from the peroxisomal EGFP-SKL protein) (Fig. 6c) were not coincident (Fig. 6d). The hybrid fluorescent protein PenV-DsRed is distributed along the membrane of large organelles, apparently vacuoles (Fig. 6b). To confirm the subcellular location of PenV, samples of the parental strain were treated with the lipophilic red fluorescent dye FM 4-64, previously used to mark successfully the vacuolar membrane in living cells (Fischer-Parton et al. 2000). Fluorescence images showing FM 4-64 location in the vacuolar membrane (Fig. 6f) were very similar to those of vacuoles reported by Nijland et al. (2008).

Fig. 6 Subcellular location of PenV protein by scanning confocal fluorescent microscopy. Hyphae of the P. chrysogenum TVRed-39 strain obtained from cultures grown for 72 h in CCM medium were observed by phase-contrast microscopy and confocal laserscanning fluorescence microscopy. Phase-contrast image (a). Fluorescence images showing PenV-DsRed localization in the vacuolar membrane (b) and EGFP-SKL localization in the peroxisomal matrix (c). Merged images (phase-contrast and fluorescence images) of both fluorescent proteins (d). Phasecontrast image of P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 (e). Membrane vacuoles of the parental strain stained with the lipophilic dye FM 4-64 (f)



Taken together, all these results indicate that PenV is a vacuolar membrane protein directly or indirectly related to penicillin biosynthesis. For this reason, the protein was named PenV (for penicillin and vacuolar membrane protein).

Discussion

The biosynthesis of benzylpenicillin is a process compartmentalized in peroxisomes (Müller et al. 1991, 1992), and the origin of some amino acid precursors is reported to be the vacuoles (Lendenfeld et al. 1993). The compartmentalization is an advantageous feature because it makes possible the establishment of different microenvironments with optimum conditions for enzymatic reactions with dissimilar requirements inside the same cell (Müller et al. 1991, 1992; van de Kamp et al. 1999; Evers et al. 2004; Meijer et al. 2010; Martín et al. 2012).

The results of this work indicate that PenV drastically affects penicillin biosynthesis. PenV is a member of the proton gradient-driven MFS transporter family which contains 10–12 TMSs and two motifs, COG5594 and DUF221, characteristic of membrane proteins.

The results of fluorescent microscopy with PenV-DsRed and EGFP-SKL proteins indicate that PenV is located in the vacuolar membrane in *P. chrysogenum*, which was supported by the FM 4-64 staining experiments. Possible implication of vacuoles in the beta-lactam biosynthesis in *P. chrysogenum* had been proposed previously (Lendenfeld et al. 1993). Some other authors described that vacuoles stored and provided L-cysteine and L-valine, precursors of the penicillin molecule. Vacuoles did not seem to store $L-\alpha$ aminoadipic acid, given its acidic nature unless it was present in a modified basic form (Honlinger and Kubicek 1989).

The vacuoles appeared to be highly important in the biosynthesis of non-ribosomal peptides in P. chrvsogenum (Evers et al. 2004; van de Kamp et al. 1999; Lendenfeld et al. 1993) and in the cyclosporine producer Tollypocladium inflatum (Hoppert et al. 2001). The localization of PenV in the vacuolar membrane and the effects of the penV gene silencing on the tripeptide ACV synthesis and the betalactam production support the hypothesis that this protein affects the early stages of penicillin biosynthesis. If PenV acts as a transporter of vacuolar L-cysteine and L-valine, its silencing may explain the significant reduction in ACV formation. As reported for other multidomain peptide synthetases (Hoppert et al. 2001), the ACV synthetase is probably anchored to the cytoplasmic side of vacuoles (Lendenfeld et al. 1993). In P. chrysogenum, some amino acid permeases like Gap1 (Benko et al. 1969; Hunter and Segel 1971), Dip5 (Trip et al. 2004), Arl1 (Trip et al. 2002), and Mtr (Young et al. 1999; Russnak et al. 2001) were described, but it is still unknown whether they are cell membrane or vacuolar transporters. PenV does not show close homology with these permeases, but, like all of them, it is a polytopic membrane protein. PenV could be classified within the amino acid auxin permease family (AAAP), whose members are not homologous among themselves; however, they showed a highly conserved topology consisting in 10-12 TMSs (Young et al. 1999; Jack et al. 2000).

A decrease in the amino acid permease activity causing the reduction of the ACV level in the silenced transformant may explain the reduction in the levels of the other intermediates (IPN) and the final product (PenG). Interestingly, the silencing of *penV* decreased the expression of the second and third genes of the penicillin biosynthetic pathway (*pcbC* and *penDE*) (Fig. 2), but not that of the first gene, *pcbAB*, encoding the ACV synthetase. Therefore, the decrease in ACV seems to be due to the lack of substrates for this multienzyme and not to the pcbAB mRNA levels. The reduction of the flux of these amino acids towards the cytoplasm could also affect the synthesis of proteins that are necessary for the protein metabolism in P. chrvsogenum, which could explain the changes observed in the growing ability of the fungus. In summary, this article describes for the first time PenV, a vacuolar membrane protein that participates over the penicillin biosynthetic pathway of the filamentous fungus P. chrysogenum.

According to our hypothesis, PenV would intervene in the transport of the precursors L-cysteine and L-valine from the vacuolar lumen to the cytosol supplying these amino acids to the ACV synthetase. The inactivation of *penV* is lethal and *penV* silencing has several effects on the growth and the secondary metabolism indicating that PenV is an essential protein in *P. chrysogenum*. Acknowledgments Marta Fernández-Aguado was supported by a grant for recent graduate researcher staff training program from the Junta de Castilla y León and co-financed by the European Social Fund [grant number Q2432001B]. We acknowledge the excellent technical assistance of A. Sánchez-Rodríguez, B. Martín, J. Merino, A. Casenave, and A. Mulero.

References

- Aharonowitz Y, Cohen G, Martín JF (1992) Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. Annu Rev Microbiol 46:461–495. doi:10.1146/ annurev.mi.46.100192.002333
- Álvarez E, Cantoral JM, Barredo JL, Díez B, Martín JF (1987) Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. Antimicrob Agents Chemother 31:1675–1682. doi:10.1128/AAC.31.11.1675
- Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Peery RB, Skatrud PL, De Waard MA (2000) The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. Mol Gen Genet 263:966–977. doi:10.1007/PL00008697
- Bañuelos O, Casqueiro J, Fierro F, Hijarrubia MJ, Gutierrez S, Martín JF (1999) Characterization and lysine control of expression of the lys1 gene of *Penicillium chrysogenum* encoding homocitrate synthase. Gene 226:51–59. doi:10.1016/S0378-1119(98)00551-4
- Barredo JL, Cantoral JM, Álvarez E, Díez B, Martín JF (1989a) Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. Mol Gen Genet 216:91–98. doi:10.1007/BF00332235
- Barredo JL, Díez B, Álvarez E, Martín JF (1989b) Large amplification of a 35-kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. Curr Genet 16:453–459. doi:10.1007/BF00340725
- Barredo JL, van Solingen P, Díez B, Álvarez E, Cantoral JM, Kattevilder A, Smaal EB, Groenen MA, Veenstra AE, Martín JF (1989c) Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A: 6aminopenicillanic-acid-acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum*. Gene 83:291–300. doi:10.1016/0378-1119(89)90115-7
- Benko PV, Wood TC, Segel IH (1969) Multiplicity and regulation of amino acid transport in *Penicillium chrysogenum*. Arch Biochem Biophys 129:498–508. doi:10.1016/0003-9861(69)90207-0
- Cantoral JM, Díez B, Barredo JL, Álvarez E, Martín JF (1987) Highfrequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. Nat Biotechnol 5:494–497. doi:10.1038/nbt0587-494
- Cardoza RE, Moralejo FJ, Gutiérrez S, Casqueiro J, Fierro F, Martín JF (1998) Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. Curr Genet 34:50–59. doi:10.1007/s002940050365
- Carr LG, Skatrud PL, Scheetz ME, Queener SW 2nd, Ingolia TD (1986) Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. Gene 48:257–266. doi:10.1016/0378-1119(86)90084-3
- Casqueiro J, Gutierrez S, Bañuelos O, Hijarrubia MJ, Martín JF (1999) Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. J Bacteriol 181:1181– 1188
- Cole L, Orlovich DA, Ashford AE (1998) Structure, function, and motility of vacuoles in filamentous fungi. Fungal Genet Biol 24:86–100. doi:10.1006/fgbi.1998.1051
- Demain AL, Elander RP (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. Antonie Van Leeuwenhoek 75:5–19. doi:10.1023/A:1001738823146

- Díez B, Gutierrez S, Barredo JL, van Solingen P, van der Voort LH, Martín JF (1990) The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the pcbAB gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the pcbC and penDE genes. J Biol Chem 265:16358–16365
- Evers ME, Trip H, van den Berg MA, Bovenberg RA, Driessen AJ (2004) Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotics biosynthesis. Adv Biochem Eng Biotechnol 88:111–135. doi:10.1007/b99259
- Fierro F, Barredo JL, Díez B, Gutiérrez S, Fernández FJ, Martín JF (1995) The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. Proc Natl Acad Sci USA 92:6200–6204. doi:10.1016/j.fgb.2006.03.001
- Fierro F, García-Estrada C, Castillo NI, Rodriguez R, Velasco-Conde T, Martín JF (2006) Transcriptional and bioinformatic analysis of the 56.8 kb DNA region amplified in tandem repeats containing the penicillin gene cluster in *Penicillium chrysogenum*. Fungal Genet Biol 43:618–629. doi:10.1016/j.fgb.2006.03.001
- Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. J Microsc 198:246–259. doi:10.1046/j.1365-2818.2000.00708
- García-Estrada C, Ullán RV, Albillos SM, Fernández-Bodega MA, Durek P, von Dohren H, Martín JF (2011) A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. Chem Biol 18:1499–1512. doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.012
- Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B, Martín JF (1997) Expression of the *cef*G gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. Appl Microbiol Biotechnol 48:606–614. doi:10.1007/ s002530051103
- Honlinger C, Kubicek CP (1989) Regulation of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by the alpha-aminoadipate pool size. FEMS Microbiol Lett 53:71–75
- Hoppert M, Gentzsch C, Schorgendorfer K (2001) Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*. Arch Microbiol 176:285–293. doi:10.1007/s002030100324
- Hunter DR, Segel IH (1971) Acidic and basic amino acid transport systems of *Penicillium chrysogenum*. Arch Biochem Biophys 144:168–183. doi:10.1016/0003-9861(71)90466-8
- Jack DL, Paulsen IT, Saier MH (2000) The amino acid/polyamine/ organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. Microbiology 146(Pt 8):1797–1814
- Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF (2010a) Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. Mol Cell Proteomics 9:1182–1198. doi:10.1074/ mcp.M900327-MCP200
- Jami MS, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado AA, Salehi-Najafabadi Z, Martín JF (2010b) The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. Mol Cell Proteomics 9:2729–2744. doi:10.1074/mcp.M110.001412
- Klionsky DJ, Herman PK, Emr SD (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. Microbiol Rev 54:266–292
- Koetsier MJ, Jekel PA, van den Berg MA, Bovenberg RA, Janssen DB (2009) Characterization of a phenylacetate-CoA ligase from *Penicillium chrysogenum*. Biochem J 417:467–476. doi:10.1042/ BJ20081257
- Kosalkova K, García-Estrada C, Ullán RV, Godio RP, Feltrer R, Teijeira F, Mauriz E, Martín JF (2009) The global regulator *LaeA* controls

penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. Biochimie 91:214– 225. doi:10.1016/j.biochi.2008.09.004

- Kurylowicz W, Kurzatkowski W, Kurzatkowski J (1987) Biosynthesis of benzylpenicillin by *Penicillium chrysogenum* and its Golgi apparatus. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 35:699–724
- Laich F, Fierro F, Cardoza RE, Martín JF (1999) Organization of the gene cluster for biosynthesis of penicillin in *Penicillium nalgiovense* and antibiotic production in cured dry sausages. Appl Environ Microbiol 65:1236–1240
- Laich F, Fierro F, Martín JF (2002) Production of penicillin by fungi growing on food products: identification of a complete penicillin gene cluster in *Penicillium griseofulvum* and a truncated cluster in *Penicillium verrucosum*. Appl Environ Microbiol 68:1211–1219. doi:10.1128/AEM.68.3.1211-1219.2002
- Lamas-Maceiras M, Vaca I, Rodríguez E, Casqueiro J, Martín JF (2006) Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an arylcapping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. Biochem J 395:147–155. doi:10.1042/ BJ20051599
- Lendenfeld T, Ghali D, Wolschek M, Kubicek-Pranz EM, Kubicek CP (1993) Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. The amino acid precursors are derived from the vacuole. J Biol Chem 268:665–671
- Martín JF (2000) Alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetases in beta-lactam producing organisms. From Abraham's discoveries to novel concepts of non-ribosomal peptide synthesis. J Antibiot (Tokyo) 53:1008–1021. doi:10.7164/antibiotics.53.100
- Martín JF, Casqueiro J, Liras P (2005) Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. Curr Opin Microbiol 8:282–293. doi:10.1016/ j.mib.2005.04.009
- Martín JF, Ullán RV, García-Estrada C (2010) Regulation and compartmentalization of beta-lactam biosynthesis. Microb Biotechnol 3:285–299. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00123.x
- Martín JF, García-Estrada C, Ullán RV (2012) Genes encoding penicillin and cephalosporin biosynthesis in Acremonium chrysogenum: two separate clusters are required. In: Gupta VK, Ayyachamy M (eds) Biotechnology of fungal genes. Science, Enfield, pp 113–138
- Meijer WH, Gidijala L, Fekken S, Kiel JA, van den Berg MA, Lascaris R, Bovenberg RA, van der Klei IJ (2010) Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. Appl Environ Microbiol 76:5702–5709. doi:10.1128/ AEM.02327-09
- Minuth W, Tudzynski P, Esser K (1982) Extrachromosomal genetics of Cephalosporium acremonium. Curr Genet 5:227–231. doi:10.1007/BF00391811
- Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wosten HA, van der Voort LH, Smaal EB, Verkleij AJ (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. EMBO J 10:489–495
- Müller WH, Bovenberg RA, Groothuis MH, Kattevilder F, Smaal EB, Van der Voort LH, Verkleij AJ (1992) Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. Biochim Biophys Acta 1116:210–213. doi:10.1016/0304-4165(92)90118-E
- Nijland JG, Kovalchuk A, van den Berg MA, Bovenberg RA, Driessen AJ (2008) Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. Fungal Genet Biol 45:1415–1421. doi:10.1016/j.fgb.2008.07.008
- Paul GC, Thomas CR (1996) A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. Biotechnol Bioeng 51:558–572. doi:10.1002/(SICI)1097-0290 (19960905)51:5<558::AID-BIT8>3.0.CO;2-B

- Ramos FR, López-Nieto MJ, Martín JF (1985) Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. Antimicrob Agents Chemother 27:380–387. doi:10.1128/ AAC.27.3.380
- Roach PL, Clifton IJ, Fulop V, Harlos K, Barton GJ, Hajdu J, Andersson I, Schofield CJ, Baldwin JE (1995) Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. Nature 375:700–704. doi:10.1038/375700a0
- Roach PL, Clifton IJ, Hensgens CM, Shibata N, Schofield CJ, Hajdu J, Baldwin JE (1997) Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. Nature 387:827–830. doi:10.1038/42990
- Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol 6:3343–3353. doi:10.1111/ j.1365-2958.1992.tb02202.x
- Russnak R, Konczal D, McIntire SL (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. J Biol Chem 276:23849–23857. doi:10.1074/jbc.M008028200
- Russo P, Li WZ, Hampsey DM, Zaret KS, Sherman F (1991) Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of cyc1 mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 10:563–571
- Smith DJ, Burnham MK, Edwards J, Earl AJ, Turner G (1990) Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillum chrysogenum*. Biotechnology (N Y) 8:39–41. doi:10.1038/nbt0190-39
- Teijeira F, Ullán RV, Guerra SM, García-Estrada C, Vaca I, Martín JF (2009) The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production. Biochem J 418:113–124. doi:10.1042/BJ20081180
- Trip H, Evers ME, Konings WN, Driessen AJ (2002) Cloning and characterization of an aromatic amino acid and leucine permease of *Penicillium chrysogenum*. Biochim Biophys Acta 1565:73–80. doi:10.1016/S0005-2736(02)00510-2
- Trip H, Evers ME, Kiel JA, Driessen AJ (2004) Uptake of the betalactam precursor alpha-aminoadipic acid in *Penicillium chrysogenum* is mediated by the acidic and the general amino acid permease. Appl Environ Microbiol 70:4775–4783. doi:10.1128/ AEM.70.8.4775-4783.2004
- Ullán RV, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutierrez S, Martín JF (2002) A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. J Biol Chem 277:46216–46225. doi:10.1074/jbc.M207482200
- Ullán RV, Casqueiro J, Naranjo L, Vaca I, Martín JF (2004) Expression of *cef*D2 and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis. Mol Genet Genomics 272:562–570. doi:10.1007/s00438-004-1087-4
- Ullán RV, Campoy S, Casqueiro J, Fernández FJ, Martín JF (2007) Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum*

by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. Chem Biol 14:329–339. doi:10.1016/j.chembiol.2007.01.012

- Ullán RV, Godio RP, Teijeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltrer R, Kosalkova K, Martín JF (2008a) RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression. J Microbiol Methods 75:209–218. doi:10.1016/j.mimet.2008.06.001
- Ullán RV, Teijeira F, Martin JF (2008b) Expression of the Acremonium chrysogenum cefT gene in Penicillum chrysogenum indicates that it encodes an hydrophilic beta-lactam transporter. Curr Genet 54:153–161. doi:10.1007/s00294-008-0207-9
- Ullán RV, Teijeira F, Guerra SM, Vaca I, Martín JF (2010) Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C. Biochem J 432:227–236. doi:10.1042/BJ20100827
- van de Kamp M, Driessen AJ, Konings WN (1999) Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. Antonie Van Leeuwenhoek 75:41–78. doi:10.1023/A:1001775932202
- van den Berg MA, Westerlaken I, Leeflang C, Kerkman R, Bovenberg RA (2007) Functional characterization of the penicillin biosynthetic gene cluster of *Penicillium chrysogenum* Wisconsin54-1255. Fungal Genet Biol 44:830–844. doi:10.1016/ j.fgb.2007.03.008
- van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen AJ, García-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WH, Joardar V, Kiel JA, Kovalchuk A, Martin JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, van der Klei IJ, van Peij NN, Veenhuis M, von Dohren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RA (2008) Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. Nat Biotechnol 26:1161–1168. doi:10.1038/nbt.1498
- van der Lende TR, van de Kamp M, Berg M, Sjollema K, Bovenberg RA, Veenhuis M, Konings WN, Driessen AJ (2002) Delta-(Lalpha-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. Fungal Genet Biol 37:49–55. doi:10.1016/S1087-1845(02)00036-1
- Wang FQ, Liu J, Dai M, Ren ZH, Su CY, He JG (2007) Molecular cloning and functional identification of a novel phenylacetyl-CoA ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. Biochem Biophys Res Commun 360:453–458. doi:10.1016/ j.bbrc.2007.06.074
- Young GB, Jack DL, Smith DW, Saier MH Jr (1999) The amino acid/ auxin:proton symport permease family. Biochim Biophys Acta 1415:306–322
- Yu ZL, Liu J, Wang FQ, Dai M, Zhao BH, He JG, Zhang H (2011) Cloning and characterization of a novel CoA-ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. Folia Microbiol (Praha) 56:246–252. doi:10.1007/s12223-011-0044-y

SUPPLEMENTARY MATERIAL

A vacuolar membrane protein affects drastically the biosynthesis of the ACV tripeptide and the beta-lactam pathway of *Penicillium chrysogenum*

Marta Fernández-Aguado^b, Fernando Teijeira^a, Juan F. Martín^b, Ricardo V. Ullán^{a*}.

^aInstitute of Biotechnology of León (INBIOTEC), Av. Real s/n, 24006 León, Spain

^bArea of Microbiology, Department of Molecular Biology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071, León Spain

*Corresponding author:

Dr. Ricardo Vicente Ullán. Institute of Biotechnology (INBIOTEC), Av. Real s/n, 24006 León, Spain Phone: +34 987 210308; Fax: +34 987 210388. E-mail: <u>rvicu@unileon.es</u>

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure S1. Alignment of the deduced amino acid sequences of the protein encoded by the Pc22g22150 ORF of *P. chrysogenum* with the hypothetical membrane proteins of *Aspergillus clavatus* (XP_001269921), *A. niger* (XP_001389037), *A. fumigatus* (XP_749963), *A. oryzae* (XP_001817894) and *Penicillium marneffei* (XP_002143747). The identical amino acids are shaded.

Supplementary Figure S2. Intracellular level of PenG and IPN. HPLC analysis of intracellular PenG (A) and IPN (B) levels of the control strain (Wisconsin 54-1255) and TAT-1 transformant. The error bars indicate the standard deviations of three independent fermentations.

Supplementary Figure S3. Analysis of integration of the *penV-dsred* expressing cassette in *P. chrysogenum*. (A) Scheme of the *ppenV*-DsRed plasmid. The 4.3 kb solid line indicates the amplification band obtained by PCR using the primers PgdhF and Tcyc-R. (B) Gel electrophoresis showing the bands obtained by PCR using as template DNA of the transformants TVRed-5 (lane 1), TVRed-15 (lane 2), TVRed-17 (lane 3), TVRed-24 (lane 4), TVRed-39 (lane 5), TVRed-46 (lane 6), TVRed-65 (lane 7), TVRed-73 (lane 8), the parental strain Wisconsin 54-1255 (negative control, lane 9) and p*penV*-DsRed plasmid (positive control, lane 10).

	10	20	30	40	50	60	70	80
P. chrysogenu	m MSLTASAASAALT	LLADGPDI	OGSKRPWRPND	PVKEORDLYT	OFVISTALGL	SAFLAFCILRI	PKWTELYAARI	RRORNA 77
A. clavatus	MSLTEPAATALAT	VVTAAAAAQTO	GNERKWTD	QTKNQRD T YT	~ QLVISLTLGL	SAFISFCILR	PKW <mark>R</mark> ELYAARI	RRORCA 78
A. niger	MSLTESAA A AMLT	A-AVVVDSPII	VHEPRWDD	QTRG-RDLYT	QLVISL <mark>LV</mark> GL	SAF <mark>F</mark> SFCILRI	PKWTELYAARI	RRQRNA 76
A. fumigatus	MSLTESAVTALGT	V-AAATAVETO	DHGRRWTD	QTKNQRDTYT	QLVISL <mark>V</mark> LGL	SAF <mark>M</mark> SFCILRI	pkw <mark>r</mark> elyaari	RRQR <mark>C</mark> A 77
A. oryzae	MSMTEAAAAAIIT	A-AVINDKPGO	GHEPTWGD	QT <mark>RG</mark> QRDLYT	QL <mark>I</mark> ISLTLGL	SAFLSFC V LRI	PKWTELYAARI	RRQRCA 77
P. marneffei	MSATASIPTPVQF	A-AMASSSDPC	GDHPGEWG	NMTNARDLAT	QLVLSVTLGM	SA <mark>LF</mark> SFC <mark>L</mark> LRI	pkw <mark>k</mark> elyaari	rkrrna 76
	90	100	110	120	130	140	150	160
P. chrysogenu	m ASRLPELPDTLFG	WIPVLHQITEE	EEVL <mark>Q</mark> SAGLDA	YVFLSFFKFA:	IRFL <mark>L</mark> AVFIF	avaiilp <mark>m</mark> hyi	KYTG <mark>Q</mark> YGVPGI	WDNPPG 157
A. clavatus	ASQLPELPDSFFG	WIPVLFGITEF	E <mark>QVLG</mark> SAGLDA	FVFLSFFK Y A.	IRFL T AVFIF	AVAIIGPIHF	KYTGKYGVPGV	WDHDDP 158
A. niger	ASYLPELPDSFFG	WIPVLYRITDE	EQVLESAGLDA	FVFL T F L KFA	IRFLSAIFFF	ALVIILPTHY	KNTGKSGVPG	WDDDDD 156
A. fumigatus	AFHLPELPD T FFG	WMPVLFRITDE	EQVLNSAGLDA	FVFLSFFKFA	IRFLS I VF V F	AVIIIGPVHF	KYTGKYGMPD	WDHDDG 157
A. oryzae	ASHLPELPDSFFG	WIPVLYRIIE	SEVL <mark>H</mark> SAGLDA	FVFLSFFKFA.	IRFLSAVFMF:	AVVIILPIHYI	KYTGKRGIPG	WDDNDG 157
P. marnellel	ASF LPELPDSLFG	WIPVVIRIIDE	LEVLESAGLDA	YVLLSFFKFA	VRFLSVIFAF.	АТЬТТМЬРНР	RIAGQWGVPGI	NDHDD 190
	170	180	190	200	210	220	230	240
P. chrysogenu	<i>т</i> мкттертр	GSEKEKE		VI.FAVVFSCL	ATVMI.I.DETK		מעטעגעעעע. אוטעגעעעעניי	TRLSGT 228
A. clavatus	DDVVGL	KEKKKI	ISDPNYLWMY	VIFAYIFSGL	AIYMLVOETD	KIISIROKYL	GSOTSTTDRT:	IRLSGI 226
A. niger	ETFDGD	KDKKKI	LISDPNYLWMY	VIFTYIF T GL	AVYMLIOETN	KVIR T ROKYL(GSQTSTTDRT:	IRLSGI 224
A. fumigatus	DDGK	DGKKKI	LISDPNYLWMY	VVFTYIFSGL	AIYMLLQETN	KIISIRQYYL	GSQTSTTDRT:	IRLSGI 223
A. oryzae	NAL-GR	NKDKEP	P VT DPDYLWMY	VVFTYIFTGM	A <mark>V</mark> YMLLQETN	KIIRIRQ <mark>E</mark> YL(GSQTSTTDRT	IRLSGI 224
P. marneffei	DDDDDGGQSLFAR	DILLGNGHKKF	FKSDPTYLWIY	VIFPYVFTGI	AIYLLIQETN	KIIRIRQKYLO	GSQTSTTDRT	FRLSGI 236
	250	260	270	280	290	300	310	320
P. chrysogenu	250 m PHDLGTEDKIKEF	260 VEGLRVGKVES	270 ITVCRKWREL	280 DELIDERMKV	290 IRELERAWTK	300 HIGYKRPKND	310 GNALPLTEQQI	320 PR 304
P. chrysogenu A. clavatus	250 m PHDLGTEDKIKEF s PSELASEEKIKEF	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVEN	270 SITVCRKWREL	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM	290 IRELERAWTK	300 HIGYKRPKNDO HVGYKRPKPSO	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQI	320 PR 304 ARGSSL 306
P. chrysogenu A. clavatus A. niger	250 m PHDLGTEDKIKEF s PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLKVGKVES	270 ITVCRKWREL WTLCRDWREL	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKL	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTR	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASI	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQI PNALTMMHQQI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSI 304
P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus	250 m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGKVES	270 SITVCRKWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKL DHLIDERLKL	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTR LRKLEWAWTK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPSG HLGYKRVKASI HLGYKRPKASI	310 SNALPLTEQQI SSSISLTRQQI PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 304 PRGSSL 303
P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae B. marnoffai	250 M PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PDTF PCEEKIAET	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES TEDI HTCKVES	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL	280 DELIDERMKV. DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI	290 IRELERAWIK LRNLEWAWIK LRNLERAWIK LRNLERAWIK LRNLERAWIK I DDI ERAYIK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASI HLGYKRPKHSI HLGYKRQTEDI	310 SNALPLTEQQI SSSISLTRQQZ PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSI 304 PRGSSL 303 PRGSSL 304
P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei	m PHDLGTEDKIKEF SPSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVEA	270 ITVCRKWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRKLEWAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPSG HLGYKRVKASJ HLGYKRQTEDJ HLGYKQKRYJ	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQI PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI	320 PR 304 ARGSSI 306 PRGSSI 304 PRGSSI 303 PRGSSI 304 RDRSPS 316
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei 	250 M PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVES	270 ITVCRKWREL WTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRKLEWAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASJ HLGYKRPKHSJ HLGYKRQTEDJ HLGYKQKRRYJ	310 GNALPLTEQQI 3SSISLTRQQ PNALIMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHIR NDTLPLVRGSI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSI 304 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316
P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei	250 M PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVEA 340	270 ITVCRKWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRKWHEL 350	280 DELIDERMKV DHLIDERLKU DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRKLEWAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKAS HLGYKRVKAS HLGYKQKRRY HLGYKQKRRY 380	310 GNALPLTEQQI SSSISLTRQQI PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390	320 PR 304 ARGSSI 306 PRGSSI 304 PRGSSI 304 PRGSSI 304 RDRSPS 316
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu 	m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PDDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLL-	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVEA 340 SGHDNEHVSG	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL AVTLCRKWHEL 350 (SNERPKVRIW	280 DELIDERMKV. DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRFRM	290 IRELERAWIK LRNLERAWIK LRNLERAWIK LRNLERAWIK LRPLERAYIK 370 IDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASI HLGYKRQTEDI HLGYKQKRRYI 380 LRKIDEYIQN	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQI PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSI 304 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus 	m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PDDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLL- LFDGDSEQTQLL-	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVEA 340 SGHDNEHVSGY SESDRDHVSGY	270 SITVCRKWREL VYTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL AVTLCRKWHEL 350 (SNERPKVRIW (SQQPTIRLW	280 DELIDERMKV. DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRFRM. YGPLKLRYRK	290 IRELERAWTK LRNLERAWTK LRKLEWAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKNDO HVGYKRPKPSS HLGYKRVKASS HLGYKRVROTEDJ HLGYKQKRRYJ 380 LRKIDEYIQN LRRIDERIQVJ	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQ2 PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE ARDKEYPATER	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSI 304 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 400
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger 	m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PDDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLL- LFDCDSEQTQLL- VSDGDSERIQLL-	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVES 340 SGHDNEHVSGY SESDRDHVSGY SEGGRDHVTDY	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL WTLCRKWHEL 350 SNERPKVRIW SQQRPTIRLW ZAHKRPTVRIW	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRFRM YGPLKLRYRK YGPFKLRYKN	290 IRELERAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK IDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASI HLGYKRQTED HLGYKQKRRYI 380 LRKIDEYIQM LRRIDERIQVI LRRIDERIQVI	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQJ PNALTMMHQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSH 390 AREKEYRTTE ARDKEYPPTE	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 IAFVIM 381 MAFVIM 385 VAFVIM 383
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus 	250 M PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 MDADDERSGLL- LFDGDSEQTQLL- VSDGDSERIQLL- LSDGDSEHTQLL-	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVES 340 SGHDNEHVSGY SESDRDHVSGY SEGGRDHVTDY SESGRAHISEH	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRKWHEL 350 (SNERPKVRIW (SQQRPTIRLW (AHKRPTVRIW)	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRFRM YGPLKLRYRK YGPFKLRYRW	290 IRELERAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKAS HLGYKRQTED HLGYKQKRRY 380 LRKIDEYIQM LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDEKIQA	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQ PNALTMMHQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE ARDKEYPATEI ARDKEYPPTEI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 IAFVTM 381 MAFVTM 383 MAFVTM 383
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae 	250 m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKILEF PQDMASEEKILEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLL- LFDGDSEQTQLL- VSDGDSERIQLL- LSDGDSEHTQLL- FEDDDSERIQLL-	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGRVES VEGLQVGRVES IEDLHIGKVEA 340 SGHDNEHVSG SESGRDHVSN SESGRDHVSN SESGRDHVSN SESGRAHISEH SESGRDHVAD	270 ITVCRKWREL VTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRKWHEL SVTLCRKWHEL SSORPTRLW (SQQRPTIRLW (AHKRPTVRIW WQRPTIRLW (AHQRPTIRLW)	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRYRK YGPFKLRYRK YGPFKLRYRN YGPLKLRYRN	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASJ HLGYKQKRRY HLGYKQKRRY 380 LRKIDEYIQN LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV	310 SNALPLTEQQI SSSISLTRQQI PNALIMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE ARDKEYPATEI ARQKEYPPTEI ARQKEYPPTEI ARQKEYPPTEI ARQKOYTPTEI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSI 304 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 400 1AFVTM 381 MAFVTM 385 VAFVTM 383 MAFVTM 382 LAFVTM 382
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei 	m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PDDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLL- LFDCDSEQTQLL- VSDCDSERIQLL- SEEDSERIQLL- VHSEATEHSQLLG	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGRVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVEA 340 SGHDNEHVSGY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVADY	270 SITVCRKWREL VTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRWHEL SVTLCRKWHEL 350 SNERPKVRIW SQQPTIRIW CAHKRPTVRIW WQRPTIRIW KDKKRPTTRIW	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRFRM YGPFKLRYKM YGPFKLRYKM YGPFKLRYKM	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPSG HLGYKRVKASJ HLGYKRQKRYJ HLGYKQKRRYJ LGYKQKRRYJ LGYKQKRRYJ LGYKQKRRYJ LGYKQKRYJ LRRIDEKIQVJ LRRIDEKIQVJ LRRIDEEIRVJ LRRIDEEIRVJ LRRVDERIJA	310 GNALPLTEQQI SSSISLTRQQI PNALTMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE: ARQKEYPPTEI ARQKEYPPTEI ARQKDYPATDI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 1AFVIM 381 MAFVIM 383 MAFVIM 383 MAFVIM 383 LAFVIM 383
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei 	250 M PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PDDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 DADDERSGLL- LFDGDSEQTQLL- VSDGDSERIQLL- SEDDSERIQL- FSEDDSERIQL- VHSEATEHSQLLG	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGNVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVES SEGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVDY SESGRDHVDY SESGRDHVDY SEDGRVPVRTH	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWREL SY	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRFRM YGPLKLRYRW YGPFKLRYKW YGPFKLRYKW	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKAS HLGYKRQTED HLGYKQKRRY 380 LRKIDEYIQN LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQN LRRIDERIQN LRRIDERIQN	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQ PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE ARQKEYPPTEI ARQKEYPPTEI ARQKQYTPTEI ARQKDYPATD	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 400 1AFVTM 381 MAFVTM 383 MAFVTM 383 MAFVTM 383 LAFVTM 396
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei 	m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLL- LFDGDSEQTQLL- VSDGDSERIQLL- VSDGDSERIQLL- SEDDSERIQLL- VHSEATEHSQLIG	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGKVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVEA 340 SGHDNEHVSGY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY SESGRDHVTDY	270 SITVCRKWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRKWHEL SVTLCRKWHEL SSNERPKVRIW SQQRPTIRIW CAHKRPTVRIW VQRRPTIRIW CAHQRPTIRIW CAHQRPTIRIW CAHQRPTIRIW	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKL DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRYKN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPSG HLGYKRVKASJ HLGYKRVKASJ HLGYKQKRRYJ 380 LRKIDEYIQM LRRIDERIQVJ LRRIDERIQVJ LRRIDEKIQVJ LRRIDEEIRVJ LRRIDEEIRVJ LRRIDEEIRVJ LRRVDERIIA	310 GNALPLTEQQI SSISLTRQQI PNALTMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE: ARQKEYPPTEI ARQKEYPPTEI ARQKEYPPTEI ARQKDYPATDI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 1AFVTM 381 MAFVTM 383 MAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. marneffei 	m PHDIGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDIGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLI- LFDGDSEQTQLI- VSDGDSERIQLI- SEEDDSERIQLI- FSEDDSERIQLI- VHSEATEHSQLIG 410 m ESIAASOMI.VOAT	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGRVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVEA 340 SGHDNEHVSGY SESGRDHVSNY SEGGRDHVTDY SESGRAHISEH SESGRDHVADY SEDGRVPVRTK 420 LDPHPMOMPAF	270 ITVCRKWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRDWREL VTLCRKWHEL 350 (SNERPKVRIW (SQQRPTIRLW (AHKRPTVRIW (AHKRPTVRIW (AHQRPTIRLW (ALQAPADVTW	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQII DLLMEERKKI 360 YGLFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPSG HLGYKRVKASJ HLGYKRVKASJ HLGYKQKRRYJ 380 LRKIDEYIQM LRRIDERIQVJ LRRIDERIQVJ LRRIDEKIQVJ LRRIDEKIQVJ LRRIDEFIRVJ LRRVDERIIA 460	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQI PNALTMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE ARQKEYPPTEI ARQKEYPPTEI ARQKEYPTEI ARQKDYPATDI 470 LIVPIASLLEI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 304 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 400 IAFVTM 381 MAFVTM 383 MAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 396 480 480
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. oryzae P. marneffei 	 250 PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 DADDERSGLI- LFDGDSEQTQLI- VSDGDSERIQLI- LSDGDSEHTQLI- FSEDDSERIQLI- VHSEATEHSQLIG m ESIAASQMLVQAI	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGKVES VEGLQVGKVES IEDLHIGKVES SESDRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVADY SESGRDHVADY SEDGRVPVRTK 420 LDPHPMQMFAF LDPHPMQMFAF	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRWHEL SVTLCRWHEL SVTLCRWHEL SVTLCRWHEL SVCRPTRLW CSQQPTIRLW CAHCRPTIRLW CAHCRPTIRLW CAHCRPTIRLW CAHCRPTIRLW CAHCRPTIRLW CAHCRPTIRLW CALCONNEL SPADVVW RLAPSPADVVW	280 DELIDERMKV: DHLIDERLKI DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRYRM YGPLKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYKM YGPFKLRYKM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM	290 IRELERAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDSIDYYEEK 450 MVQSWSITFV	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKAS HLGYKRQTED HLGYKQKRRY 380 LRKIDEYIQN LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDEKIQA LRRIDEEIRV LRRVDERIIA 460 IGFLTVFWSVI	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQ PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE ARQKEYPPTE ARQKEYPPTE ARQKDYPATDI 470 LLVPIASLLEI LLVPVAYLLEI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 IAFVTM 381 MAFVTM 381 MAFVTM 383 MAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 396 480 LKTLET 461 LETLHK 465
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. oryzae P. marneffei 	 250 PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 DADDERSGLI- LFDGDSEQTQLL- VSDGDSERIQLI- LSDGDSEHTQLI- FSEDDSERIQLI- VHSEATEHSQLIG m ESIAASQMLVQAI ESIAASQMVVQAI 	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGKVES IEDLHIGKVES IEDLHIGKVES SSGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVADY SESGRDHVADY SEDGRVPVRTK 420 LDPHPMQMFAF LDPHPMQFAF LDPHPMQLFAF	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRDWREL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWHEL SYTLCRWREL SY	280 DELIDERMKV DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQI DLLMEERKKI 360 YGLFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDSIDYYEEK 450 MVQSWSITFV MMQSWFITGV	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKAS HLGYKRQTED HLGYKQKRRY 380 LRKIDEYIQN LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV IGFLTVFWSVI IGFLTVFWSVI	310 GNALPLTEQQI GSSISLTRQQI PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE: ARQKEYPPTEY ARQKOYPATDI ARQKDYPATDI 470 LUVPIASLLEI LLIPVAYLLEI LLIPVAYLLEI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 IAFVTM 381 MAFVTM 381 MAFVTM 383 MAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 483 LAFVTM 461 LETLHK 463
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. clavatus A. niger A. fumigatus A. niger A. fumigatus 	m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 mDADDERSGLL- LFDGDSEQTQLL- VSDGDSERIQLL- SEDDSERIQLL- FSEDDSERIQLL- FSEDDSERIQLI- VHSEATEHSQLLG M ESIAASQMUVQAI ESIAASQMVVQAI	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGKVES IEDLHIGKVES IEDLHIGKVES SEGRDHVSN SEGRDHVSN SEGRDHVTD SESGRAHISES SESGRDHVADY SEDGRVPVRTK 420 LDPHPMQMFAF LDPHPMQLFAF LDPHPMQLFAF	270 SITVCRKWREL WTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRWHEL SVTLCRKWHEL SVERPKVRIW (SQQRPTIRLW (AHQRPTIRLW) (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW) (AHQRPT	280 DELIDERMKV: DHLIDERLKM DHLIDERLKI DHLIDERLKI DRLVDERLQII DLLMEERKKI 360 YGLFKLRYRN YGPLKLRYRN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN YGPFKLRYKN KNTYLSRTRI KNTYLPRSRI KNTYLPRSRI	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK MVQSWSITFV MMQSWFITGV MMQSWFITGV	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASI HLGYKRQTED HLGYKQKRRY 380 LRKIDEYIQN LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV IGFLTVFWSVI IGFLTVFWSVI IGFLTVFWSVI	310 SNALPLTEQQI SSISLTRQQI PNALIMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE: ARQKEYPPTEY ARQKEYPPTEY ARQKQYTPTEJ ARQKDYPATDI 470 LUVPIASLLEI LUVPAYLLEI LLIPVAYLLEI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 303 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 1AFVTM 381 MAFVTM 381 MAFVTM 383 MAFVTM 383 MAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 461 LETLHK 463 LETLHK 463
 P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. fumigatus A. oryzae P. marneffei P. chrysogenu A. clavatus A. niger A. niger A. niger A. fumigatus A. niger A. fumigatus A. niger A. fumigatus A. niger A. fumigatus A. oryzae 	 m PHDLGTEDKIKEF PSELASEEKIKEF PPDLGTEEKIKDF PKELASEEKIKEF PQDMASEEKIIEF PTELRSEEKIQEI 330 DADDERSGLI- LFDGDSEQTQLL- VSDGDSERIQLI- SEDDSERIQLI- FSEDDSERIQLI- VHSEATEHSQLIG # 410 # 410 # 55IAASQMVVQAI ESIAASQMVVQAI ESIASQMVVQAI ESIASQMVVQAI ESIFASQMVVQAI	260 VEGLRVGKVES MEGLRVGKVES MEGLRVGRVES VEGLQVGRVES IEDLHIGKVEA 340 SGHDNEHVSG SESGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVSGY SESGRDHVSGY SEGGRDHVADY SEGGRDHVADY SEGGRDHVADY SEDGRVPVRTK 420 LDPHPMQLFAF LDPHPMQLFAF LDPHPMQLFAF LDPHPMQLFAF LDPHPMQLFAF	270 ITVCRKWREL VTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRDWREL SVTLCRWHEL VTLCRKWHEL SVTLCRKWHEL SVERPKVRIW (SQQRPTIRLW (SQQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AHQRPTIRLW (AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	280 DELIDERMKV: DHLIDERLKM DHLIDERLKM DHLIDERLKI DRLVDERLQII DLLMEERKKII 360 YGLFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYKM YGPFKLRYKM YGPFKLRYKM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM YGPFKLRYRM	290 IRELERAWTK LRNLEWAWTK LRNLERAWTK LRNLERAWTK LRPLERAYTK 370 IDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK VDAIDYYEEK MVQSWSITFV MMQSWFITGV MMQSWFITGV MMQSWFITGV	300 HIGYKRPKND HVGYKRPKPS HLGYKRVKASI HLGYKQKRRY 380 LRKIDEYIQN LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV LRRIDERIQV IGFLIVFWSV IGFLIVFWSV IGFLIVFWSV IGFLIVFWSV IGFLIVFWSV IGFLIVFWSV	310 SNALPLTEQQI SSISLTRQQI PNALTMMHQQI ENSISLTRQQI DSTLPLAHHR NDTLPLVRGSI 390 AREKEYRTTE ARQKEYPATEI ARQKEYPATEI ARQKQYTPTEI ARQKQYTPTEI ARQKDYPATDI 470 LIVPIASLLEI LLIPVAYLLEI LLIPVAYLLEI LLIPVAYLLEI	320 PR 304 ARGSSL 306 PRGSSL 303 PRGSSL 304 PRGSSL 304 PRGSSL 304 RDRSPS 316 400 1AFVTM 381 VAFVTM 383 VAFVTM 383 VAFVTM 383 VAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 383 LAFVTM 461 LETLHK 463 LETLHK 463

Fernández-Aguado et al. Fig. S1

	490	500	510	520	530	540	550	56
P. chrysogenum	IVPRLAEFLQEHPI	IKSLVQTGLF	TLAFSLLTV	AVPYLYEWLSI	N N Q G M V S R G D V	ELSVISKNFF	FSFFNLFLLF	TVFGTA
A. clavatus	VFPQLAEALARNPI	LSSLVQTGLF	TLVLSLLTVA	AVPYLYNWLSI	NQQGM <mark>M</mark> SRGDV	ELSVISKNFF	F T FFNLFLVF	TVFGTA
A. niger	VFPQLA <mark>D</mark> ALARNPI	AKSLVQTGLF	TLVLSLLTVA	AVPYLYNWLSI	NQQGM <mark>M</mark> SRGD <mark>I</mark>	elsvisk <mark>t</mark> ff	FSFFNLFLVF	TVFGTA
A. fumigatus	VFPQLAEALARNPI	LSSLVQTGLF	TLVLSLLTVA	VPYLYNWLSI	NQQGMVSRGDI	ELSVISKNFF	FSFFNLFLIF	TVFGTA
A. oryzae	VFPQLAEALARNPI	AKSLVQTGLF	TLVLSL <mark>M</mark> TVA	AVPYLYNWLSI	LQGMTSRGDV	ELSVISKNFF	FSFFNLFLVF	TVFGTA
P. marneffei	AIPGLADLLARHPI	IDSLVRTGLF	TITISLLTVA	AVPYLYAWLS	SLQGMTSRGDL	ELSIISKNFF	FTFFNLFFLF	TVLGSA
	570	580	590	600	610	620	630	640
P. chrysogenum	SGFYGFWESLRDAFF	KD <mark>STTIAL</mark> ALA	ANSLE <mark>GL</mark> APF	YINL <mark>L</mark> ILQGL(GLFPFRLLEFO	gsvalyp fq fi	LSA <mark>R</mark> TPREYAE	ELSTPP
A. clavatus	TTFYQFWETLRDAFI	KDAT <mark>A</mark> IAFAL#	AKSLE <mark>S</mark> FAPF	YINLI M LQGL(GLFPFRLLEFO	SVAMYPINFI	LSAKTPRDYAE	LSTPP
A. niger	TTFYGFWE <mark>N</mark> LRDAFI	KDATTIAFALA	AK <mark>T</mark> LENFAPF	YINFLCLQGI	GLFPFRLLEFO	SVAMYPINFI	AAKTPRDYAE	LSTPP
A. fumigatus	TTFYQFWETLRDAFI	KDAT <mark>A</mark> IAFAL4	AKSLE <mark>S</mark> FAPF	YINLIILQGL	GLFPFRLLEFO	SVALYP FL FI	LSAKTPRDYAE	LQTPP
A. oryzae	TTFYELFKHLRDAF	DATTIAFAL#	ANSLENFAPF	YINLI V LQG V	G <mark>M</mark> FPFRLLEF(SVAMYPINFI	FKAKTPREYAE	LSTPP
	650	660	670	680	690	700	710	720
chrysogenum	KFSYGFSIPQTILII	VICVVYSVFI	PSSWLICLFG	LIYFI <mark>V</mark> GKFI	YKYQLLYAMDH	IQQHSTGRAWI	PMIC <mark>N</mark> RVFVGI	LVHQL
A. clavatus	TFSYGYSIPQTILII	LIIC <mark>M</mark> VYSVFI	PSSWLICLFG	LVYFTIGKFI	YKYQLLYAMDH	IQQHSTGRAWI	PMICSRV F VGI	JIVFQL
A. niger	TFSYGYSIPQT V L <mark>S</mark> I	LIICVVYSVFI	PSSWLICLFG	L <mark>I</mark> YFTIGKFI	YKYQLLYAMDH	IQQHSTGRAWI	PMICSR ILM GI	MVFQL
A. fumigatus	TFSYGYSIPQTILI	LIICVVYSVFI	PSSWLICLFG	LVYFTIGKFI	YKYQLLYAMDH	IQQHSTGRAWI	PMICSRVFLGI	JIVFQL
A. oryzae	TFSYGYSIPQTILI	LIICVVYSVFI	PSSWLICLFG	LVYFTIG N FI	YKYQLLYAMDH	IQQHSTGRAWI	PMICSRVLVGI	MVFQI
P. marneffei	KFSYGFTIPQTIFI	FIICVVYSVFI	PSSWLVCFCG	LIYFFLGHFI	YKYQLLYAMDH	IQQHSTGRAWI	PMICSRVLLGI	LVVFQV
2 chrusogonum			750			780		800
clavatus	AMIGVLALRRATIR:	ST.T.T.VDT.T.CT	LVWFSIWFGR PLWFSVFFAO	TIEPUMKEIA.	LKSINKDQPG-		PSPSSILSPPS	CLDRD
A. niger	AMIGVLALRRAITR	SLLIVPLLMAT	rvwfsyffar	TYEPLMKFIA	LKSIDRERPG-	GGDISI	PSPSSTFSPPS	GLDRD
A. fumigatus	AVIGVLALRRAITR	SLLLVPLLGAT	rlwfsyffaqi	HYEPLMKFIA	LKSIDR <mark>N</mark> RPG-	GGDISI	PSPSSTFSPPS	GLERD
A. oryzae	AMIGVFALRKAITRS	SL <mark>I</mark> LVPLLGAT	rvwfsyff <mark>s</mark> r	SYEPLMKFIA	LKSINPDG-	GGNLSI	PSPS-TFSSPS	GLDRD
P. marneffei	AMIGVLALRKLI <mark>A</mark> RS	SLLLVPLLGAT	rvwftyffay	TYEPLMKFIA	LRSIDQDRPDF	NNGSNSDDSI	ISPPSLLSPLS	GLDRD
	810	820	830	840	850	860	870	880
chrysoaenum	SLPIRIGODLELRI				NPARG	I		L
. clavatus	ALPIQLGGHELGLRI	LKKYVNPSLIV	/PLNDAWLPG	RS				
. niger	SFPIRIGGQELGLRI	RKYVNPSLII	PLHDAWLPG	RT				
A. fumigatus	ALPIQIGGQQLGLRI	LKKYVNPSLII	LPLDDAWLPG	HS				
A. oryzae	ALPIQIGRQGVEVRI	NKYVNPSLIN	IPLD <mark>G</mark> AWLPG	RSIDLLHPPM	TLDHTRDRHRÇ	LDKCRLSLRI	OPLMIFALALF	RRLNV
°. marneffei	ALHILIGGREIGLRI	LKKYVNP <mark>N</mark> LSI	IPLDGAWVP-				F	RSDGSI
	890	900	910	920	930	940		
. chrysogenum				NGN(GASAFEV	HQ1	ſQNV	
A. clavatus		AAREFQGI)F	EAF-PAPNDN	GAAV			
A. niger		MVPELQGI	EL:	EHRNPGNNAAI	DESV			
A. fumigatus		ATREYQGA	AF]	DAH-ETRNGN	GSAV			
n. oryzae	LISASFIQSVHLHA	2SAALPAYPSI	SLPWAMAIFM	NFIDDHRDVS	APSPLAMADCO	GVLLTSANHN	NELF	
z. marnettei	VIRPSAVEEDHMGN	<u> </u>					V	

Fernández-Aguado et al. Fig. S1



Α



Β

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Publicaciones originales ------

-

El transporte de ácido fenilacético a través de la membrana del peroxisoma está mediado por la proteína PaaT en *Penicillium chrysogenum*.

(The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by PaaT protein in *Penicillium chrysogenum*. (2013). Applied Microbiology and Biotechnology. 97(7):3073-3084.)

Autores: Marta Fernández Aguado, Ricardo Vicente Ullán, Fernando Teijeira, Raquel Rodríguez Castro, Juan Francisco Martín. Publicaciones originales —

_

_

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY

The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by the PaaT protein in *Penicillium chrysogenum*

Marta Fernández-Aguado • Ricardo V. Ullán • Fernando Teijeira • Raquel Rodríguez-Castro • Juan F. Martín

Received: 31 July 2012 / Revised: 5 September 2012 / Accepted: 6 September 2012 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Penicillium chrysogenum, an industrial microorganism used worldwide for penicillin production, is an excellent model to study the biochemistry and the cell biology of enzymes involved in the synthesis of secondary metabolites. The well-known peroxisomal location of the last two steps of penicillin biosynthesis (phenylacetyl-CoA ligase and isopenicillin N acyltransferase) requires the import into the peroxisomes of the intermediate isopenicillin N and the precursors phenylacetic acid and coenzyme A. The mechanisms for the molecular transport of these precursors are still poorly understood. In this work, a search was made, in the genome of P. chrysogenum, in order to find a Major Facilitator Superfamily (MFS) membrane protein homologous to CefT of Acremonium chrysogenum, which is known to confer resistance to phenylacetic acid. The paaT gene was found to encode a MFS membrane protein containing 12 transmembrane spanners and one Pex19p-binding domain for Pex19-mediated targeting to peroxisomal membranes. RNA interference-mediated silencing of the paaT gene caused a clear reduction of benzylpenicillin secretion and

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-012-4425-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Fernández-Aguado · J. F. Martín (⊠) Area of Microbiology, Department of Molecular Biology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain e-mail: if.martin@unileon.es

R. V. Ullán (⊠) · F. Teijeira · R. Rodríguez-Castro Institute of Biotechnology of León (INBIOTEC),
Av. Real s/n,
24006 León, Spain
e-mail: rvicu@unileon.es increased the sensitivity of *P. chrysogenum* to the penicillin precursor phenylacetic acid. The opposite behavior was found when *paaT* was overexpressed from the glutamate dehydrogenase promoter that increases phenylacetic acid resistance and penicillin production. Localization studies by fluorescent laser scanning microscopy using PaaT– DsRed and EGFP–SKL fluorescent fusion proteins clearly showed that the protein was located in the peroxisomal membrane. The results suggested that PaaT is involved in penicillin production, most likely through the translocation of side-chain precursors (phenylacetic acid and phenoxyacetic acid) from the cytosol to the peroxisomal lumen across the peroxisomal membrane of *P. chrysogenum*.

Keywords *Penicillium chrysogenum* · Penicillin biosynthetic pathway · Phenylacetic acid · MFS transporter · Peroxisomal membrane protein

Introduction

The biosynthesis of penicillin in *Penicillium chrysogenum* is one of the best known systems of fungal synthesis of secondary metabolites due to the excellent knowledge about the enzymes involved (Aharonowitz et al. 1992) and the recent information on the molecular genetics, including the full genome sequence and transcriptomic studies (van den Berg et al. 2008; Harris et al. 2009). In the last few years, there has been an increasing interest on the subcellular localization and compartmentalization of the penicillin biosynthetic enzymes (Spröte et al. 2009; Martín et al. 2010), although the overall picture is still incomplete and the transport systems that introduce the precursors into peroxisomes and/or other cell organelles are still unknown (Martín et al. 2012). The biosynthesis of benzylpenicillin proceeds from the three precursor amino acids, $L-\alpha$ -aminoadipic acid, L-cysteine, and L-valine, that form the tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV) by the action of the ACV synthetase (Theilgaard et al. 1997; Theilgaard and Nielsen 1999; Martín 2000), followed by cyclization of the resulting ACV tripeptide to form isopenicillin N (IPN) (Ramos et al. 1985). These enzymes are encoded by the linked genes *pcbAB* and *pcbC* (Díez et al. 1990; Aharonowitz et al. 1992).

In the last step of the penicillin biosynthetic pathway, the $L-\alpha$ -aminoadipic acid side chain of isopenicillin N is removed by the isopenicillin N acyltransferase (IAT) and replaced by a molecule of phenylacetic acid, phenoxyacetic acid, or linear fatty acid molecules (from C₆ to C₈ carbon atoms) (Álvarez et al. 1987, 1993) previously activated as their CoA derivatives by the enzymes encoded by *phlA*, phlB, and phlC genes (Lamas-Maceiras et al. 2006; Koetsier et al. 2009, 2010; Yu et al. 2011). These last two enzymes that activate phenylacetic acid and link it to the 6aminopenicillanic acid nucleus of IPN are located in peroxisomes (Müller et al. 1991, 1992). Both fluorescence microscopy and inmunoelectron microscopy studies using anti-IAT antibodies (Müller et al. 1991; García-Estrada et al. 2008) have confirmed that the IAT is located in the lumen of peroxisomes, without significant levels in the cytoplasm (reviewed by Müller et al. (1991) and Martín et al. (2012)).

Phenylacetic acid induces the expression of several dozens of genes, some of which are directly related to penicillin biosynthesis (van den Berg et al. 2008; Harris et al. 2009). The transport of phenylacetic acid from the culture medium to the cytoplasm of the cells and then to the peroxisomes is an open subject. Some years ago, it was reported that phenylacetic acid enters the *Penicillium* cells by active transport (Fernández-Cañón et al. 1989a, b), although the active transport hypothesis was later disputed by Hillenga et al. (1995). The discrepancies between these two groups may be explained if we take into account that two consecutive transports are required: first, phenylacetic acid is taken up into the cell, which might take place by a facilitated diffusion mechanism, (Hillenga et al. 1995), and then this organic acid is transported into the peroxisomes.

During our work on the secretion of cephalosporins and its biosynthetic intermediates in *Acremonium chrysogenum*, a gene (*cefT*) was isolated. This gene was located in the "early" cephalosporin gene cluster that encoded a MFS protein that affects the secretion of cephalosporin intermediates and confers resistance to phenylacetic acid (Ullán et al. 2002). Therefore, it was of great interest to characterize the *cefT* homologous gene in *P. chrysogenum*. In this article, using molecular genetics and fluorescence studies, the homologous gene (named *paaT*) has been found to encode a peroxisomal membrane protein of the MFS family. The expression of this gene is strongly induced by phenylacetic acid as reported in a previous article (van den Berg et al. 2008). Studies with knock-down mutants and *paaT*-over-expressing transformants provide clear evidence that this MFS protein is involved in the transport of precursors across the peroxisomal membrane for penicillin biosynthesis.

Materials and methods

Strains and media

P. chrysogenum Wisconsin 54–1255 (ATCC 28089/DSM 1075), a moderate penicillin production strain (800 mg/L) derived from the wild-type *P. chrysogenum* NRRL 1951, which contains a single copy of the penicillin gene cluster (Cantoral et al. 1987; Fierro et al. 1995) and transformants derived from it, were used in this study. The selection of the transformants, containing the plasmid carrying the phleomycin resistance cassette, was made in Czapek minimal medium (30 g/l sucrose, 2 g/l NaNO₃, 0.5 g/l K₂HPO₄, 0.5 g/l MgSO₄.7H₂O, 0.01 g/l FeSO₄) supplemented with 30 μg/ml of phleomycin.

P. chrysogenum liquid cultures were initiated by inoculating fresh spores from a Power medium plate (25 g/l sucrose, 5 g lactose, 2.5 g bacto peptone, 0.5 g corn steep solids, 52 g/ 1 KCl, 1 g/l NaNO3, 0.25 g/l K₂HPO₄, 0.275 g/ 1 MgSO₄·7H₂O, 2 g/l NaCl, 0.5 mg/l CuSO₄·7 H₂O, 1.5 mg/ 1 FeCl₃·6H₂O, 30 mg/l KH₂PO₄, 20 g/l agar, pH 6.75) into a complex inoculum medium. After incubation at 25 °C for 24 h in an orbital shaker (250 rev/min), aliquots were inoculated in complex production (CP) medium (Ullán et al. 2008a, b). Samples were taken every 24 h and the mycelium was separated from the fermentation broth by centrifugation at $3,000 \times$ g for 30 min. Penicillin production was determined from the supernatant by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis as described previously (Ullán et al. 2008a, b). The mycelium was washed with 0.9 % NaCl, 0.1 M HCl, and water (twice) by vortexing and centrifugation at $3,000 \times g$ for 15 min after each wash. Finally, after the last wash, the mycelium was dried in an oven at 80 °C for 7 days, with the dry weight per volume of medium calculated.

DNA isolation and Southern blotting

Genomic DNA from all the *P. chrysogenum* strains was isolated from mycelium grown in MPPY medium following the protocol described by Casqueiro et al. (1999). Samples (2–4 μ g) of *P. chrysogenum* genomic DNA were digested with appropriate endonucleases and separated in 0.7 % agarose gels. The gels were blotted onto Hybond-NX membranes (Amersham Biosciences) and hybridized with different probes (see "Results") as described before (Ullán et al. 2007).

Plasmid constructions

ppaaT-RNAi This plasmid was designed to silence *paaT* gene. The whole *paaT* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) reaction using as template genomic DNA from *P. chrysogenum* Wisconsin 54–1255 and as primers the oligonucleotides cTPC-DsRed-F and SBRT-R (see the description of pSpaaT). The PCR product was digested with *NcoI* and the fragment of 472 bp with *NcoI* ends was cloned into the *NcoI* site of the pJL43RNAi vector (Ullán et al. 2008a).

pSpaaT This vector contains the *paaT* gene under control of the strong fungal promoter of the *gdh* (glutamate dehydrogenase) gene of *Aspergillus awamori* (Cardoza et al. 1998) and the transcriptional terminator of the *cyc1* (cytochrome c1) gene of *Saccharomyces cerevisiae* (Russo et al. 1991). The 1.813-kb *paaT* gene was amplified by PCR using the genomic DNA of *P. chrysogenum* and oligonucleotides cTPC-DsRed-F (5'-GGAAGATCTATGGAAGGCTCC ACGGTCAGAC-3') and SBRT-R (5'-GATATCTTATGCCT TGATGGCTTTCTC-3') as primers (sequences corresponding to the *BglII* and *EcoRV* restriction sites are italicized). The 1.813-kb PCR product was cloned in the *BglII–StuI* sites of pIBRC43BgIII plasmid (Kosalkova et al. 2009). This plasmid was constructed to increase the expression of the *paaT* gene.

ppaaT–DsRed The fused paaT–DsRed gene was made by inserting a 2.6-kb BglII–SmaI DNA fragment, obtained by PCR using oligonucleotides cTPC-DsRed-F (see description of pSpaaT) and cTPC-DsRed-R (5'-GATATCTGCCTTGATGGCTTTCTCCTC-3') as primers (sequence corresponding to the EcoRV restriction site is italicized) and genomic DNA of the parental strain as template into the BglII–SmaI sites of pExpDsRed (Ullán et al. 2010). In this construction, the paaT gene is fused to a DsRed fluorescent reporter gene, from Discosoma sp. (Clontech), under the control of the gdh promoter of A. awamori (Cardoza et al. 1998) and the cyc1 terminator of S. cerevisiae (Russo et al. 1991).

RNA extraction and northern analysis

Total RNA from *P. chrysogenum* was isolated from mycelium grown in CP medium for 60 h. Total *P. chrysogenum* RNA extraction and northern blotting hybridization were carried out as described previously (Ullán et al. 2007). For hybridizations, the following probes were used: (1) a 526-bp DNA fragment of *actA* gene obtained by PCR using the RT/ actA-F (5'-CTGGCCGTGATCTGACCGACTAC-3') and RT/actA-R (5'-GGGGGAGCGATGATCTTGACCT-3') oligonucleotides as primers and genomic DNA of the parental strain as template and (2) a 472-bp *NcoI* DNA exonic fragment of *paaT* gene.

P. chrysogenum transformation

The transformation of *P. chrysogenum* protoplasts was performed as described previously (Ullán et al. 2007). Transformants were selected in solid Czapek minimal medium supplemented with sorbitol (1 M) as osmotic stabilizer and phleomycin (30 μ g/ml) as the selection agent.

HPLC determination of IPN and benzylpenicillin

Benzylpenicillin and IPN production levels by the *P. chrysogenum* strains were determined by HPLC as described previously by Ullán et al. (2008a).

Determination of intracellular benzylpenicillin

The mycelia from *P. chrysogenum* cultures in CP medium were collected after 72 h, washed with 0.9 % NaCl, frozen, and then disrupted by grinding them in a mortar with liquid nitrogen. Cell extracts were suspended in 10 mM Tris–HCl, pH 7.0, and centrifuged at $14,025 \times g$ for 5 min at 4 °C. Proteins were precipitated by adding one volume of cold methanol and centrifuged at $14,025 \times g$ for 10 min at 4 °C. The resultant supernatant was collected and the methanol removed under reduced pressure conditions using a SpeedVac concentrator. Benzylpenicillin was extracted with ethyl acetate and its concentration was determined by HPLC.

Fluorescence microscopy

For confocal laser scanning microscopy studies, the *P. chrysogenum* strains were grown in CCM medium (Minuth et al. 1982). For this purpose, *P. chrysogenum* liquid cultures were initiated by inoculating fresh spores (2×10^9) from a power medium plate into CCM medium. After incubations at 27 °C for 24 h in an orbital shaker (180 rev/min), aliquots [0.05 % (*w*/*v*)] were inoculated in the same medium. Samples were taken after at 36 h and the fluorescence was observed using a laser confocal microscope ECLIPSE TE2000-U C1 (Nikon). Enhanced green fluorescent protein (EGFP) was visualized with a filter CH2 (488 nm; 590/50 nm), whereas red fluorescent protein (DsRed) was observed with a filter CH3 (543 nm; 650/LP). The images obtained were processed using the Nikon EZ-C1 3.6 software.

Results

Identification and characterization of a P. chrysogenum gene homologous to cefT

In order to clarify the role of the MFS proteins in penicillin biosynthesis and secretion, a search of genes encoding

membrane proteins related to the MFS protein CefT (an *A. chrysogenum* transporter involved in the secretion of hydrophilic β -lactam that confers resistance to phenylacetic acid) (Ullán et al. 2002, 2008b) was made in the *P. chrysogenum* genome (van den Berg et al. 2008). Six MFS proteins were found with an identity between 40 and 72 % with CefT. The protein which showed the highest identity percentage, CAP95027 (encoded by the Pc21g01300 gene), was studied in detail. This protein has 548 amino acid residues and a deduced molecular mass of 68.84 kDa.

The CAP95027 protein shows a high percentage of identity throughout its entire sequence with other MFS multidrug transporters of Aspergillus oryzae (XP 001822577) (identical amino acids, 81.1 %; positive amino acids, 94.9 %), Aspergillus clavatus (XP 001276260) (80.0 and 93.3 %), Aspergillus nidulans (XP 681391.1) (76.8 and 90.8 %), Aspergillus fumigatus (XP 748072) (77 and 91.3 %), Penicillium marneffei (XP 002147590) (75.0 and 89.4 %), and A. chrysogenum (CAD32176) (72.4 and 89.5 %) (see Fig. S1 of the "Electronic supplementary material"). A. nidulans and A. oryzae are known to produce penicillin, and their orthologous genes may play a role similar to that of Pc21g01300 in P. chrysogenum (see the following discussion). However, a homologous gene is also present in non-producers of penicillin, suggesting that the natural role of the protein is broader than a role strictly limited to the transport of penicillin precursors (see "Discussion").

Computer analysis of the CAP95027 topology with five different computer programs [TopPred2 (http://bioweb. pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html), SOSUI (http:// bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html), TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), HMMTOP (http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html), and TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_ form.html) indicated that it is a highly hydrophobic protein containing 12 transmembrane spanners (TMSs).

The analysis of Pex19 (peroxisome biogenesis factor 19) binding sequences (http://www.peroxisomedb.org/) in the CAP95027 protein revealed one putative Pex19 binding site (Rottensteiner et al., 2004) between amino acids 258 and 269 (see Fig. S1 of the "Electronic supplementary material"). The presence of this domain makes the CAP95027 protein susceptible of being inserted in the peroxisome membrane through a system involving this import receptor for peroxisomal membrane proteins. All of these observations suggested that CAP95027 (renamed PaaT) may be a peroxisomal membrane protein (Heiland and Erdmann 2005) (see the following paragraphs).

Silenced Pc21g01300 transformants contain an intact endogenous gene

In order to study the role of Pc21g01300 gene (renamed *paa*T; see the following paragraphs) in relation to penicillin

biosynthesis, the expression of this gene was silenced using small interference RNAs, a technique that has been successfully used in P. chrysogenum (Ullán et al. 2008a; Kosalkova et al. 2009; García-Estrada et al. 2011). For the silencing strategy, the ppaaT-RNAi vector was constructed (see "Plasmid constructions") (Fig. 1a, b) and transformants of P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 were selected by their resistance to phleomycin. The correct integration of the PgpdA-paaT exonic fragment-PpcbC silencing cassette (Fig. 1b) was analyzed by Southern blot hybridization in eight transformants (selected at random) and the parental strain (negative control). Genomic DNAs of the transformants and the parental strain were digested with the restriction enzyme SalI and hybridized with a 472-bp exonic fragment of *paaT* as probe (Fig. 1a). Results showed a hybridization band of 7.5 kb corresponding to the endogenous gene in all transformants (Fig. 1c, lanes 1-9), which indicates that the endogenous paaT gene remains intact. All transformants showed an additional band of 1.6 kb, corresponding to the correct integration of the silencing cassette in their genome without any reorganization (Fig. 1c, lanes 1-8). Six transformants, SilT-2 (Fig. 1c, lane 1), SilT-6 (Fig. 1c, lane 2), SilT-10 (Fig. 1c, lane 3), SilT-12 (Fig. 1c, lane 4), SilT-23 (Fig. 1c, lane 7), and SilT-30 (Fig. 1c, lane 8), were selected to continue the following analyses.

The *paaT* gene is silenced in the SilT transformants

To confirm a possible connection between the silencing of *paaT* and its effect on penicillin production, the expression level of the *paa*T gene and the *pcbC* and *penDE* biosynthetic genes in the transformants and the parental strain was analyzed using northern blot hybridization. Samples of the parental strain and its derived transformants (SiIT-2, SiIT-6, SiIT-10, SiIT-12, SiIT-23, and SiIT-30) were collected after 60 h of growth in penicillin production conditions (CP medium containing 4 g/l of phenylacetic acid). Total RNAs were obtained from these samples and then hybridized with the corresponding probes as indicated in "RNA extraction and northern analysis" of "Materials and methods". The expression level deduced from the housekeeping *P. chrysogenum actA* gene was used as the internal control.

Northern blot hybridization results (Fig. 2a, b) showed a high expression of paaT in the parental strain and an effective silencing of the expression of this gene in all of the transformant strains tested. The reduction of the paaT expression levels in the silenced strains (Fig. 2b) ranges from 20 % (in transformant SiIT-6) to 90 % (in SiIT-23).

The *paaT* knock-down strains showed a clear reduction in benzylpenicillin production

In order to analyze the effect of the PaaT protein in the process of penicillin biosynthesis in *P. chrysogenum*,

Fig. 1 Silencing strategy of the Pc21g01300 (paaT) gene in P. chrysogenum and molecular analysis of the transformants. a Map of the 7.5-kb genomic fragment containing the Pc21g01300 (paaT) gene showing the 472 bp NcoI exonic DNA fragment used as a probe. b Physical map of the ppaaT-RNAi plasmid which carries the silencing cassette PgpdA-ppaaT (exonic fragment)-PpcbC. c Southern blot hybridizations of SalIdigested genomic DNA from several transformants with an internal probe to the paaT gene. Lane M, size markers (Lambda DNA/HindIII digested); lane 1, transformant SilT-2; lane 2, SilT-6; lane 3, SilT-10; lane 4, SilT-12; lane 5, SilT-18; lane 6, SilT-22; lane 7, SilT-23; lane 8, SilT-30; and lane 9, P. chrvsogenum Wisconsin 54-1255. Note that full integration of the silencing cassette (1.6 kb) is achieved with all transformants

A

С



Fig. 2 Northern blot analysis showing the expression of the *paaT* gene in P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 and its silenced and overexpressed transformants. a Northern hybridization of total RNA of P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 (WIS-54), SilT-2, SilT-6, SilT-10, SilT-12, SilT-23, and SilT-30 with DNA probes of the actA (encoding the γ -actin) and *paaT* genes. Transcript levels of the *paaT* (b) gene quantified by northern hybridization. c Northern hybridization of total RNA of P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 (WIS-54), SBRT-48, SBRT-139, SBRT-154, and SBRT-156 with DNA probes of the paaT

and *actA* genes. Transcript levels of the *paaT* (\mathbf{d}) gene quantified by northern hybridization. The quantification of the gene expression levels was done by measuring the integral optic density (IOD) using the Gel-Pro Analyzer 3.1 program (Media Cybernetics) and normalized with values obtained from the actA. Those values corresponding to the expression of the paaT gene in the Wisconsin 54-1255 strain were set to 100. Relative IOD values shown in b and d correspond to the mean plus standard deviation of three independent measurements

ble

Tcyc1 Sall

Pocho

penicillin production was assessed in the knock-down transformants (SilT-2, SilT-6, SilT-10, SilT-12, SilT-23, and SilT-30) as well as in the parental strain. Samples were taken from three biological replicates grown in CP medium for 24, 48, and 72 h and analyzed by HPLC (Fig. 3).

The results of fermentations (Fig. 3a) showed a clear reduction in the specific production of benzylpenicillin in all the silenced strains in comparison to the parental strain at 72 h. Benzylpenicillin production decreased by 44 % in transformant SilT-10, 40 % in SilT-6, 38 % in SilT-2, and 25 % in transformants SilT-12, SilT-23, and SilT-30. The knock-down strains showed similar intracellular levels of benzylpenicillin (Fig. 3c), which is known to be a small nearly constant level since most of the penicillin is efficiently secreted.

Interestingly, the IPN production remained similar to that observed in the control strain (Fig. 3b), suggesting that PaaT exerts its main effect at a point during the conversion of IPN into benzylpenicillin. PaaT can achieve this through the transport of the intermediates for the last step of the benzylpenicillin biosynthesis in the peroxisomal lumen (see "Discussion"). Similar results were obtained after fermentations in defined production medium (data not shown).

Overexpression of the *paaT* gene increases the benzylpenicillin production but not that of IPN

To study the effect of the overexpression of *paaT*, the integrative plasmid pSpaaT ("Plasmid constructions") was used. In this plasmid, the *paaT* gene is under the control of the strong *A. awamori gdh* gene promoter that is not induced by phenylacetic acid (Fig. S2A of the "Electronic supplementary material"). Plasmid pSpaaT was cotransformed into protoplasts of the *P. chrysogenum* Wis 54–1255 strain together with the helper plasmid pJL43 bearing the pheomycin-resistant cassette (suitable for transformant selection) (Gutiérrez et al. 1997). Several phleomycin-resistant transformants selected at random were studied by Southern hybridization procedure to examine the correct

Fig. 3 Beta-lactam production by the untransformed P. chrvsogenum Wisconsin 54-1255 and the paaT silenced transformants. Specific benzylpenicillin (a) and IPN (b) production in the parental strain (WIS-54) and its derived transformants (SilT-2, SilT-6, SilT-10, SilT-12, SilT-23, and SilT-30) using complex production medium in the fermentation process. c Intracellular levels of benzylpenicillin in the same strains and using the same fermentation conditions. All of these measurements were determined by HPLC. The error bars in the graphs indicate the standard deviations of data



integration (not rearranged) of *paaT* overexpression cassette (Pgdh-*paaT*-Tcyc1) (Fig. S2A of the "Electronic supplementary material").

Genomic DNAs of ten transformants and of the parental strain were digested with a *Sall–SmaI* enzymatic mixture and then hybridized using as probe the same exonic fragment of *paaT* previously used in the silencing process. The results of the hybridization showed in five of the transformants analyzed the presence of a 2.87-kb band corresponding to the correct integration of the full overexpression cassette in the fungal genome in addition to the 6.6-kb band of the intact endogenous *paaT* gene. The positive transformants detected were SBRT-48 (Fig. S2B, lane 3 of the "Electronic supplementary material"), SBRT-139 (Fig. S2B, lane 7 of the "Electronic supplementary material"), and SBRT-156 (Fig. S2B, lane 10 of the "Electronic supplementary material").

Northern blotting was carried out to confirm the overexpression of the *paaT* gene (Fig. 2c, d). Total RNA was extracted at 60 h from mycelia of the *P. chrysogenum* Wis54-1255 strain and the *paaT* overexpressed transformants. As shown in Fig. 2d, the steady-state levels of the *paaT* transcript were increased in the SBRT transformants. This increment ranges from 10 % (in transformant SBRT-156) to 56 % (in SBRT-139).

In order to analyze the effect of *paaT* overexpression in the process of penicillin biosynthesis in P. chrysogenum, benzylpenicillin and IPN production was quantified in the overexpressed transformants and the parental strain, as control, in CP medium. Three biological replicates were used for each strain and samples were taken every 24 h and analyzed by HPLC. Fermentation results showed that overexpression of *paaT* enhanced benzylpenicillin production in all transformed strains. The increment with respect to the parental strain ranged from 30 to 100 % (Fig. 4a, b). Moreover, IPN concentration was reduced with respect to the parental strain at later times of fermentation (Fig. 4b), which agrees with its increased conversion to benzylpenicillin. These results indicate that the overexpression of *paaT* increases the conversion of IPN into benzylpenicillin probably as a result of a higher phenylacetic acid transport across the peroxisomal membrane (see the following paragraphs).

The toxicity of phenylacetic acid is increased or decreased, respectively, in *paaT*-silenced and *paaT*-overexpressing transformants

Phenylacetic acid is known to be toxic at high concentrations for *P. chrysogenum* (Barrios-González et al. 1993; Henriksen et al. 1998; Lamas-Maceiras et al. 2006). Since the transcription of Pc21g01300 was highly induced by phenylacetic acid (van den Berg et al. 2008), the PaaT protein was tested to check whether it had any role in phenylacetic acid detoxification and tolerance. To analyze this hypothetical role, 5 μ l of fresh spores (10⁶ spores/ml) of knock-down and overexpressing transformants and the parental strain were inoculated in the center of Power medium (which supports good growth and sporulation) plates containing increasing concentrations of phenylacetic acid (2, 4, and 8 mg/ml). A plate of Power medium free of phenylacetic acid was also inoculated for each of the strains tested, and the radial growth of the colony developed on this phenylacetic acid-free medium was considered as the standard growth in each case. The plates were incubated at 28 °C for 3 days and the diameters of the colonies (radial growth) were measured. The percentage of reduction of vegetative growth with the increasing concentrations of phenylacetic acid (Table 1) showed that *paaT*-overexpressing strains exhibited higher growth than the wild-type strain in the presence of phenylacetic acid. In contrast, the silenced strains had increased sensitivity to phenylacetic acid (lower radial growth rate) than the parental strain. These results indicate that the paaT gene product stimulates the resistance of P. chrysogenum to phenylacetic acid probably by enhancing its transport across the peroxisomal membrane. Inside the peroxisome, this toxic compound is used in the formation of benzylpenicillin or fully degraded towards its complete detoxification (see "Discussion").

The PaaT protein is located in the membrane of peroxisomes

To determine the subcellular location of PaaT, the hybrid red fluorescent protein PaaT–DsRed was expressed in cells of *P. chrysogenum* Wisconsin 54–1255 using the integrative plasmid pPaaT–DsRed (which bears the expression cassette for the PaaT protein) (Fig. S3A of the "Electronic supplementary material"). In the same cells, the peroxisome-targeted green fluorescent protein EGFP–SKL was simultaneously expressed (Fig. S3A of the "Electronic supplementary material") by means of the integrative plasmid p43EGFP–SKL [which contains the expression cassette for EGFP–SKL protein and the phleomycin resistance cassette for transformant selection (Ullán et al. 2010)].

After the cotransformation with plasmids ppaaT-DsRed and p43EGFP-SKL, two phleomycin-resistant transformants (TDsRed-2 and TDsRed-8) were analyzed by Southern hybridization to examine the correct integration of both Pgdh-paaT-DsRed-Tcyc1 (Fig. S3B of the "Electronic supplementary material") and PpcbC-EGFP-SKL-TpenDE (Fig. S3C of the "Electronic supplementary material") cassettes. To test the correct integration of PgdhpaaT-DsRed-Tcyc1, the total DNA of the transformants and the parental strain Wis 54–1255 was extracted, digested with an enzymatic combination SaII-HindII, and then hybridized using as labeled probe the DsRed gene. The Fig. 4 Production of betalactams by transformants overexpressing *paaT*. Specific benzylpenicillin (a) and IPN (b) production of the *P. chrysogenum* Wisconsin 54–1255 strain (WIS-54) and the *paaT*-overexpressing transformants (SBRT-48, SBRT-139, SBRT-154, and SBRT-156) grown in CP medium. Antibiotics were measured by HPLC. *Error bars* indicate the standard deviations of data



positive transformant TDsRed-8 (Fig. S3B, lane 3 of the "Electronic supplementary material") showed a 3.6-kb band. To test the correct integration of the cassette PpcbC– EGFP–SKL–TpenDE, genomic DNAs were digested with the restriction enzyme NotI and then hybridized with an

Table 1 Reduction of vegetative growth (%) of the *P. chrysogenum* Wisconsin 54–1255 strain (WIS-54) and the *paaT* knock-down and overexpressing transformants with different concentrations of phenylacetic acid. Note that whereas *paaT*-overexpressing transformants grow better than the parental strain, the knockdown transformants exhibit the opposite behavior

Strains	Phenylacetic acid concentration						
	0.2 %	0.4 %	0.8 %				
WIS-54 (control)	30.55 ± 0.30^{a}	41.48±1.56	$50.00 {\pm} 0.00$				
SilT-2	43.14 ± 1.81	49.51 ± 1.95	53.18±1.90				
SilT-6	$44.65 {\pm} 0.60$	$49.50 {\pm} 0.70$	54.33±1.99				
SilT-12	45.15 ± 0.13	51.39 ± 3.33	55.14±0.86				
SilT-10	43.03 ± 3.21	$41.34{\pm}1.92$	58.68±1.83				
SilT-23	$36.93 {\pm} 2.81$	$52.30{\pm}5.94$	56.63±4.63				
SilT-30	$35.92{\pm}1.64$	$49.39{\pm}0.84$	54.69±1.20				
SBRT-48	$16.75 {\pm} 7.03$	36.09 ± 1.97	41.94±6.67				
SBRT-139	$18.63 {\pm} 2.14$	26.59 ± 1.93	34.68±1.83				
SBRT-154	$21.88 {\pm} 4.13$	$36.82{\pm}0.94$	41.04±0.86				
SBRT-156	$21.28{\pm}0.63$	$33.98 {\pm} 1.98$	40.37±1.78				

^a Standard deviation of the mean values

EGFP probe. The positive transformants, carrying the cassette of interest, TDsRed-2 and TDsRed-8, showed the expected 2.1-kb band (Fig. S3C of the "Electronic supplementary material").

Transformant TDsRed-8, containing the expression cassettes for both fluorescent proteins integrated in its genome (Fig. S3 of the "Electronic supplementary material"), and the parental strain were subjected to fluorescent laser scanning microscopy studies (Fig. 5). Images obtained from these analyses revealed that the protein PaaT is located in peroxisomes since the red fluorescence (coming from PaaT-DsRed protein) (Fig. 5a) and the green fluorescence (from the green fluorescent protein) (Fig. 5b) were completely coincident in defined small round-shaped microbodies that appeared in yellow color due to the superposition of both fluorescences (Fig. 5c). These small rounded yellow microbodies unquestionably represent the peroxisomes of P. chrysogenum given that the peroxisome-targeted protein EGFP-SKL is strictly confined to these areas (Fig. 5b, c). Based on these results and since PaaT has a Pex19 binding domain and a topological structure with 12 TMSs, it seems that PaaT is located in the peroxisomal membrane.

Discussion

Considerable progress has been made in the last decade on the knowledge of the biosynthesis of different fungal Fig. 5 Subcellular location of PaaT in cells of *P. chrysogenum*. Hyphae of the *P. chrysogenum* TDsRed-8 strain were taken from cultures of 72 h in CCM medium. They were prepared to be observed by phase contrast and confocal laser scanning microscopy as indicated in "Materials and methods". **a** Merged image (phase contrast and fluorescence images integrated) showing the green fluorescence coming from EGFP–SKL protein, showing its location in peroxisomes. **b** Merged images showing the red fluorescence coming from PaaT–DsRed protein showing its location. **c** Merged image showing yellow-colored areas, where red and green fluorescences are coincident, thus proving the presence of PaaT in the peroxisomes of *P. chrysogenum*. The *arrows* indicate some of the fluorescence images showing peroxisomal locations. The *bar* represents 9.3 μ m

secondary metabolites (Keller et al. 2005; Yin and Keller 2011). The biosynthesis of many of these secondary metabolites is complex and frequently involves more than ten enzymatic steps (García-Estrada et al. 2011). Some of these steps are performed in the cytosol, but several others are performed in microbodies, notably in peroxisomes (Teijeira et al. 2009; Ullán et al. 2010) or in vesicules (Linz et al. 2012) [see reviews by Roze et al. (2011) and Martín et al. (2012)]. The compartmentalization on some biosynthetic enzymes implies the need for transport of intermediates between the cytosol and microbodies, in which the enzymes are located (van den Berg et al. 2008).

The pathway of benzylpenicillin biosynthesis has been largely elucidated (Aharonowitz et al. 1992; Martín et al. 2010), although the molecular mechanisms underlying some of the final steps remain obscure (García-Estrada et al. 2008). Due to the good knowledge on the molecular genetics and the biochemistry of penicillin biosynthesis, P. chrysogenum is a good model to study the cell biology of secondary metabolite biosynthetic enzymes. Whereas the first two enzymatic reactions [catalyzed by ACV synthase and IPN synthase] occur in the cytosol (van de Kamp et al. 1999; Fernández-Aguado et al. 2012), the final step for benzylpenicillin biosynthesis takes place in peroxisomes (Müller et al. 1991, 1992; García-Estrada et al. 2008). In the peroxisomal matrix, indeed a phenylacetyl-CoA ligase (Lamas-Maceiras et al. 2006) and some other related acyl-CoA ligases (Koetsier et al. 2009, 2010; Yu et al. 2011) activate the phenylacetic acid to phenylacetyl-CoA and transfer it to the IAT to form benzylpenicillin. However, the transport mechanisms through the peroxisomal membrane of both benzylpenicillin precursors IPN and phenylacetic acid are still unknown.

In *A. chrysogenum*, our studies showed that the IPN epimerization step probably takes place in peroxisomes since the enzymes involved have PTS-1 (or PTS-2) targeting signals and there are two specific transport systems for the cephalosporin C intermediates IPN and penicillin N (Teijeira et al. 2009; Ullán et al. 2010). In this cephalosporin C producer fungus, the CefT protein confers resistance to phenylacetic









acid (Ullán et al., 2002), and it is involved in the traffic of β lactam intermediates across the fungal cell membranes (Nijland et al. 2008; Ullán et al. 2008b).

As reported here, a gene was identified in P. chrysogenum (paaT) similar to the cefT gene (Ullán et al. 2002) that encodes a protein of the MFS family. It is important to note that the expression of this gene is drastically activated by phenylacetic acid: 22.7-fold in Wis-54-1255 and up to 170fold in an industrial strain (van den Berg et al. 2008; Harris et al. 2009). Bioinformatic analysis of the PaaT protein topology indicated that this protein has 12 TMSs and the conserved motifs of members of the MFS protein family. Computer analysis also revealed the presence of a Pex19p binding domain (located between amino acids 258 and 269) characteristic of proteins that are recruited by the peroxin Pex19 to be incorporated in the peroxisomal membrane (Rottensteiner et al. 2004). Proteins highly similar to PaaT occur not only in the genome of A. orvzae and A. nidulans that produce penicillin but also in the genome of A. fumigatus, A. clavatus, and other fungi that do not contain the penicillin gene cluster, suggesting that in all those fungi this protein is involved in the transport of a small molecule different from beta-lactams (IPN or other penicillins) themselves. Since the homologue *cefT* gene confers resistance to phenylacetic acid (Ullán et al., 2002) and since the silencing and overexpression of *paaT* affect the phenylacetic acid resistance in P. chrysogenum, the most likely substrate for PaaT is phenylacetic acid or a similar aromatic organic acid.

Fluorescent microscopy results with proteins PaaT– DsRed and EGFP–SKL (control protein with a SKL targeting sequence targeted to peroxisomes) indicate that PaaT is located in the peroxisomal membrane in *P. chrysogenum*, which was supported by the colocalization of both fluorescent proteins.

To study the PaaT protein role in penicillin biosynthesis, the gene *paaT* was silenced. Several knock-down transformants showed a clear reduction in benzylpenicillin production in agreement with the reduced import of a precursor into the peroxisomes and with the known location of phenylacetil– CoA ligase in peroxisomes (Lamas-Maceiras et al., 2006). Nevertheless, in all silenced strains, IPN production and the intracellular benzylpenicillin levels showed only small changes with respect to those of the parental strain.

An interesting finding of our work is the relation between silencing or overexpression of *paaT* and the detoxification of phenylacetic acid in *P. chrysogenum*. The toxic phenylacetic acid taken up into the cytosol is detoxified by at least two mechanisms: (1) degradation by phenylacetic monooxygenases (Rodríguez-Saiz et al. 2001, 2005), which degrades the ring structure to acetoacetate by the homogentisate pathway and (2) by internalization into peroxisomes and conversion into benzylpenicillin (Lamas-Maceiras et al. 2006; Harris et al. 2009). Therefore, PaaT is part of an efficient detoxification mechanism that is common to beta-lactam-producing and beta-lactamnon-producing fungi. Unlike *P. chrysogenum* in the cephalosporin producer *A. chrysogenum*, the PaaT homologous protein (CefT) involved in the detoxification of phenylacetic acid (Ullán et al. 2002) is a resident protein of the plasma membrane (Nijland et al., 2008). This fact shows that PaaT homologues are not necessarily located in the peroxisomal membrane in other fungi, and thus the phenylacetic acid presumably transported by PaaT does not necessarily have to enter in the peroxisomes, where its accumulation could have a toxic effect over the cell. The degradation of phenylacetic acid through oxygenases is poor in the wild-type strain of *P. chrysogenum* NRRL 1951 as compared to degradation in *A. nidulans* (Rodríguez-Saiz et al. 2001, 2005) and is only residual in the improved producer Wisconsin 54–1255 used in this work (García-Estrada et al., unpublished manuscript).

Recent evidence in several filamentous fungi indicates that some steps of aflatoxin biosynthesis are located in microbodies named aflatoxisomes (Roze et al. 2011) and the same seems to be true for other less known secondary metabolite-producing fungi (reviewed in Martín et al. (2012)). In P. chrysogenum, it is well known that phenylacetyl-CoA ligase activates phenylacetic acid (Lamas-Maceiras et al. 2006) and that the IAT are located in peroxisomes (Müller et al. 1991; García-Estrada et al. 2008). The increased sensitivity of the silenced transformants to phenylacetic acid is due to a reduced ability to detoxify phenylacetic acid through its conversion to benzylpenicillin, and the opposite is true in the *paaT* overexpressing transformants, which results in increased detoxification through an enhanced conversion to benzylpenicillin. The increased detoxification of phenylacetic acid by this mechanism was indeed reported as one of the methods for the selection of high-penicillin-producing mutants (Barrios-González et al. 1993). This kind of side-chain precursors of the penicillin biosynthetic pathway is probably transported from the cytosol to the peroxisomal matrix by PaaT (protein-mediated transport) to be incorporated to the β -lactam end-product.

Acknowledgments This work was supported by grants of the European Union (projects EUROFUNG and EUROFUNGBASE). Marta Fernández-Aguado was supported by a grant for recent graduate researcher staff training program from the Junta de Castilla y León and co-financed by the European Social Fund [grant number Q2432001B]. We acknowledge the excellent technical assistance of A. Sánchez-Rodríguez, B. Martín, J. Merino, A. Casenave, and A. Mulero.

References

- Aharonowitz Y, Cohen G, Martín JF (1992) Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. Annu Rev Microbiol 46:461–495. doi:10.1146/ annurev.mi.46.100192.002333
- Álvarez E, Cantoral JM, Barredo JL, Díez B, Martín JF (1987) Purification to homogeneity and characterization of acyl

coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. Antimicrob Agents Chemother 31:1675–1682. doi:10.1128/AAC.31.11.1675

- Álvarez E, Meesschaert B, Montenegro E, Gutierrez S, Díez B, Barredo JL, Martín JF (1993) The isopenicillin-N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* has isopenicillin-N amidohydrolase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single *penDE* gene. Eur J Biochem 215:323–332. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18038.x
- Barrios-González J, Eduardo Montenegro E, Martín JF (1993) Penicillin production by mutants resistant to phenylacetic acid. J Ferment Bioeng 76:455–458. doi:10.1016/0922-338X(93)90240-9
- Cantoral JM, Díez B, Barredo JL, Álvarez E, Martín JF (1987) Highfrequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. Nat Biotechnol 5:494–497. doi:10.1038/nbt0587-494
- Cardoza RE, Moralejo FJ, Gutiérrez S, Casqueiro J, Fierro F, Martín JF (1998) Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. Curr Genet 34:50–59. doi:10.1007/s002940050365
- Casqueiro J, Gutierrez S, Bañuelos O, Hijarrubia MJ, Martín JF (1999) Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. J Bacteriol 181:1181– 1188
- Díez B, Gutierrez S, Barredo JL, van Solingen P, van der Voort LH, Martín JF (1990) The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. J Biol Chem 265:16358–16365
- Fernández-Aguado M, Teijeira F, Martín JF, Ullán RV (2012) A vacuolar membrane protein affects drastically the biosynthesis of the ACV tripeptide and the beta-lactam pathway of *Penicillium chrysogenum*. Appl Microbiol Biotechnol. doi:10.1007/s00253-012-4256-0
- Fernández-Cañón JM, Reglero A, Martínez-Blanco H, Ferrero MA, Luengo JM (1989a) Phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54–1255: molecular specificity of its induction. J Antibiot (Tokyo) 42:1410–1415. doi:10.7164/ antibiotics.42.1410
- Fernández-Cañón JM, Reglero A, Martínez-Blanco H, Luengo JM (1989b) Uptake of phenylacetic acid by *Penicillium chrysogenum* Wis 54–1255: a critical regulatory point in benzylpenicillin biosynthesis. J Antibiot (Tokyo) 42:1398–1409. doi:10.7164/ antibiotics.42.1398
- Fierro F, Barredo JL, Díez B, Gutiérrez S, Fernández FJ, Martín JF (1995) The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. Proc Natl Acad Sci U S A 92:6200–6204. doi:10.1016/j.fgb.2006.03.001
- García-Estrada C, Vaca I, Fierro F, Sjollema K, Veenhuis M, Martín JF (2008) The unprocessed preprotein form IATC103S of the isopenicillin N acyltransferase is transported inside peroxisomes and regulates its self-processing. Fungal Genet Biol 45:1043–1052. doi:10.1016/j.fgb.2008.03.005
- García-Estrada C, Ullán RV, Albillos SM, Fernández-Bodega MA, Durek P, von Dohren H, Martín JF (2011) A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. Chem Biol 18:1499–1512. doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.012
- Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B, Martín JF (1997) Expression of the *cef*G gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. Appl Microbiol Biotechnol 48:606–614. doi:10.1007/s002530051103
- Harris DM, van der Krogt ZA, Klaassen P, Raamsdonk LM, Hage S, van den Berg MA, Bovenberg RA, Pronk JT, Daran JM (2009) Exploring and dissecting genome-wide gene expression responses of *Penicillium chrysogenum* to phenylacetic acid consumption

and penicillinG production. BMC Genomics 10:75. doi:10.1186/1471-2164-10-75

- Heiland I, Erdmann R (2005) Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. FEBS J 272:2362–2372. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04690.x
- Henriksen CM, Nielsen J, Villadsen J (1998) Modelling of the protonophoric uncoupling by phenoxyacetic acid of the plasma membrane potential of *Penicillium chrysogenum*. Biotechnol Bioeng 60:761–767. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19981220)60:6 < 761::AID-BIT12 > 3.0.CO;2-N
- Hillenga DJ, Versantvoort H, van der Molen S, Driessen A, Konings WN (1995) *Penicillium chrysogenum* takes up the penicillin G precursor phenylacetic acid by passive diffusion. Appl Environ Microbiol 61:2589–2595
- Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism —from biochemistry to genomics. Nat Rev Microbiol 3:937–947. doi:10.1038/nrmicro1286
- Koetsier MJ, Gombert AK, Fekken S, Bovenberg RA, van den Berg MA, Kiel JA, Jekel PA, Janssen DB, Pronk JT, van der Klei IJ, Daran JM (2010) The *Penicillium chrysogenum aclA* gene encodes a broad-substrate-specificity acyl-coenzyme A ligase involved in activation of adipic acid, a side-chain precursor for cephem antibiotics. Fungal Genet Biol 47:33–42. doi:10.1016/ j.fgb.2009.10.003
- Koetsier MJ, Jekel PA, van den Berg MA, Bovenberg RA, Janssen DB (2009) Characterization of a phenylacetate–CoA ligase from *Penicillium chrysogenum*. Biochem J 417:467–476. doi:10.1042/BJ20081257
- Kosalkova K, García-Estrada C, Ullán RV, Godio RP, Feltrer R, Teijeira F, Mauriz E, Martín JF (2009) The global regulator *LaeA* controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. Biochimie 91:214–225. doi:10.1016/j.biochi.2008.09.004
- Lamas-Maceiras M, Vaca I, Rodríguez E, Casqueiro J, Martín JF (2006) Amplification and disruption of the phenylacetyl–CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an arylcapping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. Biochem J 395:147–155. doi:10.1042/ BJ20051599
- Linz JE, Chanda A, Hong SY, Whitten DA, Wilkerson C, Roze LV (2012) Proteomic and biochemical evidence support a role for transport vesicles and endosomes in stress response and secondary metabolism in *Aspergillus parasiticus*. J Proteome Res 11:767–775. doi:10.1021/pr2006389
- Martín JF (2000) Alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetases in beta-lactam producing organisms. From Abraham's discoveries to novel concepts of non-ribosomal peptide synthesis. J Antibiot (Tokyo) 53:1008–1021. doi:10.7164/antibiotics.53.100
- Martín JF, Ullán RV, García-Estrada C (2010) Regulation and compartmentalization of beta-lactam biosynthesis. Microb Biotechnol 3:285–299. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00123.x
- Martín JF, García-Estrada C, Ullán RV (2012) Genes encoding penicillin and cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*: two separate clusters are required. In: Gupta VK and Ayyachamy M (eds) Biotechnology of fungal genes. Science, pp 113–138
- Minuth W, Tudzynski P, Esser K (1982) Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. Curr Genet 5:227–231. doi:10.1007/BF00391811
- Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wosten HA, van der Voort LH, Smaal EB, Verkleij AJ (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. EMBO J 10:489–495
- Müller WH, Bovenberg RA, Groothuis MH, Kattevilder F, Smaal EB, Van der Voort LH, Verkleij AJ (1992) Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. Biochim Biophys Acta 1116:210–213. doi:10.1016/0304-4165(92)90118-E

- Nijland JG, Kovalchuk A, van den Berg MA, Bovenberg RA, Driessen AJ (2008) Expression of the transporter encoded by the *cef*T gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. Fungal Genet Biol 45:1415–1421. doi:10.1016/j.fgb.2008.07.008
- Ramos FR, López-Nieto MJ, Martín JF (1985) Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. Antimicrob Agents Chemother 27:380–387. doi:10.1128/ AAC.27.3.380
- Rodríguez-Saiz M, Barredo JL, Moreno MA, Fernández-Cañon JM, Peñalva MA, Díez B (2001) Reduced function of a phenylacetateoxidizing cytochrome p450 caused strong genetic improvement in early phylogeny of penicillin-producing strains. J Bacteriol 183:5465–5471. doi:10.1128/JB.183.19.5465-5471.2001
- Rodríguez-Saiz M, Díez B, Barredo JL (2005) Why did the Fleming strain fail in penicillin industry? Fungal Genet Biol 42:464–470. doi:10.1016/j.fgb.2005.01.014
- Rottensteiner H, Kramer A, Lorenzen S, Stein K, Landgraf C, Volkmer-Engert R, Erdmann R (2004) Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. Mol Biol Cell 15:3406–3417. doi:10.1091/mbc.E04-03-0188
- Roze LV, Chanda A, Linz JE (2011) Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. Fungal Genet Biol 48:35–48. doi:10.1016/j.fgb.2010.05.006
- Russo P, Li WZ, Hampsey DM, Zaret KS, Sherman F (1991) Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of cyc1 mRNA in the yeast Saccharomyces cerevisiae. EMBO J 10:563–571
- Spröte P, Brakhage AA, Hynes MJ (2009) Contribution of peroxisomes to penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell 8:421–423. doi:10.1128/EC.00374-08
- Teijeira F, Ullán RV, Guerra SM, García-Estrada C, Vaca I, Martín JF (2009) The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production. Biochem J 418:113–124. doi:10.1042/BJ20081180
- Theilgaard HB, Kristiansen KN, Henriksen CM, Nielsen J (1997) Purification and characterization of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Penicillium chrysogenum*. Biochem J 327:185–191
- Theilgaard HA, Nielsen J (1999) Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway: the influence of the LLD-ACV:

bisACV ratio on the flux control. Antonie Van Leeuwenhoek 75:145–154. doi:10.1023/A:1001781808150

- Ullán RV, Liu G, Casqueiro J, Gutierrez S, Bañuelos O, Martín JF (2002) The *cef*T gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. Mol Genet Genomics 267:673–683. doi:10.1007/s00438-002-0702-5
- Ullán RV, Campoy S, Casqueiro J, Fernández FJ, Martín JF (2007) Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. Chem Biol 14:329–339. doi:10.1016/ j.chembiol.2007.01.012
- Ullán RV, Godio RP, Teijeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltrer R, Kosalkova K, Martín JF (2008a) RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression. J Microbiol Methods 75:209–218. doi:10.1016/j.mimet.2008.06.001
- Ullán RV, Teijeira F, Martin JF (2008b) Expression of the Acremonium chrysogenum cefT gene in Penicillum chrysogenum indicates that it encodes an hydrophilic beta-lactam transporter. Curr Genet 54:153–161. doi:10.1007/s00294-008-0207-9
- Ullán RV, Teijeira F, Guerra SM, Vaca I, Martín JF (2010) Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C. Biochem J 432:227–236. doi:10.1042/BJ20100827
- van de Kamp M, Driessen AJ, Konings WN (1999) Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. Antonie Van Leeuwenhoek 75:41–78. doi:10.1023/ A:1001775932202
- van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen AJ, García-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WH, Joardar V, Kiel JA, Kovalchuk A, Martin JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, van der Klei IJ, van Peij NN, Veenhuis M, von Dohren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RA (2008) Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. Nat Biotechnol 26:1161–1168. doi:10.1038/nbt.1498
- Yin W, Keller NP (2011) Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. J Microbiol 49:329–339. doi:10.1007/ s12275-011-1009-1
- Yu ZL, Liu J, Wang FQ, Dai M, Zhao BH, He JG, Zhang H (2011) Cloning and characterization of a novel CoA–ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. Folia Microbiol (Praha) 56:246–252. doi:10.1007/s12223-011-0044-y

The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by the PaaT protein in *Penicillium chrysogenum*

Marta Fernández-Aguado^a, Ricardo V. Ullán^{b*}, Fernando Teijeira^b, Raquel Rodríguez-Castro^b, Juan F. Martín^{a*}

^aArea of Microbiology, Department of Molecular Biology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071, León Spain

^bInstitute of Biotechnology of León (INBIOTEC), Av. Real s/n, 24006 León, Spain

^{*}Co-corresponding authors:

Dr. Juan Francisco Martín. Area of Microbiology, Department of Molecular Biology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071, León Spain. Phone: +34 987 291505; Fax: +34 987 291506. E-mail: jf.martin@unileon.es

Dr. Ricardo Vicente Ullán. Institute of Biotechnology of Leon (INBIOTEC), Av. Real s/n, 24006 León, Spain Phone: +34 987 210308; Fax: +34 987 210388. E-mail: <u>rvicu@unileon.es</u>

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure S1. Alignment of the deduced amino acid sequences of the CAP95027 protein encoded by the Pc21g21300 gene of *P. chrysogenum* with the hypothetical membrane proteins of *Aspergillus oryzae* (XP_001822577), *Aspergillus clavatus* (XP_001276260), *Aspergillus nidulans* (XP 681391.1), *Aspergillus fumigatus* (XP_748072), *Penicillium marneffei* (XP_002147590) and *A. chrysogenum* (CAD32176). The proteins were aligned using the ClustalX program and the identical amino acids are shaded. Note that the amino acid sequenced of the Pex19p binding site in CAP95027 protein (residues 258-269) is boxed

Supplementary Figure S2. Overexpression of the *paaT* gene in *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. (A) Plasmid paa*T* showing the 2.8 kb band that corresponds to the overexpressing Pgdh–*paaT*–Tcyc1 cassette. (B) Southern blot hybridizations of *SalI*/SmaI digested genomic DNA from several transformants with an internal probe to the *paaT* gene. Lane M, size markers (Lambda DNA/*Hind*III digested); lanes 1, *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (WIS-54); 2, SBRT-17; 3, SBRT-48; 4, SBRT-61; 5, SBRT-109; 6, SBRT-124; 7, SBRT-139; 8, SBRT-149; 9, SBRT-154; and 10, SBRT-156. The sizes of the hybridization bands are indicated on the right.

Supplementary Figure S3. Southern blot analysis of the transformant carrying both the fused *paaT-DsRed* and *EGFP-SKL* hybrid genes. (A) Plasmids *ppaaT*-DsRed and p43EGFP-SKL containing the *paaT*-DsRed and the *EGFP-SKL* hybrid genes respectively (B) Southern blot hybridization of *SalI/Hind*II-digested genomic DNA from wild-type Wisconsin 54-1255 (lane 1) and transformants TDsRed-2 (lane 2) TDsRed-8 (lane 3) using as probe the *DsRed* gene. (C) Southern blot hybridization of *Not*I-digested genomic DNA from the parental strain (lane 1), TDsRed-2 (lane 2), and TDsRed-8 (Lane 3) with a labelled probe of the *EGFP-SKL* hybrid gene. Lane M, size markers (lambda DNA/HindIII digested). The sizes of the hybridization bands are indicated on the right.

		10	20	30	40	50	60	70	80
Ρ.	chrysogenum	MEAPRSDQAHTDAT	TPMEAIRTTSI	GTNNYGPVPI	DYLDLPVREV	NDGADLREY	TETRTGEIIF	(PIKSNVTGK	TEDWKM 80
Α.	oryzae	MQDNHLRR	SSDAARTI	.SGSGQDI	DYLDLPVRQV	TRDANLEEYT	TETAAGQIIF	XPVRSAA <mark>S</mark> GKI	MEDWKL 68
Α.	nidulans	MGSNR		GEV	DPTDLPYRTI	TADANIEEY	QETQTGEIAF	(PVRTAD-GR	TEDYKL 52
Α.	clavatus	MSDHLYQQ	PT-RRESI	VGGGDEF	DPLDLPLRQV	TNEANMAEYT	TETVEGNII	(PVKSTATGI	VEDYKL 67
Α.	fumigatus	MSDQQHHQ	DAMRRFSI	.GTGQGQV	/DPLDLP <mark>L</mark> RQV	TNDANMEEYT	TETAAGEIIF	(PVRS <mark>S</mark> ATGK)	VEDWKL 68
Ρ.	marneffei	MSTLGGEA	PPQHAHMRSRI	LSLGYDAGE	DP TGLPFG QV	NEDADLEEYI	TETRTGNIVE	RHTRSNVTGE	VADWKL 74
A.	chrysogenum	MANNSGTTTVQ	LDDVLERSSTI	NTLN	NIDT	QHHEPRTSF#	NNRQQAPAGO	GSSQSDATVG	PRH-KL 65
		0.0	100	110	100	120	140	1 5 0	160
			100		120	130	140	150	100
Ρ.	chrysogenum	VTFT I DDPENPKNW;	SKAFKWYCTMV	VAFTCFVVAF	CSSVITADVE	EGPIEEFG <mark>IG</mark> F	REASLVVITVE	FVIGFGLGPM	VFAPMS 160
Α.	oryzae	VTFT I DDPENPKNW;	SKAFKWYCTMV	VAFTCFVVAF	FASSVITADIE	EGPAEEFGVSF	REVSLVV <mark>V</mark> TVE	FVIGFGVGPM	AFAPMS 148
Α.	nidulans	VTFKVDDPENPKNW	PKWKKWYVIMV	VAFTCFVVAF	FASSVITADIE	EGPAEEFGVSF	REVSLVV V TVE	TVIGFGVGPM	AFAPLS 132
Α.	clavatus	VTFKVDDPENPKNW:	SKA Y KWYCTMV	VV <mark>S</mark> FTCFVVAF	FASSVITADLE	EGPSESFHVSF	EVSLVTITVE	FVIGFGVGPM	VFAPMS 147
A.	fumigatus	VTFKVDDPENPKNW:	SKA Y KWYCTMV	V <mark>S</mark> FTCFVVAF	FASSVITADI	DGPSEAFNVSF	IEASLV TV TVE	TVIGFGVGPM	MFAPLS 148
Ρ.	marneffei	VTFT IN D V ENPKNW;	skafkwy i t a v	IAFTCFIVAF	FASAVITAGLI	DGPARDFHVSN	EVSLLTITVE	FVIGFGVGPM	VFAPLS 154
A.	chrysogenum	VTF AP DDPENPKNW:	SKA <mark>Y</mark> KWYCTLV	VSLTCFVVAF	FASSVI <mark>S</mark> ADII	GVMEEFNVSE	TAALVSISVE	TVVGFGVGPM	VFAPLS 145
		170	180	190	200	210	220	230	240
Ð	chrusogenum	170				210 			240 240
<i>Р.</i>	chrysogenum	170 EIVGRRPVYALTLA	180 LAVIFVIPCAV	190 //SKNIGTLIVC	200 RLIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA		230 I IPMAAFSAAP	240 FIGPAI 240
Р. А.	chrysogenum oryzae nidulans	170 EIVGRRPVYALTLA EMFGRRPVYALTLL	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV	190 /SKNIGTLIVC	200 CRLIDGIAFSA CRAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA	220 ADLWKSEERGY ADLWKNEERGY	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI	240 FIGPAI 240 FLGPAI 228
Р. А. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus	170 EIVGRRPVYALTLA EMFGRRPVYALTLL EMYGRRPVYALTLL EMIGRRPVYATTLL	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV	190 // /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /AENIGTLIVC /SKNIGTLIVC	200 ERLIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTL# APMTLVGGTL# APMTLVGGTL#	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADMWRNEERGV	230 TPMAAFSAAPI TPMAAFSASPI TPMAAFSASPI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212
Р. А. А. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus	170 EIVGRRPVYALTLA EMFGRRPVYALTLL EMYGRRPVYALTLL EMIGRRPVYAITLL	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV	190 // //SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC	200 ERLIDGIAFSA TRAIDGIAFSA TRAIDGIAFSA TRAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADMWRNEERGV ADLWKNEERGV	230 IPMAAFSAAPI IPMAAFSASPI IPMAAFSASPI IPMAAFSASPI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228
Р. А. А. А. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei	170 EIVGRRPVYALTIA EMFGRRPVYALTIL EMYGRRPVYALTIL EMIGRRPVYAITIL EVI GPPDVYAVTIE	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV LAFIFVIPCAV	190 VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC VAENIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC	200 ERLIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI	240 FIGPAI 240 FLGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228
Р. А. А. А. Р.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum	170 EIVGRRPVYALTLA EMFGRRPVYALTLL EMYGRRPVYALTLL EMVGRRPVYATLL EVLGRRPVYAVTLF	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV LAFIFVIPCAV IALIFEIPCAI	190 // /SKNIGTLIVC /AENIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNLGTLIVC /SKNLGTLIVC /SKNLGTLIVC	200 ERLIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGSLA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI	240 FIGPAI 240 FLGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 234
Р. А. А. А. Р. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum	170 EIVGRRPVYALTLA EMFGRRPVYALTLL EMYGRRPVYALTLL EMIGRRPVYATLL EVLGRRPVYAVTLF EVYGRRIIYGSKLL	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV LAFIFVIPCAV IALIFEIPCAU FAVIFVIPCAV	190 VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIVC	200 ERLIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGSLA APMTLVGGSLA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV	230 /PMAAFSAAP /PMAAFSASP /PMAAFSASP /PMAAFSASP /PMAAFSAAP /PMAAFSAAP	240 FIGPAI 240 FLGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 234 FAGPAI 225
Р. А. А. А. Р. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum	170 EIVGRRPVYALTIA EMFGRRPVYALTIL EMYGRRPVYALTIL EMVGRRPVYATIL EVLGRRPVYAVTIF EVYGRRIIYGSKIL	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV LAFIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV	190 VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIVC	200 ERLIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA CRAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV	230 /PMAAFSAAP /PMAAFSASP /PMAAFSASP /PMAAFSASP /PMAAFSAAP /PMAAFSAAP	240 FIGPAI 240 FLGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 234 FAGPAI 225
Р. А. А. А. Р. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum	170 EIVGRRPVYALTIA EMFGRRPVYALTIL EMYGRRPVYALTIL EMVGRRPVYATIL EVLGRRPVYAVTIF EVYGRRIIYGSKLL	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV LAFIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV	190 VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIAC	200 RLIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 234 FAGPAI 225
Р. А. А. А. Р. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum	170 EIVGRRPVYALTLA EMFGRRPVYALTLL EMYGRRPVYAITLL EMVGRRPVYATLL EVLGRRPVYAVTLF EVVGRRIIYGSKLL	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV LAFIFVIPCAV IALIFEIPCAU FAVIFVIPCAV 260	190 VSKNIGTLIVC VAENIGTLIVC VSKNIGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIVC VSKNLGTLIAC	200 RLIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADMWKNEERGV	230 /PMAAFSAAP /PMAAFSASP /PMAAFSASP /PMAAFSASP /PMAAFSAAP /PMAAFSAAP	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 234 FAGPAI 225
Р. А. А. А. Р. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum chrysogenum	170 EIVGRRPVYALTLA EMFGRRPVYALTLL EMYGRRPVYAITLL EMVGRRPVYATLL EVUGRRPVYAVTLF EVYGRRIIYGSKLL 250 GPLVGGYLADNCGWI	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVVFVIPCAV IAVIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV 260 RWI WIOLILA	190 /SKNIGTLIVC /AENIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIAC 270	200 RLIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA 280 VPETFAPILI	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA 290 LKKRAOKLRKA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADMWKNEERGV 300 ADDPKYTTET	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 234 FAGPAI 225
Р. А. А. А. Р. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum chrysogenum oryzae	170 EIVGRRPVYAL/TLA EMFGRRPVYAL/TLL EMYGRRPVYAL/TLL EMVGRRPVYA/TLL EVVGRRPVYAVTLF EVYGRRIIYGSKLL 250 GPLVGGYLADNCGWI GPLAGGYLADAAGWI	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVFVIPCAV IAVIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV 260 RWI <u>VWIOLILA</u> RWIVINLILA	190 /SKNIGTLIVC /AENIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIAC 270 /FVAW/MITFT	200 RLIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA 280 VPETFAPILI	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA 290 LKKRAQKLRKA	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADMWKNEERGV 300 EDDPKYTTET	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /BMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 234 FAGPAI 225 320 KLRIFL 320 KLRIFL 308
Р. А. А. А. Р. А. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum chrysogenum oryzae nidulans	170 EIVGRRPVYAL/TLA EMFGRRPVYAL/TLL EMYGRRPVYAL/TLL EMVGRRPVYAITLL EVVGRRPVYAVTLF EVYGRRIIYGSKLL 250 GPLVGGYLADNCGWI GPLAGGYLADAAGWI GPLAGGFLADASGWI	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVFVIPCAV IAVIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV 260 RWI <u>VWIOLILA</u> RWIVWILILA	190 /SKNIGTLIVC /AENIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIAC 270 /FVAW/MITFT /SFVAW/LITFT	200 RLIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA 280 CVPETFAPILI CVPETFAPILI	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA 290 LKKRAQKLRKA LKRRAKKLRKI	220 ADLWKSEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADLWKNEERGV ADMWKNEERGV 300 ADDWKNEERGV 300	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 225 320 KLRIFL 320 KLRIFL 308 RLRVFL 292
Р. А. А. А. Р. А. А. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum chrysogenum oryzae nidulans clavatus	170 EIVGRRPVYAL/TLA EMFGRRPVYAL/TLL EMFGRRPVYAL/TLL EMFGRPVYAL/TLL EVUGRRPVYAVTLF EVVGRRIIYGSKLL 250 GPLVGGYLADNCGWI GPLAGGYLADAGWI GPLAGGFLADASGWI GPLVGGYLSRA-GWI	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVFVIPCAV IAVIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV 260 RWI <u>VWIOLILA</u> RWLYWLMLILA RWLYWLTLILS RWLYWIQLILA	190 /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIAC 270 /FVAWVLITT /FVAWVLITTT /FVAWVLITTT	200 RLIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA L80 TVPETFAPILI TVPETFAPILI	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA LKRACKLRKA LKRAKKLRKT ARRAKKLRKT	220 DLWKSEERGV DDLWKNEERGV DDLWKNEERGV DDLWKNEERGV DDLWKNEERGV ADLWKNEERGV 300 AEDDPKYTTET SENDPKYVTET	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /ELDARPMGEI CELDARPMGEI CELDARPIGEI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 225 320 KLRIFL 320 KLRIFL 308 RLRVFL 292 KLRLFL 306
Р. А. А. А. Р. А. А. А. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus	170 EIVGRRPVYAL/TLA EMFGRRPVYAL/TLL EMFGRRPVYAL/TLL EMIGRRPVYAITLL EVUGRRPVYAVTLF EVVGRRIIYGSKLL 250 GPLVGGYLADNCGWI GPLAGGYLADAGWI GPLAGGFLADASGWI GPLVGGYLSRA-GWI GPLVGGYLCHA-GWI	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVFVIPCAV IAVIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV 260 RWI <u>VWIOLILA</u> RWLYWIDLILA RWLYWIQLILA	190 /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIAC 270 /FVAWVLITF1 /FVAWVLITF1 /FVAWVLITF1	200 RLIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA RAIDGIAFSA COPETFAPILI COPETFAPILI COPETFAPILI COPETFAPILI COPETFAPILI COPETFAPILI	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA LKRAKKLRKI ARRAKKLRKI ARRAKKLRKI	220 DLWKSEERGV DDLWKNEERGV DDWKNEERGV DDLWKNEERGV DDLWKNEERGV DDWKNEERGV 300 ADDWKNEERGV 300 AEDDPKYTTET SENDPKYVTET	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSAAPI	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 228 FIGPAI 225 320 KLRIFL 320 KLRIFL 308 RLRVFL 292 KLRLFL 306 RLRLFL 307
Р. А. А. А. А. А. А. А. А. А. А.	chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei chrysogenum oryzae nidulans clavatus fumigatus marneffei	170 EIVGRRPVYAL/TLA EMFGRRPVYAL/TLL EMFGRRPVYAL/TLL EMVGRRPVYAL/TLL EVVGRRPVYAVTLF EVVGRRIIYGSKLL 250 GPLVGGYLADNCGWI GPLAGGYLADAGWI GPLAGGFLADASGWI GPLVGGYLSRA-GWI GPLVGGYLCHA-GWI	180 LAVIFVIPCAV IAVIFIIPCAV LAVFVIPCAV LAFIFVIPCAV IALIFEIPCAI FAVIFVIPCAV 260 RWI <u>VWIOLILA</u> RWLYWIQLILA RWLYWIQLILA RWLYWIQLILA	190 /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIVC /SKNIGTLIAC 270 /FVAWVLITF1 /FVAWVLITF1 /FVAWVLITF1 /FVAWVLITF1 /FVAWVLITF1 /FVAWVLITF1	200 RL IDGIAFSA RAIDGIAFSA	210 APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA APMTLVGGTLA LKRAKKLRKT JKRAKKLRKT JKRAKKLRKT JKRAKKLRKT	220 DLWKSEERGV DDLWKNEERGV DDWRNEERGV DDWRNEERGV DDWKNEERGV ADLWKNEERGV ADMWKNEERGV 300 AEDDPKYTTET SENDPKYVTET SENDPKYVTET SENDPKYVTET	230 /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /PMAAFSASPI /PMAAFSAAPI /P	240 FIGPAI 240 FIGPAI 228 FIGPAI 212 FIGPAI 227 FIGPAI 228 FIGPAI 228 FIGPAI 225 320 KLRIFL 320 KLRIFL 300 KLRIFF 308 RLRVFL 292 KLRLFL 306 RLRLFL 307 KLRIFM 314

			330	340	350	360	370	380	390	400
P.	chrysogenum	FRPFQLLF	LEPIVL	FISLYMSV <mark>I</mark> Y	GLLYMFFVAYE	IVY <mark>M</mark> GGKGWS	SA <mark>SN</mark> TGLMFI	PLAIGVIFSA	CAPFVN <mark>N</mark> HY	LKVSVA 400
A.	oryzae	FRPFQLLF	LEPIVL	FIS <mark>I</mark> YMSVLY	GLLYMFFVAYF	IVYQGGKGWS	SAG <mark>S</mark> TGLMFI	PLAIGV <mark>IM</mark> SAZ	ACSPFINKHY	lslyak 388
A.	nidulans	LRPFQLLF	LEPIVL	FISLYMSVLY	GLLYMFFVAYF	VIVY <mark>E</mark> GGKGWS	SAG <mark>T</mark> TGLMFI	PLAIGVLLSA	ACAPFVN <mark>N</mark> HY:	LSLYSK 372
A.	clavatus	FRPFQLLF	LEPIVL	FIS <mark>I</mark> YMSVLY	GLLYMFFVAYF	PIVYQ <mark>K</mark> GKGWS	SAGPTGLMFI	PLAIGVLLSA	ACAP <mark>L</mark> VNKHY	LTLVKK 386
A.	fumigatus	LRPFQLLF	LEPIVL	FIS <mark>I</mark> YMSVLY	GLLYMFFVAYF	IVYQ <mark>K</mark> GKGWC	GS GPTGLMFI	PLAIGVL <mark>C</mark> SA	ACAPFVNKHY:	LTLVKK 387
P.	marneffei	LRPFQLLF	LEPIVL	FISLYMSVLY	GLLYMFFVAYE	VIVYQEGKGYS	PGITGLMFI	PLAIGVVLSA	CAPFVNKHY:	LKIHAK 394
A.	chrysogenum	TRPFQLLF	GELIVL	LISLYMSVLY	'GLLYMFF <mark>I</mark> AYF	IVY <mark>K</mark> GGKGYS	SGKTGLMFI	PVAVGVVLSA	CCSPFVNTHY	ISLAHF 385
			410	420	430	440	450	460	470	480

						1		
P.	chrysogenum	YGGKPPAEKRLIPMMWAC	WCIPSGLFVFAW	rsypdlhw <mark>m</mark> gpa <mark>m</mark> g	GFLIGVGVILLYNS	ANNYLVDTYQHÇ)AASALAAKTF	480
A.	oryzae	YGGKPPAEARLIPMM <mark>F</mark> SC	WFIPIGLFIFAW	rsyp qihwf gpa v g	G <mark>W</mark> PVGFGFIFLYNS	ANNYLVDTYQHÇ)AASALAAKTF	468
Α.	nidulans	YGGKPPAE <mark>S</mark> RLIPMM I SC	WFIPIGLFIFAW	rsyp ni hw f gp m ig	GFPVGFGFIFLYNS	ANNYLVDTYQHÇ)AASALAAKTF	452
Α.	clavatus	Y <mark>N</mark> GKPPAEMRLIPMMLSC	WFIPIGLFIFAW	rsyp <mark>n</mark> lhwigp <mark>c</mark> ig	G <mark>L</mark> PVGFGFIFLYNS	ANNYLVDTYQHÇ)AASALAAKTF	466
Α.	fumigatus	YGGKPPAEARLIPMMLSC	WFIPIGLFIFAW	rsypd <mark>i</mark> hwigp <mark>c</mark> ig	G <mark>L</mark> PVGFGFIFLYNS	ANNYLVDTYQHÇ)AASALAAKTF	467
P.	marneffei	Y <mark>N</mark> GKPPAEIRLIPMMFSC	WF <mark>V</mark> PIGLFIFAW:	rsy t dlhwigpa m g	GFPVGFGFIFLYNS	ANNYLVDTYQHÇ)AASALAAKTF	474
A.	chry sogenum	HGGKPPAE <mark>V</mark> RLIPMMLSC	W <mark>L</mark> IPIGLFIFAW:	rsyp wlswa gpa m g	GFPVGFGFIFLYNS	ANNYLVD <mark>S</mark> YQHÇ)AASALAAKTF	465

		490	500	510	520	530	540	550	560
P.	chrysogenum	IRSIWGACTVLFT	feqmy <mark>e</mark> rlgdqw <i>b</i>	ASTLLAFI <mark>G</mark> LA	ACCAIPYVFYF	FKG <mark>E</mark> SIRRFSK	FAFSDDEEK	IKATT	550
A.	oryzae	LRS I WGASTVLF1	reqmydrlgdqwa	STLLAFIAL	ACCAIPYVFYF	KGESIRRFSF	YAYNEDEEN	GKVEK	538
A.	nidulans	IRSLWGASTVLF	reqmydrlgdqwa	AS <mark>SLLAFL</mark> ALA	ACCAIPYVFY <mark>V</mark>	/KGAAIRRYSF	YAFADDEEAI	_ATK	520
A.	clavatus	LRSMWGASTVLF	feqmydrl <mark>n</mark> drw <i>f</i>	STLLAFIAL	ACCAIPY <mark>A</mark> FYF	"KGASIRR <mark>Y</mark> SK	FAFADDEEQ	QGAGEK	536
A.	fumigatus	LRSMWGASTVLFT	feqmydrl <mark>n</mark> drw <i>f</i>	STLLAFIAL	ACCAIPYVFYF	KGASIRR <mark>Y</mark> SK	FAFADDEEQ	QGPGEK	537
P.	marneffei	LRSMWGA <mark>GC</mark> VLFT	[<mark>n</mark> qmy a rlgdqw <i>f</i>	ASTLLAF <mark>LG</mark> LA	ACCAIPYVF <mark>W</mark> F	YGERIRAFSF	FAYVEDEETH	AVPSD	544
A.	chrysogenum	IRSFWGAGVVLFI	rkqmy <mark>s</mark> rlgdqw <i>f</i>	ASSLIAFLALA	ACCAIPFLFWK	YGARIRARSK	YAYAGDETPA	ADVEKAKQRPAEAG	VL 545

-	_	~	
5	7	υ	

		570
P.	chrysogenum	GCA
A.	oryzae	S
A.	nidulans	A
Α.	clavatus	Н
A.	fumigatus	Н
P .	marneffei	SEH
Α.	chrysogenum	ADADDLRRAISYVSNP



Α



Fernández-Aguado et al. Fig. S2

В


2.1 kb

– Publicaciones originales –

_

Nuevos datos sobre el transporte de isopenicilina N en *Penicillium chrysogenum*.

(New insights into the isopenicillin N transport in *Penicillium chrysogenum*. 2014. Metabolic Engineering.22:89-103).

Autores: Marta Fernández Aguado, Juan Francisco Martín, Raquel Rodríguez Castro, Carlos García Estrada, Silvia María Albillos, Fernando Teijeira, Ricardo Vicente Ullán. Publicaciones originales —

_

Contents lists available at ScienceDirect

ELSEVIER



CrossMark

Metabolic Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymben

New insights into the isopenicillin N transport in *Penicillium chrysogenum*

M. Fernández-Aguado^b, J.F. Martín^b, R. Rodríguez-Castro^a, C. García-Estrada^a, S.M. Albillos^{a,1}, F. Teijeira^a, R.V. Ullán^{a,*}

^a Institute of Biotechnology of León (INBIOTEC), Av. Real s/n, 24006 León, Spain ^b Area of Microbiology, Department of Molecular Biology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 25 June 2013 Received in revised form 25 November 2013 Accepted 19 January 2014 Available online 28 January 2014

Keywords: Penicillium chrysogenum Penicillin biosynthetic pathway Major facilitator transporter Isopenicillin N Peroxisomal membrane protein

ABSTRACT

In *Penicillium chrysogenum* the beta-lactam biosynthetic pathway is compartmentalized. This fact forces the occurrence of transport processes of penicillin-intermediate molecules across cell membranes. Many aspects around this molecular traffic remain obscure but are supposed to involve transmembrane transporter proteins. In the present work, an in-depth study has been developed on a Major Facilitatortype secondary transporter from *P. chrysogenum* named as PenM. The reduction of *penM* expression level reached by penM targeted silencing, leads to a decrease in benzylpenicillin production in silenced transformants, especially in SilM-35. On the contrary, the penM overexpression from a high efficiency promoter increases the benzylpenicillin production and the expression of the biosynthetic genes. Moreover, when the silenced strain SilM-35 is cultured under penicillin production conditions with 6aminopenicillanic acid supplementation, an increase in the benzylpenicillin production proportional to the 6-aminopenicillanic acid availability is observed. By this phenomenon, it can be concluded that due to the *penM* silencing the benzylpenicillin transport remains intact but the peroxisomal isopenicillin N import results affected. As a culminating result, obtained by the expression of the fluorescent recombinant PenM-DsRed protein, it was determined that PenM is naturally located in P. chrysogenum peroxisomes. In summary, our experimental results suggest that PenM is involved in penicillin production most likely through the translocation of isopenicillin N from the cytosol to the peroxisomal lumen across P. chrysogenum peroxisomal membrane.

© 2014 International Metabolic Engineering Society. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Benzylpenicillin [penicillin G (PenG)] was the first of the betalactam antibiotics discovered nearly 8 decades ago. This hit opened the way to the discovery of other important beta-lactams, like cephalosporins and cephamycins (Aharonowitz et al., 1992). The use of these antibiotics in the treatment of bacterial diseases in human and veterinarian medicine generated the need to develop a pharmaceutical industry with the capacity to supply the increasing demand of this kind of compounds. The world

E-mail address: rvicu@unileon.es (R.V. Ullán).

market of beta-lactams has become a millionaire business that moved \$15 billons in 2003 (Ozcengiz and Demain, 2013).

The industrial interest led to the application of different strategies, such as the optimization of the fermentation conditions and genetic modification of the producer strains, by random mutagenesis first and by genetic engineering later (involving beta-lactam related genes) in order to improve the beta-lactam production. As the result of years of research, a deep knowledge has been accumulated about a great variety of different aspects, highlighting the beta-lactam biosynthesis in different producer strains related to genetics, molecular biology and regulation (Evers et al., 2004; Martín et al., 2012a; Ozcengiz and Demain, 2013). All the accumulated knowledge makes today possible new advances around the beta-lactam biosynthesis following more subtle research lines. For example, production rises are expected through the development of Penicillium chrysogenum engineered strains with self-protection strengthener mechanisms against the toxic by-products derived from the penicillin biosynthetic route, which would enlarge the mean-life of penicillin related enzymes (Scheckhuber et al., 2013).

These insights have revealed that the biosynthetic genes are arranged in clusters and encode proteins that exert their enzymatic

Abbreviations: Wis 54-1255, Wisconsin 54-1255; IPN, isopenicillin N; PenG, penicillin G, benzylpenicillin; 6-APA, 6-aminopenicillanic acid; DP medium, defined production medium; CP medium, complex production medium; MFS, major facilitator superfamily, TMS, transmembrane spanning domains; RNAi, RNA interference; IOD, integrated optical density; EGFP, green fluorescent protein; DsRed, red fluorescent protein

^{*} Corresponding author. Fax: +34 987 210388.

¹ Present address: Area of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biotechnology and Food Science and Technology, University of Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, Spain.

^{1096-7176/\$-}see front matter © 2014 International Metabolic Engineering Society. Published by Elsevier Inc. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.01.004

activities in different subcellular compartments. The compartmentalization characterizes the beta-lactam biosynthetic pathways, having a deep knowledge of the related features for *P. chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*. The starting enzyme of the beta-lactam biosynthetic pathway, the δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACVS) resides in the cytoplasm (van der Lende et al., 2002). The ACVS is encoded by the *pcbAB* gene and condenses the amino acid precursors L-cysteine, L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV). The intermediate δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV). The isopenicillin N synthase (IPNS), the second enzyme of the route, encoded by the *pcbC* gene, is also a soluble cytoplasmic protein as confirmed by subcellular fractionation and immunoelectron microscopy (van der Lende et al., 2002). The IPNS cycles the ACV to produce the hydrophilic isopenicillin N (IPN) (Aharonowitz et al., 1992).

At this point of the biosynthetic pathway, the IPN can be directed towards the production of PenG (as occurs in *P. chryso-genum* and *Aspergillus nidulans*), cephalosporin C (as happens in the *P. chrysogenum*'s related fungi *A. chrysogenum*) or cephamycin C (as is the case of the less related prokaryote strains *Streptomyces clavuligerus* and *Amycolatopsis lactamdurans*).

In P. chrysogenum, the IPN is used by the peroxisomal enzyme isopenicillin N acyltransferase (IAT), encoded by penDE (Müller et al., 1991; García-Estrada et al., 2008). The IAT exchanges the side chain of the IPN by a more hydrophobic one, i.e. an activated phenylacetic acid residue added by peroxisomal acyl-CoA ligases (Lamas-Maceiras et al., 2006; Wang et al., 2007; Yu et al., 2011), to form the end-product (PenG) that has to be sorted to the extracellular medium. In A. chrysogenum, the genes cefD1 and cefD2 encode two enzymes that use IPN as substrate to synthesize penicillin N (PenN) (Ullán et al., 2002b, 2004) into the peroxisomal matrix (Teijeira et al., 2009). Later, in the cytosol, PenN is converted into cephalosporin C (van de Kamp et al., 1999; Martín et al., 2010). Lately, in P. chrysogenum the expression of heterologous genes from other beta-lactam producers (like A. chrysogenum or S. clavuligerus) has made possible the enlargement of the biosynthetic capability of the first. Some P. chrysogenum engineered strains, for example, produce cephalosporinprecursor molecules. In these new strains of Penicillium, the actual aim is the suppression of metabolic pathways competing with the beta-lactam engineered route, thus providing its optimal exploitation towards the formation of the cephem-precursor of interest (Ullán et al., 2007; Harris et al., 2009; Veiga et al., 2012).

The occurrence of the different steps of beta-lactam biosynthesis in different subcellular compartments makes the necessary transport of precursors and intermediates across cellular membranes. These transport processes would be mediated by membrane transporter proteins from any of the superfamilies or families included in the Multidrug Resistance (MDR) protein class (Martin et al., 2005) [the ATP-Binding cassette (ABC) superfamily, the Major Facilitator superfamily (MFS), the Multidrug and Toxic compound extrusion (MATE) family, the Small multidrug resistance (SMR) family or the Resistance Nodulation Division (RND) family], all of them characterized by their ability to transport a wide variety of dissimilar organic compounds. However, despite the great amount of knowledge acquired about the different biosynthetic pathways, yielding beta-lactams as their final bioactive products, the transport processes associated to the compartmentalization that characterizes them, constitute an interesting area that still remains largely unexplored. In fact, only a few transporter proteins involved in beta-lactam biosynthetic pathways have been described to date.

One of these transporters is the putative cephamicin transporter encoded by *cmcT* gene that exists in the cephamicin cluster of the producing bacteria *S. clavuligerus* and *A. lactamdurans*. The protein CmcT is a member of the MFS of secondary transporters, being located in the cytoplasmic membrane and being responsible for the export of cephamicin (Coque et al., 1993; Liras, 1999).

Within the early cephalosporin C biosynthetic cluster of A. chrysogenum, a meticulous work has been made with the result of the biochemical and molecular characterization of three genes encoding membrane transport proteins. These three transport proteins are proved to take part somehow in the cephalosporin biosynthesis. The *cef*T gene encodes a MFS transporter involved in the secretion of beta-lactams containing the α-aminoadipicderived side chain, like IPN, PenN and deacetylcephalosporin C (Ullán et al., 2002b, 2008b). CefP is a peroxisomal membrane transporter involved in the translocation of the intermediate IPN from the cytosol to the peroxisomal lumen (Ullán et al., 2010). The other MFS transporter, the one encoded by *cefM* is also located in the peroxisomal membrane and is in charge of the exportation of PenN to the cytoplasm from the lumen of this organelle. In P. chrysogenum, our group described the MFS transporters PenV and PaaT. The first one is a vacuolar membrane protein which plays an important role in the formation of the ACV tripeptide, probably due to its function as an amino acid permease, supplying precursors from the amino acid vacuolar pool (Fernández-Aguado et al., 2013a). The PaaT, showing homology with A. chrysogenum CefT, is located in the peroxisomal membrane and is supposed to intervene in the internalization of phenylacetate in the peroxisomes, where it enters in the penicillin biosynthetic pathway as the side chain of the PenG (Fernández-Aguado et al., 2013b). In P. chrysogenum CGMCC 3.5129, the gene penT, homologue of cefT too, is reported to be located in the plasma membrane and related to the sensitivity to phenylacetate (Yang et al., 2012). Also related to the transport of phenylacetate in P. chrysogenum, the transporterABC40 has been reported to act as an ATP-dependent extrusion system of some weak acids such as phenylacetate, benzoate and sorbate, protecting cells from the harmful acidification of their cytoplasm. ABC40 encoding gene is reported to be more expressed in low penicillin producing strains of P. chrysogenum in line with a less efficient detoxification of phenylacetate via its incorporation to the beta-lactam pathway (Weber et al., 2012).

Despite the fact that even though MFS transporters are involved in the cell growth and homeostasis and are present in all the evolution kingdoms in nature, they have not been characterized sufficiently, maybe due to the intrinsic difficulty in working with hydrophobic membrane proteins or in the evaluation of the proper transport process. The present work faces several approaches to continue unraveling the MFS-mediated transport processes linked to the PenG biosynthetic pathway in *P. chrysogenum*. Here the characterization of the *penM* gene of *P. chrysogenum*, which encodes an MFS-like protein proved to be in the peroxisomal membrane, is described. This protein is somehow involved in the penicillin biosynthesis given the clear phenotypic effects on the penicillin production rate provoked by the *penM*silencing and *penM*-overexpression strategies explored in this work in *P. chrysogenum*-engineered strains.

2. Materials and methods

2.1. Strains, media and culture conditions

In this study, *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089/ DSM 1075) was used as the strain of reference, along with a lowpenicillin producer strain (800 mg/L in CP medium) containing a single copy of the penicillin gene cluster (Cantoral et al., 1987; Fierro et al., 1995) that derives from the wild type *P. chrysogenum* NRRL 1951. The engineered strains made in this work were obtained by transformation of *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Wis 54-1255) with different integrative vectors. *P. chrysogenum* liquid cultures were initiated by inoculating fresh spores from a Power medium plate (Fernández-Aguado et al., 2013b) into 100 ml of either DI (defined inoculum) or CI (complex inoculum) medium. After incubations at 25 °C for 24 h in an orbital shaker (250 rev/min), 10% volume aliquots (of seed culture from DI) were inoculated in 100 ml of DP (defined production) or 5% volume aliquots (of seed culture from CI) were inoculated in CP (complex production) (Ullán et al., 2008a, 2008b). For the intermediate transport experiments DP medium was supplemented at the inoculation time with 6-aminopenicillanic acid (6-APA, Sigma-Aldrich) at final concentrations of 0.253 mM, 0.505 Mm, 2.527 mM and 5.054 mM. 6-APA was dissolved in sodium borate 50 Mm, pH 7.7 (with boric acid) solution (Garcia-Estrada et al., 2007). Three different fermentations were performed in triplicates in order to obtain the experimental data in each case.

Samples of *P. chrysogenum* cultures (4 ml) taken for every 24 h, were centrifuged at 4400 rpm and 4 °C. The supernatants were used for the estimation of the antibiotic production by HPLC or bioassay against the penicillin-sensitive *Microccocus luteus* ATCC 9341 with or without penicillinase from *Bacillus cereus*, when required (Ullán et al., 2002a). For dry weight determination, harvested mycelium was processed as described previously by Fernández-Aguado et al. (2013b).

Escherichia coli DH5 α cells, grown in Luria-Bertani medium supplemented with 100 μ g/ml of ampicillin, were used for cloning purposes.

2.2. Plasmid constructions

For this work three plasmids have been developed specifically. Plasmid **ppenM-RNAi** used to silence *penM*, promoting the target destruction of *penM*-derived transcripts in *P. chrysogenum*, was constructed as follows. A *penM*-exonic fragment was amplified by PCR from *P. chrysogenum* genomic DNA using as primers oligonucleotides SILM-PC-F and SILM-PC-R (Table 1). The amplification product was digested with *Ncol* and the 431 bp *Ncol*-ended fragment was cloned into the single *Ncol* restriction site of pJL43RNAi (Ullán et al., 2008a). The plasmid obtained bears an exonic fragment of *penM* cloned under the control of two highly efficient fungal convergent promoters: the *gpd* (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) gene promoter of *A. nidulans* (Punt et al., 1992) and the *pcb* gene promoter of *P. chrysogenum* (Gutiérrez et al., 1997). Simultaneous transcription from both promoters generates *penM* transcript-hybridizing double-stranded

small DNA molecules able to generate the desirable silencing process.

Plasmid **pSBRpenM** was constructed to increase the expression level of *penM* in *P. chrysogenum* following next guide. Through PCR amplification the whole *penM* gene was obtained from *P. chrysogenum* Wis 54-1255 genomic DNA using as primers the oligonucleotides M-PC-LOC-F and SBRM-R (Table 1). The 1875 pb PCR product digested *BamHI-Smal* was cloned in the *BglII-Stul* sites of pIBRC43BglII (Kosalková et al., 2009). In this way, the pSBRpenM is generated, and, there, the *penM* gene is under the control of the *Aspergillus awamori gdh* (glutamate dehydrogenase) gene promoter, a high efficiency promoter in ascomycetes (Cardoza et al., 1998) which will allow the increased expression of *penM*, and the *cyc1* (cytochrome c) transcriptional gene terminator of *Saccharomyces cerevisiae* (Russo et al., 1991).

Plasmid pPenM-DsRed was used for the heterologous expression of the chimerical red fluorescent protein PenM-DsRed in cells of P. chrysogenum Wis 54-1255. To construct this plasmid, penM gene was partially amplified (excluding its stop codon) through a PCR reaction performed using as template *P. chrysogenum* genomic DNA and the primers M-PC-LOC-F and M-PC-LOC-R (Table 1). The PCR product was digested BamHI-Smal (1527 bp) and cloned in pExpDsRed vector (Ullán et al., 2010) digested with BglII-Smal (BamHI and BglII generate compatible restriction ends, being their target sequences 3'-G GATCC-5' and 3'-A GATCC-3', respectively). The resultant plasmid pPenM-DsRed bears the *penM* gene and the DsRed gene from Discosoma sp. (Clontech) fused in frame under the control of the A. awamori gdh gene promoter (Cardoza et al., 1998) and the S. cerevisiae cyc1 gene terminator (Russo et al., 1991). The transcription and later translation of the cassette PgdhpenM-dsRed-Tcyc1 renders the PenM-DsRed, a PenM-based red fluorescent protein.

Other plasmids used in the present work have been:

pJL43 (Gutierrez et al., 1991) was used as the helper plasmid in transformation processes together with pSBR*penM* with the purpose of obtaining *penM*-overexpressing transformants. pSBRpenM lacks a selective marker but pJL43 bears a phleomycin resistance cassette which allows the discrimination between transformed and untransformed clones resultant from the cotransformation process.

p43EGFP-SKL (Ullán et al., 2010) was used in cotransformations with pPenM-DsRed for the simultaneous expression of the fluorescent proteins EGFP-SKL (targeted to peroxisomes and encoded in p43EGFP-SKL vector) and PenM-DsRed (encoded in pPenM-DsRed

Table 1

List of primers used in this work. Their sequence and applications are indicated. When the primer includes a relevant restriction site the target sequence appears underlined.

Primer	Sequence and features	
SILM-PC-F	5'-CATG <u>CCATGG</u> GGGCCGTACACCGAAGGAACT-3'. (<i>Nco</i> I site)	Construction of <i>penM</i> -RNAi vector
SILM-PC-R	5'-CATG <u>CCATGG</u> AAGGAACGAACGAGGTGCCGATAATAGG-3' (Ncol site)	Construction of penM-RNAi vector
SBRM-R	5'-TCC <u>CCCGGG</u> TCAGAAAGTCACCTGGAACT-3'. (Smal site)	Construction of plasmid pSBRpenM
M-PC-LOC-F	5'-CGC <u>GGATCC</u> ATGAAGGACGGCGAGGGTAA-3'. (BamHI site)	Construction of plasmids pSBRpenM and pPenM-DsRed
M-PC-LOC-R	5'-TCC <u>CCCGGG</u> GAAACTCACCTGGAACTTTG-3'. (Smal site)	Construction of plasmid pPenM-DsRed
RT/penM-I5-F	5'-TTCCAGCAGCAGTACAAT-3'	RT-PCR from <i>penM</i> transcript
RT/penM-I5-R	5'-ACAGCATACATCTTCGGG-3'	RT-PCR from <i>penM</i> transcript
RT/pcbAB-F	5'-AACTCACGCCGCACCGCTTCATT-3'	RT-PCR from <i>pcbAB</i> transcript.
RT/pcbAB-R	5'-CCGCCTTCCCGTTCACATTCACTG-3'	RT-PCR from <i>pcbAB</i> transcript.
RT/pcbC-F	5′-GTGGCCGGACGAGAAGAAGCATC-3′	Amplification from <i>pcbC</i> gene to make the <i>pcbC</i> specific
		probe used in norhtern hybridization.
RT/pcbC-R	5'-TGGGAGCGGGGTAGTAGTTGTTGG-3'	Reverse pair of primer RT/pcbC-F
RT/penDE-F	5'-CGGCTACGAACATGGCTCTGC-3'	Obtention of <i>penDE</i> specific probe from penDE gene applied
		in norhtern hybridization.
RT/penDE-R	5'-TTATGAATTTGATGGTGGGAAGTC-3'	Used together with RT/penDE-R
RT/actA-F	5'-CTGGCCGTGATCTGACCGACTAC-3'	Amplification from actA transcripts in RT-PCR reactions and from actA
		gene to make actA specific probes for northern hybridizations
RT/actA-R	5'-GGGGGAGCGATGATCTTGACCT-3'	Used together with RT/actA-F for the mentioned purposes

plasmid), in *P. chrysogenum* cells. Double transformant strains were used in the determination of PenM subcellular location.

2.3. Transformation of P. chrysogenum protoplasts

The obtainment and transformation of protoplasts were carried out as described previously (Cantoral et al., 1987; Díez et al., 1990; Ullán et al., 2007). Transformant strains were selected by their resistance to phleomycin ($30 \mu g/ml$).

2.4. DNA isolation and southern blotting

Genomic DNA from all the *P. chrysogenum* strains was isolated from mycelium grown for 24 h in MPPY medium following the protocol described by Casqueiro et al. (1999).

For Southern analysis, isolated genomic DNAs were digested with the appropriate enzymatic mixture run in a 0.7% agarose gel and transferred onto a nitrocellulose uncharged Hybond-N membrane (Amersham, GE Healthcare Biosciences). After UV fixation, the DNAs were hybridized with different specific DNA-based digoxigenin-labelled probes.

The probes used in this work were obtained as follows. To analyze the correct integration in the genome of *P. chrysogenum* of both *Pgdh-penM-PpcbC* (silencing cassette from *ppenM-*RNAi) and *Pgdh-penM-Tcyc1* (overexpression cassette from pSBR*penM*) cassettes, the 431 bp-*NcoI* fragment obtained by PCR using the primers SIL-M-PC-F and SIL-M-PC-R was used as specific probe (Table 1). This probe hybridizes within a *penM* exonic region. To prove the correct integration of the EGFPP-SKL expression cassette, a DNA fragment of 782 bp, obtained from a *BamHI–Xbal* enzymatic digestion of p43EGFP-SKL, was used. The correct integration of Pg*dh-penM-dsred-Tcyc1*, the cassette for the expression of PenM-DsRed, was determined using as probe the *Smal–Bgl*II fragment of 479 bp obtained from pPenM-DsRed.

All the DNA-based probes were labelled with digoxigenin molecules using the DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit (Roche Applied Science) following the manufacturer's provided protocol. By the random primed strategy, new DNA molecules incorporating modified uracile subunits (digoxigenin-dUTP) are synthesized and later immunodetected using specific antidigoxigenin antibodies conjugated with alkaline phosphatase (Roche Applied Science). The incubation of the alkaline phosphatase with a suitable substrate (CDP-Star, Roche) allowed the obtention of chemoluminescent signals from DNA-labelled probe (or RNA-labelled probe) complexes that were recorded in an X-ray film and revealed with Kodak chemicals (Sigma Aldrich).

2.5. RNA extraction, northern blot analysis and semiquantitative RT-PCR

Total RNA from *P. chrysogenum* was isolated from mycelia grown for 60 h in CP medium under penicillin production conditions following a protocol previously described (Ullán et al., 2007).

For RT-PCR analysis, 6 micrograms of total RNA isolated from the strains of interest were treated with 10 units of RNase-free DNase (RQ1, Promega) for 30 min at 37 °C, according to manufacturer's protocol. Semiquantitative RT-PCR experiments were carried out according to the instructions described for "SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq system" (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) using as template 200 ng of DNasetreated RNA.

Amplifications from *penM* transcripts were done with primers RT/*penM*-I5-R and RT/*penM*-I5-F (425 bp) (Table 1). RT/*actA*-F and RT/*actA*-R (Table 1) were the primers used in the amplifications from *actA* (housekeeping gene, encoding the γ -actin), used as an internal control transcripts. Finally, RT/*pcbAB*-F and RT/*pcbAB*-R

were the pair of primers used to amplify a 426 bp fragment from the *pcbAB* coding sequence with the optimized melting temperature and the number of PCR cycles in each case. The amplification products were developed in 0.8% agarose gels and stained with ethidium bromide. Fluorescent signals from the amplification products were captured under UV light as digital images. These digital images were processed with the application Gel Pro Analyzer 3.1 (MediaCybernetics) to quantify the Integral Optic Density (IOD) of the bands rendered in each case.

In Northern blot analysis, 30 µg samples of total RNA were loaded in an agarose gel, submitted to denaturing electrophoresis and then transferred and UV-fixed onto a nitrocellulose Hybond-N+ membrane (Amersham, GE Healthcare Biosciences). For hybrizations, different digoxigenin labelled DNA-based probes were used: to detect *pcbC* transcripts the 422 bp internal fragment of *pcbC* obtained by PCR using the primers RT/*pcbC*-F and RT/*pcbC*-R were used (Table 1) and P. chrysogenum genomic DNA as template; to identify *penDE* transcripts a 555 bp internal fragment of penDE amplified with the primers RT/penDE-R and RT/penDE-F were used (Table 1), and, finally, to detect transcripts from *actA* a 458 bp PCR product homologous to actA using the primers RT/ actA-F and RT/actA-R were used (Table 1). The chemoluminescent signal from complexes RNA-labelled probe were recorded in an X-ray film (as explained before for DNA-labelled probes detection). The film was then scanned and the digital image was used to make densitometry measurements of the hybridization signals obtained with Gel Pro Analyzer 3.1 Software (MediaCybernetics).

The expression level of the constitutive *actA* gene (encoding the γ -actin) was considered as the basal expression state and was used as the internal control in each case. For this reason, once obtained the densitometry measurements by means of Gel Pro Analyzer 3.1 Software, the densitometry of the signal rendered by *penM* (RT-PCR amplification), *pcbAB* (RT-PCR amplification), *pcbC* (Northern hybridization) or *penDE* (Northern hybridization) was referred to the densitometry of the correspondent signal from *actA* in each case (IOD_{gene}/IOD_{actA}) so as to get relative expression values of each gene, comparable among strains.

2.6. Western blotting

Mycelia of P. chrysogenum strains were grown in CP medium for 60 h under penicillin production conditions. The harvested mycelia were washed with NaCl 0.9% (w/v), frozen in liquid nitrogen and then ground to powder. Five hundred mg of disrupted mycelia were resuspended in TD buffer (Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, pH 8, supplemented with protease inhibitor cocktail Complete, Roche) and then centrifuged. The protein content of the soluble fraction was determined by colorimetry with Bradford Protein assay kit (Biorad) using bovine serum albumin as standard. SDSpolyacrylamide gel electrophoresis and western blot were performed as described elsewhere previously (García-Estrada et al., 2008) according to established protocols. The immunological detection of the protein of interest, in this case P. chrysogenum IAT, was carried out with polyclonal antibodies against the β -subunit of the IAT (Fernández et al., 1994; Garcia-Estrada et al., 2007) obtained in antiserum from immunized rabbits as reported in previous works (Fernández et al., 2003).

2.7. Evaluation of the in vitro IAT activity

The supernatants obtained for the western blot analyses were also used in the evaluation of the IAT activity. Supernatants (72 µl) were incubated for 15 min at 26 °C with 48 µl of reaction mixture (0.1 M Tris–HCl, pH 8, 0.05 M DTT, 0.2 mM 6-APA and 0.2 mM phenylacetyl-CoA). The reaction was stopped with 1 vol of methanol, centrifuged and then bioassayed against *M. luteus* ATCC 9341 (García-Estrada et al., 2008).

2.8. Extraction of intracellular PenG

Intracellular PenG was extracted from mycelium of *P. chrysogenum* grown in CP medium for 60 h under penicillin production conditions as explained before (Fernández-Aguado et al., 2013a). The estimation of the PenG was assessed by HPLC.

2.9. HPLC measurement of the antibiotic production

HPLC analyses of PenG (extracellular and intracellular) and IPN production were performed in a Waters apparatus, equipped with a 2487 Dual absorbance detector, 1525 Binary HPLC pump as described previously by Ullán et al. (2008b).

For the estimation of the PenG production in the fermentations for intermediate-transport evaluation, samples (10 µl in the case of Wis 54-1255 and 40 µl in the case of the SilM-35) were injected in a Waters Alliance 2695 system with a Photo Diode Array detector model 2998 and an analytical column X BridgeTM C18 (3.5 µm; 2.1 × 150 mm). The elution of the analyte was done at a 0.35 ml/min flow rate using as mobile phase A (50 mM ammonium formate, 5% methanol and pH 3.5) and phase B (methanol 100%). An elution gradient program was applied as follows: from 0–7 min phase B was increased from 15% to 20%, followed by a wash step with 100% phase B from 7.5 to 11 min and a final equilibration step starting at 11.5 min with 15% B until min 16. During the separations, the analytical column was maintained at 35 °C. PenG was detected at 240 nm with the peak eluting near min 4.

2.10. Ultrastructural analysis

The fluorescence emissions of hyphae were analyzed by confocal laser-scanning microscopy as described previously by Fernández-Aguado et al. (2013b).

3. Results

3.1. In silico characterization of a P. chrysogenum gene homologous to A. chrysogenum cefM

The A. chrysogenum cefM gene encodes a MFS protein placed in the membrane of the peroxisomes. This protein is responsible for the flux of PenN from the peroxisomal lumen (Teijeira et al., 2009; Ullán et al., 2010) to the cytoplasm. Given the location of CefM between two different cellular compartments and its function as a PenN transporter, it is assumable the significance of the protein CefM in the cephalosporin biosynthetic pathway. Thus, being aware of the relevance of CefM in the cephalosporin biosynthetic pathway, a search for genes encoding homologous proteins to CefM was carried out in the genome of P. chrysogenum. It was found that the protein CAP 95819, encoded by the ORF Pc21g09220, exhibited 52% identity with respect to CefM. This was the highest identity percentage detected among the deduced proteins of *P. chrysogenum* and CefM. The protein CAP 95819, with 508 amino acids and a deduced molecular weight of 55071 Da, was studied in detail in this work. In analogy with the cefM gene of A. chrysogenum, Pc21g09220 and its encoded protein CAP 95819 were renamed as *penM* and PenM, respectively.

Using the algorithm BLASTp (protein–protein *Basic Local Alignment Search Tool*) from the on line platform of National Center for Biotechnology Information (NCBI), the PenM protein showed significant alignments with MFS members of human pathogen ascomycetes (Supplementary Fig. 1) related to the detoxification of a great variety of compounds (Table 2). In fungal genera closely related to *Penicillium*, alignments of certain significance were obtained with many still uncharacterized hypothetical proteins (Supplementary Fig. 2), many of which are predicted to be members of the MFS of secondary transporters (Table 3).

In silico analyses of the *penM* sequence revealed the presence of a MFS characteristic multidomain (superfamily multidomain MFS_1 [pfam07690]) between amino acids 74-451, and two regions typical of the MFS at positions 74-246 and 319-494 (specific hit MFS [cd06174]). Each of these two regions would group six out of the 12 transmembrane spanning domains (TMS) predicted in PenM by different on line platforms (SACS HMMTOP: Transmembrane Prediction Page; TMHMM Server v. 2.0: Prediction of transmembrane

Table 2

Ascomycete fungi proteins rendering significative alignments with PenM protein from P. chrysogenum.

Protein	Strain	Function	Identity with PenM (%)	Positive amino acids with PenM (%)
XP_003069245.1	Coccidioides posadasii C735 delta SOWgp	Benomyl/metotrexate resitance MFS	65.9	88
xP_002791868.1	Paracoccidioides brasilensis sp. 'lutzii' Pb01	Fluconazole resistance MFS	64.4	87.9
EEH06363.1	Ajellomyces capsulatus G186AR	Cicloheximide resistance MFS	62.1	86
XP_003177262.1	Arthroderma gypseum CBS 118893	Poliamine MFS transporter	52.7	83.7
EGC49113.1	Aiellomyces capsulatus H88	Cafeine resistance MFS	61.3	85.8

Table 3

Proteins rendering significative alignment with P. chrysogenum's PenM from phylogeny-related fungi.

Protein	Strain	Function	Identity with PenM (%)	Positive amino acids with PenM (%)
XP_002148483.1	Penicillium marneffei ATCC 18224	Multidrug hypothetical transporter	67.5	87.1
EGU85158.1	Fusarium oxysporum Fo5176	Hypothetical protein FOXB_04336 type MFS	59.7	83.8
XP_001258746.1	Neosartorya fischeri NRRL 181	Hypothetical multidrug MFS transporter	58.2	83.3
XP_748433.1	Aspergillus fumigatus Af293	Hypothetical multidrug MFS transporter	59.7	85.1
XP_001273827.1	Aspergillus clavatus NRRL	Hypothetical multidrug MFS transporter	59.5	86.6
XP_001215282.1	Aspergillus terreus NIH2624	Hypothetical MFS conserved protein	56.0	83.2
XP_660279.1	Aspergillus nidulans FGSC A4	Hypothetical MFS conserved protein AN26T75.2	57.7	84.7
XP_001397323.1	Aspergillus niger CBS 513.88	Hypothetical multidrug MFS transporter	57.9	81.8
EIT77692.1	Aspergillus oryzae 3.042	Synaptic vesicle transporter SVOP	56.0	80.3
XP_002380170.1	Aspergillus flavus NRRL3357	Bicyclomicine resistance hypothetical MFS	56.2	80.5

helices in proteins; TopPred 0.01: Topology prediction of membrane proteins and SOUSI Proteome, PsiPred MEMSAT-SVM) through the analysis of its hydropathy profile (Supplementary Fig. 3). This configuration fits well with the characteristic 6TMS/6TMS arrangement of the secondary transporters of the MFS (Paulsen et al., 1996; Martín et al., 2012a, 2012b; Reddy et al., 2012). Moreover, PenM has many sites that could conform a substrate translocation pore: 85, 88–90, 92–93, 111, 114–115, 118, 122–123, 125–126, 172–173, 176–177, 180–181, 184, 196–197, 200–201 and 207. In fact, a 3-dimensional modeling of PenM produces a prediction of a multi-TMS protein organized around a central channel that would correspond to the substrate binding and translocation channel of the putative MFS transporter (Supplementary Fig. 3).

Additional *in silico* analyses using the database "peroxisome DB", for peroxisomal targeting signal prediction, confirmed the presence of a highly probable Pex19 binding site (Rottensteiner et al., 2004; Fujiki et al., 2006) between amino acids 296–307 (Block *E*-value: 0.051, optimized cut-off probability: 0,1) and discarded at the same time the presence of any peroxisome matrix targeting signal (neither PTS1 nor PTS2) in PenM (Supplementary Fig. 3). All the information obtained from the *in silico* analyses strongly supports the hypothesis that PenM is a hydrophobic protein with 12 TMS arranged in a cylindrical topology and placed in the peroxisomal membrane where it would act as a transporter of the MFS superfamily.

3.2. The silencing strategy leads to the generation of five penM-silenced transformants

With the objective to determine the role of *penM* in the PenG biosynthetic pathway in P. chrysogenum, the expression of penM was silenced and the phenotypic effects derived from the modulated expression were analyzed. With this purpose, the targeted destruction of the mRNA corresponding to *penM* was conducted using the silencing technique mediated by siRNAs (Fig. 1) (Ullán et al., 2008a; Kosalková et al., 2009; García-Estrada et al., 2011). To achieve the penM silencing the integrative plasmid ppenM-RNAi (Fig. 1A) was constructed and then used to transform protoplasts of P. chrysogenum Wis 54-1255. The correct integration of the penM silencing cassette was analyzed by Southern blot hybridization in five phleomycin-resistant tranformants, which were randomly selected. Genomic DNA from transformants SilM-11, SilM-35, SilM-57, SilM-73 and SilM-88 and from the untransformed Wis 54-1255 was extracted, digested with an enzymatic mixture HindIII/SphI and hybridized with a digoxigenin-labeled penMspecific probe (Fig. 1B, see Section 2.4 of Materials and methods). The result of the hybridization showed a 5.54 kb hybridization band in the parental strain corresponding to the HindIII-HindIII genomic fragment bearing the endogenous *penM* gene (Fig. 1B and C). In the five transformants analyzed a 1.81 kb hybridization band appeared which corresponded to the *HindIII–SphI* fragment carrying the PpcbC-penM exonic fragment-Pgpd cassette released from ppenM-RNAi (Fig. 1A and C). This indicated that all the transformants had a correct integration of the *penM* silencing cassette. Transformants also showed the 5.54-kb genomic band, meaning that the endogenous penM gene remained intact in all of them (Fig. 1C).

Once the correct integration of the *penM* silencing cassette was confirmed, the *penM* expression was tested by semiquantitative RT-PCR (Fig. 1D) as described in Section 2.5 of Materials and methods. According to *penM* relative expression values, calculated by measuring the IOD of the amplification band from *penM* and referring it to the IOD measured for the correspondent *actA*-derived band (being *actA* housekeeping gene, encoding the γ -actin) (IOD_{*penM*}/IOD_{*actA*}), all the transformants showed a lower relative expression of *penM* than that measured in the parental

strain Wis 54-1255 (Fig. 1D). This fact proved an efficient silencing of *penM*, provoked by the transformation with *ppenM*-RNAi (the plasmid that bears the cassette responsible for the triggered degradation of the mRNA of the target gene *penM*) in all the engineered strains that were analyzed. The silencing level varied between a 37% reduction in SilM-11, 88% in SilM-35, 3.5% in SilM-57, 64% in SilM-73, and 45% in SilM-88 (Fig. 1D).

3.3. The analysis of beta-lactam production shows that penM-silencing causes a clear decrease in the PenG yield

To test the effect of *penM* silencing on the beta-lactam biosynthesis, the five *penM* silenced transformants and the parental strain Wis 54-1255 were fermented in penicillin production conditions in CP medium for 72 h. Samples were collected for every 24 h along the fermentation, processed and analyzed by HPLC for PenG and IPN estimation.

As regards the PenG yield, it was found that in all the *penM*silenced transformants the PenG specific production (μ g/mg dry weight) was lower than the production measured in the Wis 54-1255 reference strain (Fig. 2A). At late fermentation time-points, when differences between strains were more evident, the reduction of the PenG production in the *ppenM*RNAi-transformed strains (Fig. 2A) ranged from 9% (in SilM-57) to 33% (in SilM-88) except for SilM-35, which showed such a drastic decrease in the PenG production (Fig. 2A) that it became undetectable by HPLC (Fig. 2B). Nonetheless, SilM-35 produced beta-lactams (presumably PenG among them) susceptible to be completely degraded by penicillinase from *B. cereus* as it was demonstrated by bioassay (Fig. 2C). Even in this case the production rate of the mentioned beta-lactams compounds was much more reduced in the transformant SilM-35 than in the parental strain (Fig. 2D).

It was considered that the scarcity of extracellular PenG could have entailed an accumulation of this antibiotic inside the cells of the *penM*-silenced strains. HPLC measurement of the intracellular PenG levels in SilM-11, SilM-35 and SilM-88 revealed that these transformants did not accumulate PenG (Fig. 2E). In these transformants, intracellular PenG levels were lower than those measured in the parental strain after 60 h of growth under penicillin production conditions. The intracellular levels of PenG in the silenced strains represented, respectively, 70%, 12% and 52% of the intracellular PenG detected in Wis 54-1255 (Fig. 2E). This meant that SilM-35 showed the lowest concentration of intracellular PenG, in addition to its undetectable PenG production by HPLC.

Regarding the extracellular IPN yield, different production profiles were observed among the transformant strains. Whereas some of them showed an increase, others exhibited a decrease in IPN levels compared to the parental strain Wisconsin 54 1255 at 48 h and 72 h (Fig. 2F). The global observation of the graphs showed that IPN production is apparently adjusted to a curve. In the case of transformants SilM-57 and SilM-73 the maximum peak of production was around 72 h when their production represents around 92% and 110% of the parental strain production, respectively. In the case of transformants SilM-11, SilM-35 and SilM-88 the IPN production increases faster at the beginning of the fermentative process, with the highest peak found around 48 h when their production reaches 104%, 174% and 225% of the production of the parental strain (Fig. 2D).

In conclusion, whereas there is a clear evidence of the depletory effect of *penM*-silencing on the PenG production, such a clear effect cannot be observed in the IPN production. Nevertheless, silenced strains showed a slightly increase in the IPN production regarding the parental strain at 48 h fermentation.



Fig. 1. Silencing strategy for the *penM* gene in *P. chrysogenum*. (A) Physical map of plasmid ppenM-RNAi that bears the cassette Pgpd-penM exonic fragment-PpcbC responsible for *penM* silencing. (B) Map of the relative position of the endogenous *penM* gene in *P. chrysogenum* genome. In pieces 1A and 1B appear indicated interesting restriction sites as well as the hybridization points of primers SIL-M-PC-F and SIL-M-PC-R. (C) Southern blot analysis of *HindIII/SphI* digested genomic DNAs isolated from six *ppenM*-RNAi transformed strains and from the parental strain Wis 54-1255. The 1.81 kb hybridization band marks the correct integration of the *penM*-silencing cassette *PpcbC-penM* exonic fragment-Pgpd from *ppenM*-RNAi in the genome of all the transformants. The 5.54 kb hybridization band corresponds to the *HindIII* genomic fragment bearing the endogenous *penM* gene. The detection of the target fragments was done with a *penM* internal digoxigenin-labelled probe. The λ -HindIII molecular weight marker appears in the right panel. (D) Test of the expression level of *penM* by semiquantitative RT-PCR in the transformants and in the parental strain. The image presents the electrophoretic bands rendered by amplification products from mRNAs of *penM* and the constitutive *actA*. The graph shows the relative expression values of *penM* (IOD_{*penM*/IOD_{*actA*}) in each strain. The dotted line marks the IOD_{*penM*/IOD_{*actA*} of the reference strain Wis 54-1255. The error bars in the graph indicate the standard data deviations.}}

3.4. The IAT enzyme, encoded by the penDE gene, is expressed in strain SilM-35 and shows an effective in vitro activity

Since transformant SilM-35 neither produced HPLC-detectable levels of PenG nor accumulated it intracellularly, and despite it showed a slightly increase in the IPN production, the unwanted inactivation of the *penDE* gene as a collateral fact associated to the transformation with *ppenM*-RNAi was analyzed. Therefore, the presence of an intact *penDE* gene was tested in the *penM*-silenced SilM-35 through the detection of its protein product, the IAT.

Western blot analysis (see Section 2.6 of Material and methods) revealed the presence of the 29-kDa β -subunit of the IAT enzyme strain Wis 54-1255 and in transformants SilM-11, SilM-57, SilM-73 and SilM-88. Interestingly, the low producer strain SilM-35 had also a processed IAT (Fig. 3A). The test of the *in vitro* IAT activity (see Section 2.7 of Material and methods) in all transformants (Fig. 3B) showed a clear inhibition of the bacterial growth because

of the formation of PenG and thus the existence of efficient enzymatic IAT-activity in the crude protein extracts from those transformants.

3.5. The addition of 6-APA to cultures of the low-producer SilM-35 increases the PenG yield

Transport experiments in relation to the beta-lactam biosynthetic pathway had been carried out previously in *P. chrysogenum* (Garcia-Estrada et al., 2007). According to those experiments, the plasma membrane and the peroxisomal membrane are permeable to 6-APA, the intermediate molecule formed when the IAT uses IPN as substrate in the absence of side chain precursors.

Assuming that PenM is a resident protein of the peroxisomal membrane and having evidence of the influence that exerts on the PenG biosynthesis, one of the transport experiments described by Garcia-Estrada et al. (2007) was adapted to try to decipher the



Fig. 2. Beta-lactam production profile in *penM*-silenced strains. The data presented correspond to samples collected during fermentations under penicillin production conditions in CP medium. Error bars represent the mean deviation values in each case. (A) Specific PenG production of untransformed *P. chrysogenum* Wis 54-1255 and its transformants analyzed by HPLC in culture broths sampled along 72 h of fermentation. Note that, except for SilM57, all the *penM*-silenced transformants had production rates below those of the parental strain, especially SilM-35. (B) Composition of representative chromatographic runs during the PenG detection method rendered by the strains Wis 54-1255 and the silenced SilM-35 (low PenG producer) and SilM-11, the later selected at random as representative of the rest of the silenced strains. (C) Bioassay plates of diluted 72 h samples of Wis 54-1255 and SilM-35 strains in CP fermentations under penicillin production conditions. *M. luteus* ATCC 9341 growth inhibition halos are clearly observed in routine bioassay but these halos disappear when the *M. luteus* ATCC 9341-inoculated media is supplemented with penicillinase from *B. cereus* meaning that the bioactive compounds are sensitive to the mentioned beta-lactamase activity. (D) Bioassay-estimated volumetric production of beta-lactam bioactive compounds by Wis 54-1255 and SilM-38 and SilM-88 (with the lowest PenG secretion rate) and in the reference strain Wis 54-1255, showing that *penM*-silenced transformants do not accumulate PenG intracellularly. (F) Specific IPN production by the parental Wis 54-1255 strain and the *penM*-silenced ones estimated from HPLC wealurements in 60 h-samples of the valuations of culture broths collected at 48 and 72 h.

substrate of PenM (Fig. 3C and D). With this aim, the *penM*-silenced SilM-35 and the reference strain Wis 54-1255 were fermented in DP medium supplemented with different concentrations of 6-APA. Simultaneously, two fermentations in control conditions were carried out: in DI medium (in absence of pheny-lacetate and 6-APA) and in DP medium (without 6-APA supplementation). The PenG production ability of SilM-35 and Wis

54-1255 was tested by HPLC in culture broths harvested at 48, 72 and 96 h of fermentation. In the case of the parental strain, as expected, there was no PenG production in the fermentation in DI medium (in the absence of phenylacetate and 6-APA). In the rest of the fermentative conditions, there were no differences in the PenG yield. The specific production increased during the fermentation but it remained unaffected by the supplementation with ranging



Fig. 3. Approach to the characterization of IAT enzyme in the *penM*-silenced strains and PenG production with 6-APA feeding. (A) Western blot and immunodetection of the monomeric active form of the IAT (the 29 kDa β -subunit) in crude protein extracts showing its presence in all the *penM*-silenced strains, even in the low PenG producer SilM-35. The parental strain Wis 54-1255 was used as positive control. (B) *In vitro* IAT activity in crude protein extracts from SilM-11, SilM-35, SilM-57 and Wis 54-1255. PenG formation was assessed bioassaying the protein extracts against *M. luteus* ATCC 9341 after incubation in presence of 6-APA and phenylacetyl-CoA. The graph represents the diameter lengths of the growth inhibition halos obtained in each case. (C) HPLC-estimated specific PenG production by Wis 54-1255 and SilM-35 along fermentations in DP medium under 6-APA feeding conditions (supplementation with 6-APA 0.253 mM, 0.505 Mm, 2.527 mM and 5.054 mM,) or under control conditions [in absence of phenylacetate or 6-APA (DI) or in absence of 6-APA (DP)] with a detailed view of the PenG production profile of SilM-35. Observe that the parental strain produces much more PenG than the silenced transformant and that the PenG yield is not dependent on the availability of 6-APA. On the contrary, the PenG yielding in the case of SilM-35 appears to be highly dependent on the 6-APA supplementation. The error bars in the graphs indicate the standard data deviations. (D) Chromatograms rendered by samples from SilM-35 collected at 96 h during fermentations in DP medium under 6-APA feeding conditions effort for APA.

amounts of 6-APA (Fig. 3C). This result means that the availability of IPN is enough to produce the maximum amount of PenG in the strain Wis 54-1255, being the conversion of IPN into PenG a saturated stage. On the contrary, in the case of the transformant SiIM-35 data showed that specific PenG production rises with the fermentation time and with the increasing concentrations of 6-APA (Fig. 3C and D). Along the fermentation, both strains showed parallel biomass values, thus discarding the influence of distinct growth rates on the PenG production (data not shown).

Considering the production in the condition DP (in the presence of phenylacetic acid but with no 6-APA added) as the basal production level, according to HPLC measurements, the PenG production increases around 1.72, 2.27, 8.49 and 14.13 times with 0.253 mM, 0.505 Mm, 2.527 mM and 5.054 mM 6-APA supplementations, respectively (Fig. 3C and D). This increase in the PenG production observed in the *penM*-silenced strain under 6-APAfeeding conditions indicates that the flux of PenG out of the peroxisome is not blocked in the silenced strain SilM-35. This result excluded the possibility that PenM is a PenG transporter and suggested that this transporter may be responsible for the entry of IPN into the peroxisomal lumen.

3.6. *PenM overexpressing mutants show an enhanced flux through the beta-lactam biosynthetic pathway*

To reinforce the hypothesis that *penM* is involved in the betalactam biosynthetic pathway, the expression of *penM* was enhanced by the use of a strong promoter in P. chrysogenum (Fig. 4). With the purpose of increasing the expression level of penM, the integrative plasmid pSBR-penM was designed and constructed (for plasmid details, see Section 2.2 of Material and methods and Fig. 4A). This plasmid was introduced into protoplasts of P. chrysogenum Wis 54-1255 together with the helper plasmid pJL43 (Gutierrez et al., 1991), the latter carrying a phleomycin resistance cassette, which allowed the selection of transformant clones. Several strains selected by their ability to grow in the phleomycin-supplemented medium were subjected to Southern analysis to assess the correct integration of the penM overexpression cassette. For these analyses, genomic DNAs extracted from transformants SbrM-111, SbrM-153, SbrM-172, SbrM-177, SbrM-199 and from the untransformed Wis 54-1255 were digested with an enzymatic mixture KpnI/BamHI and then hybridized with a penM-specific probe (Fig. 4B). As result of this



Fig. 4. Overexpression strategy of *penM* gene in *P. chrysogenum*. (A) Physical map of pSBRpenM, the plasmid that bears the *penM* overexpression cassette *Pgdh-penM*-Tcyc1 consisting in the *penM* gene under the control of the high efficiency fungal promoter *Pgdh* and the Tcyc1 terminator. (B) Map of the relative position of the endogenous *penM* gene in the genome of *P. chrysogenum* with respect to *KpnI* and *BamHI* interesting restriction sites. (C) Southern blot hybridization of strains transformed with the pSBR*penM* plasmid and the untransformed Wis 54-1255. Genomic DNAs of the strains tested were digested with an enzymatic mixture *BamHI/KpnI* that releases a 5.26 kb *KpnI-KpnI* fragment from the genomic DNA that contains the endogenous *penM* gene and a 2.95 Kb *KpnI-BamHI* fragment corresponding to the whole *Pgdh-penM-Tcyc1* overexpression cassette. The detection of the target fragments was done with the same *penM* internal labeled probe used for the Southern in Fig. 1. As molecular weight marker was used λ -HindIII. (D) Measurement of *penM* expression profile by semiquantitave RT-PCR in the parental strain and in the pSBR*penM*-transformed strains. The image shows the electrophoretic bands rendered by RT-PCR amplification products from *penM* and *actA* transcripts. The graph illustrates the relative expression level of *penM* (IOD_{*penM/*}[IOD_{*actA*} of the reference strain Wis 54-1255. The IOD_{*penM/*}[IOD_{*actA*} values of all of the transformants exceed the limit settled by the parental strain, thus meaning that in all of them the expected increase of the *penM* expression has been obtained. The error bars in the graph indicate the standard data deviations.

Southern hybridization, the presence of a 2.95-kb band corresponding to the *KpnI–BamHI* fragment including the *Pgdh-penM*-Tcyc1 overexpression cassette was evidenced in all transformants (Fig. 4A and C). They also showed a 5.26 kb hybridization signal, which corresponded to the genomic fragment containing the endogenous *penM* gene. As expected, the last hybridization signal was the only one observed in the parental strain Wis 54-1255 (Fig. 4B and C).

The overexpression of penM gene in the pSBR-penM-transformed clones was checked by semiquantitative RT-PCR (Fig. 4D) (for more details, see Section 2.5 of Material and methods). Transcripts corresponding to *penM* and *actA* genes were amplified and processed as described previously. The densitometry of the electrophoretic bands generated by the amplification products from *penM* and *actA* transcripts was quantified with the application Gel Pro Analyzer 3.1. Relative penM expression values (IODpenM/IODactA) revealed the increased expression level of penM in all the transformants bearing the Pgdh-penM-Tcyc1 cassette integrated in their genomes (Fig. 4D). This fact meant that all of the transformants had a real overexpression of the target *penM* gene. The strongest increase of *penM* expression level was detected in the transformant SbrM-153, which showed the highest PenG and IPN specific production values as indicated below. This fact pointed to a clear connection between the overexpression of *penM* and the improvement of the beta-lactam production.

To confirm this possible connection, the expression level of the PenG biosynthetic genes in the *penM*-overexpressing transformants and in the parental strain was analyzed by semiquantitative RT-PCR and northern blot hybridization (Supplementary Fig. 4 A and B). Interestingly, the semiquantitative RT-PCR analysis indicated that the *pcbAB* expression level (IOD_{pcbAB}/IOD_{actA}) was increased in all of the transformants in comparison with the parental strain (Supplementary Fig. 4A). Northern blot analysis (Supplementary Fig. 4B) revealed that the relative expression of both *pcbC* (IOD_{pcbC}/IOD_{actA}) and *penDE* (IOD_{penDE}/IOD_{actA}) was higher in the *penM*-overexpressing strains than in the reference Wis 54-1255. These facts provided genetic evidence supporting the improved beta-lactam production observed in the overexpressing transformants.

The effect of *penM* overexpression on the beta-lactam production was studied through the fermentation of positive transformants together with the reference strain Wis 54-1255 under penicillin production conditions in CP medium. HPLC measurement of the PenG content in the culture broths from each transformant and the parental strain revealed an increase of this antibiotic in the *penM* overexpressing strains (Fig. 5A). In fact, increases from 69% (strain SbrM-199) to 136% (strain SbrM-153) were observed in the PenG specific production at late fermentation times (72 h). With respect to the production of the intermediate IPN, measured also by HPLC, *penM*-overexpressing transformants tended to produce higher amounts than their parental



Fig. 5. Beta-lactam production in the *penM*-overexpressing strains. The data presented correspond to samples measured by HPLC that were collected during fermentations of the *penM*-overexpressing strains and their parental strain under penicillin production conditions in CP medium. (A) Specific PenG production in culture broths sampled along 72 h of fermentation. (B) Specific IPN production in culture broths collected at 48 and 72 h. Note that the *penM*-overexpressing strains tend to produce higher PenG yields and greater IPN amounts than Wis 54-1255. Error bars indicate the standard data deviations.

strain. The increase in the production of transformants Sbr-153 and Sbr-177 reached 69% and 27% over the production of the parental strain, respectively (Fig. 5B).

The increase in the production of both PenG and IPN (Fig. 5) in the *penM*-overexpressing strains appeals to the real implication of *penM* as a transporter of intermediates within the PenG biosynthetic pathway in *P. chrysogenum*, channeling the metabolic flux through this pathway to the synthesis of the final product (PenG).

3.7. PenM is a peroxisomal protein

The *in vivo* location of PenM was achieved by the expression of the PenM-derived red fluorescent protein named PenM-DsRed in hyphal cells of *P. chrysogenum* (Figs. 6 and 7). Protoplasts of *P. chrysogenum* were simultaneously transformed with two integrative plasmids pPenM-DsRed and p43EGFP-SKL (Ullán et al., 2010) (for plasmid details, see Section 2.2 of Material and methods). Transformants were selected by their resistance to phleomycin and analyzed by Southern blot hybridization. Genomic DNAs were digested with enzymatic mixtures of *Apal/EcoD*R2 or

NcoI to detect those transformants bearing, respectively, the cassettes encoding PenM-DsRed and EGFP-SKL by means of hybridizations with the DsRed and eGFP-SKL probes. The correct integration of PpcbC-eGFP-SKL-TpenDE (encoding EGFP-SKL) is indicated by the presence of a 2.1-kb band once NotI digested DNAs are hybridized with an *eGFP*-SKL specific-probe (Fig. 6A). The correct integration of Pgdh-penM-DsRed-Tcyc1 (encoding PenM-DsRed) is represented by the presence of a 3.6 kb hybridization band with the DsRed specific-probe in the Apal/EcorDR2-digested DNAs (Fig. 6B). Two positive transformants. TMRed-8 and TMRed-25, showing the required hybridization bands (Fig. 6A and B), were grown under the conditions described previously (Fernández-Aguado et al., 2013b). Laser scanning microscopy examination of the samples of TMRed25 revealed that PenM-DsRed is located in peroxisomes (Fig. 7). Red fluorescence signals generated by the PenM-based chimeric protein PenM-DsRed (Fig. 7B) and green fluorescence signals (Fig. 7A) corresponding to EGFP-SKL were coincident, as inferred from the merged microscopy images, which show the yellow fluorescence resulting from the superposition of both red and green fluorescent signals(Fig. 7C). The peroxisome EGFP-SKL, targeted to the peroxisomal lumen, marks small round shapes, completely attributable to this type of organelles (Fig. 7A). PenM-DsRed is found in the same subcellular structures when it is expressed in P. chrysogenum cells (Fig. 7B), so it is assumable that PenM is naturally located in the peroxisomal membrane of P. chrysogenum. The same conclusion was deduced form the examination of samples from TMRed-8 (data not shown).

4. Discussion

The genome of every single cell encodes a variety of transporter proteins, which are of notable importance since they allow the transport of substrates across lipid bilayers, thus contributing to the physiological balance of cells from bacterial to higher eukaryote organisms. Among these transporters, around 10% are estimated to belong to the MFS (Paulsen et al., 1996; Paulsen, 2003). MFS members are single polypeptides that act as secondary carriers driven by proton motive force of the transmembrane electrochemical proton gradient (Paulsen et al., 1996; Saier et al., 1999; Martín et al., 2012b). By means of the present investigation with the *P. chrysogenum* genome, we have analyzed the function of a MFS member that we named as PenM. The penM gene (encoding the PenM protein) was found to be the most similar P. chrysogenum gene to Acremonium chrysogenum cefM through comparative analyses of their nucleotide sequences with the algorithm Blastn (nucleotide-nucleotide alignment with Basic Local Alignment Search Tool, NCBI). CefM has been described as the peroxisomal membrane transporter in charge of PenN exportation from the peroxisomal lumen to the cytoplasm (Teijeira et al., 2009). The great majority of the MFS transporters exhibit a canonical structural fold that comprises 12 hydrophobic TMS organized into two discretely folded domains, each containing 6 consecutive TMS (Paulsen et al., 1996; Hirai et al., 2003; Yan, 2013). MFS members share several highly conserved motifs playing important roles in structural and functional tasks in the transporter (Paulsen and Skurray, 1993). The P. chrysogenum PenM is predicted to be a hydrophobic membrane protein showing two blocks, each one with six transmembrane spanners (Supplementary Fig. 3), and fitting with the characteristic 6TMS/6TMS structure that corresponds to that of the MFS members (Paulsen et al., 1996; Reddy et al., 2012). MFS transporters are characteristically polyspecific transporters, what can be partially explained because of their versatile substrate binding hydrophobic chamber, which allows the accommodation of many dissimilar molecular structures (Paulsen et al., 1996; Pao et al., 1998). In fact, it is hypothesized that many MFS present in a cell fulfilled a broad diversity of roles in the transport of different substrates. During evolution under selective pressure, they



Fig. 6. Southern blot analysis of the *P. chrysogenum* Wis 54-1255 cotransformed strains with the integrative plasmids p43EGFP-SKL and pPenM-DsRed. (A) Physical map of the p43EGFP-SKL plasmid that bears the cassette encoding the peroxisome-targeted green fluorescent protein EGFP-SKL. Southern blot hybridization with an *eGFP*-SKL-specific probe of *Ncol* digested genomic DNAs isolated from transformants and the parental strain (Wis 54-1255) as control. The 2.1 kb band corresponds to the correct integration of the cassette *PpcbC-eGFP*-SKL-*TpenDE* for the expression of EGP-SKL protein. (B) Physical map of pPenM-DsRed plasmid that bears the cassette for the expression of the hybridization with a *DsRed*-specific probe of the *Apal/EcoDR2* digested genomic DNAs isolated from Wis 54-1255 and the transformants. The 3.6 kb hybridization band corresponds to the correct integration of the cassette *Pgdh-penM-DsRed*-Tcyc1 encoding the red fluorescent PenM-DsRed. Note that the positive transformants TMRed-8 and TMRed-25 were used in the microscopy analysis to verify the *in vivo* localization of PenM.

may have suffered mutations that changed the ligand binding specificity and they may have adapted to transport, for example, certain secondary metabolites (Paulsen, 2003; Yan, 2013). Supporting this fact, PenM renders significative alignments with multidrug resistance proteins involved in detoxification processes in Penicillium distant genera like Coccidioides, Paracoccidioides, Ajellomyces or Arthroderma (Table 2, Supplementary Fig. 1), as well as with many other hypothetical MFSs found in more closely related genus such as Fusarium, Aspergillus, Neosartorya and even in other Penicillium species (Table 3, Supplementary Fig. 2). These 12 TMS would be organized topologically around a central channel, as predicted by 3D modeling (Supplementary Fig. 3C). This channel would be putatively used to bind and move the PenM substrate between different cellular compartments. Moreover, PenM protein is targeted to the peroxisomal membrane since it bears a Pex-19p binding site between amino acids 293 and 307, which would make possible its insertion in the peroxisomal membrane through a canonic Pex-19-dependent mechanism (Rottensteiner et al., 2004; Fujiki et al., 2006). The observation by laser scanning microscopy of P. chrysogenum cells coexpressing a PenM-derived red fluorescent protein (named PenM-DsRed) and a peroxisome-targeted green fluorescent protein (named EGFP-SKL) confirmed the placement of PenM in the peroxisomes of the penicillin producer *P. chrysogenum* (Fig. 5). This peroxisome-associated placement of PenM supports the possible influent role of PenM in relation to the beta-lactam biosynthetic pathway in *P. chrysogenum*, since it has been well demonstrated that peroxisomes play an important part in this biochemical route that includes some enzymatic steps occurring inside these organelles (van de Kamp et al., 1999; Martín et al., 2012a, 2012b).

The involvement of PenM in the penicillin biosynthesis in *P. chrysogenum* was tested analyzing two types of engineered strains obtained by silencing and overexpressing the *penM* gene. With both types of transformants, as a consequence of *penM* gene expression modulation and depending on the provoked decreases or increases in *penM* expression levels, interesting and clear complementary effects on PenG yield were obtained. In *penM*-overexpressing strains, PenG production reaches levels up to 136% of the measured production in the parental strain (Fig. 5A), being





Fig. 7. Ultrastructural analysis of the *P. chrysogenum* transformant strain TMRed-25, bearing the heterologue expression of the chimeric fluorescent proteins EGFP-SKL and PenM-DsRed. (A) Merged image (combined phase contrast and fluorescent images) showing the green fluorescence originated by the peroxisome-targeted protein EGFP-SKL Peroxisomes, then, appear marked in green. (B) Merged image where the red fluorescence from PenM-DsRed marks PenM subcellular location in *P. chrysogenum* hyphal cells. (C) Overlay of the images A and B in which is given evidence for the coincident placement of EGFP-SKL-derived and PenM-DsRed-derived fluorescence due to the appearance of the yellow fluorescence as the sign of the superposition of the primary green and red one. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

this the case for SbrM-153. IPN production also rose up to maximums exceeding the parental strain production by 69%, which occurred also in SbrM-153 (Fig. 5B). The simultaneous augmentation of the production of both beta-lactam antibiotics demonstrates an increased metabolic flux through the whole PenG biosynthetic pathway (Fig. 5) due to the overexpression of *penM* in the engineered strains (Fig. 4D). This justifies the increment in the expression levels of the *pcbC* and *penDE* biosynthetic genes in these *penM*-overexpressing transformants (Supplementary Fig. 4).

By means of the silencing strategy five strains with different penM silencing degrees were obtained (Fig. 1). All these transformants suffered a clear decrease in PenG production, especially evidenced in SilM-35 strain (with the highest degree of penM gene silencing), where the production is undetectable by HPLC when cultured in CP medium (Fig. 2). Moreover, according to the bioassay measurements, the production of beta-lactam metabolites (PenG among them) only reached an amount of around 5.68 μ g/ml when the reference strain produced over 500 μ g/ml during standard fermentative processes in the same bioassays (Fig. 2C and D). The PenG intracellular levels measured showed that none of the analyzed transformants presented an intracellular PenG amount higher than that of the parental strain (Fig. 2E). This means that PenG production reduction is not associated with an accumulation of the mentioned metabolite inside the cell, which does not indicate a deficient secretion of PenG, but a deficient synthesis of PenG. With respect to the IPN yield, a drifted production profile is detected in the *penM*-silenced transformants, but showing a slightly increased production in terms of specific production as compared to that of the parental strain (Fig. 2F). This increase may represent the IPN amount that cannot be converted into PenG in the *penM*-silenced strains.

The possibility of a faulty IAT as the cause of the defective PenG yielding in the singular SilM-35 silenced strain was discarded when the presence of an intact IAT protein was showed through a western blot analysis (Fig. 3A and B) in its monomeric but active version (the 29 kDa peptide corresponding to the β -subunit of the primary heterodimer α/β) in the mentioned strain (Fig. 3A). Additionally, the IAT from SilM-35 did not show differences with respect to the IAT from the reference strain Wis 54-1255 in terms of *in vitro* activity to convert phenylacetyl-CoA and 6-APA to PenG in optimal controlled conditions (Fig. 3B). In the rest of all the *penM*-silenced strains, it was also confirmed the presence of the active form of the IAT enzyme.

The strain SilM-35, given its restricted *penM* gene expression level, was used in an attempt to discern the substrate transported by PenM making an intermediate transport evaluation (Fig. 3). As it is known, 6-APA can go through the plasma and the peroxisomal membranes by passive diffusion (García-Estrada et al., 2008), meaning that this precursor would be available for the intraperoxisomal IAT when it is added to the culture broth. Given the permeability characteristics of 6-APA, the increase in the specific PenG production ability of SilM-35 can be interpreted as if in this silenced strain the PenG exportation is not blocked. This implies that PenM would not be involved in the extraction of PenG from the peroxisome, but in the importation of IPN to the peroxisomal lumen, where it would be used by the IAT as substrate to form PenG (Martín et al., 2013).

The proposal that IPN is the substrate transported by PenM is consistent with the fact that the hydrophilic character of the IPN molecules would avoid their passing across the lipid hydrophobic membranes on their own, without the intervention of a transporter protein (Ullán et al., 2010). In addition, the structural and biochemical similarities between IPN and PenN, being the L and D enantiomers of the same chemical structure, has to be noted. PenN is the substrate of the A. chrysogenum CefM (Teijeira et al., 2009) and IPN is the proposed substrate of P. chrysogenum PenM (found by crossed homology with CefM). This fact points out a conserved range of specificity of these transporter proteins among these two fungi that share part of the beta-lactam biosynthetic pathway. This designation of PenM as the IPN transporter based on the result obtained from the fermentation under 6-APA supplementation conditions fits also well with the beta-lactam production profiles observed in the penM-silenced (Fig. 2) and in the penM-overexpressing transformants (Fig. 5): the PenM diminished dosage occurring in the *penM*-silenced strains causes the IPN importation rate inside the peroxisome to decrease, which has a direct depletory effect on PenG production due to the scarcity of IPN precursor molecules. On the contrary, the increment in the PenM dosage taking place in the penM-overexpressing strains allows a higher rate of IPN entrance in the peroxisome, thus favouring PenG synthesis.

Apart from the intrinsic interest of enlarging our understanding of the intricate puzzle of the beta-lactam biosynthesis, the characterization of transporters involved in the antibiotic biosynthesis has an interesting industrial scope, given the pharmaceutical relevance of these compounds (Martín et al., 2013). The comprehension of the molecular basis of crucial transport processes may facilitate the triggered engineering of producing strains to augment the flux through the pathway with the aim of increasing yields of the metabolites of interest (Martin et al., 2005; Teijeira et al., 2011). In this case, IPN importation into the peroxisomes is a crucial step in the biochemical route leading to PenG.

Taken together the results of all the procedures run in this work, they do constitute a solid basis for the description, for the first time, of an MFS transporter resident in the peroxisomal membrane that is probably in charge of the translocation of the hydrophilic IPN from the cytosolic to the luminal side of the peroxisomal layer. This role as the transporter protein that drills the peroxisomal membrane confers PenM a crucial role in the beta-lactam biosynthetic pathway in *P. chrysogenum*, due to the well known compartmentalization of the penicillin biosynthesis in the peroxisomes of this filamentous fungus. In summary, we have provided strong evidences pointing to a putative transporter mediating the entrance of IPN inside peroxisomes.

Acknowledgments

Marta Fernández-Aguado was supported by a Grant for recent graduate researcher staff training program from the Junta de Castilla y León and co-financed by the European Social Fund [Grant number Q2432001B]. We acknowledge the excellent technical assistance of A. Sánchez-Rodríguez, B. Martín, J. Merino, A. Casenave and A. Mulero.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben. 2014.01.004.

References

- Aharonowitz, Y., Cohen, G., Martín, J.F., 1992. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. Annu. Rev. Microbiol. 46, 461–495.
- Cantoral, J.M., Díez, B., Barredo, J.L., Álvarez, E., Martín, J.F., 1987. High-frecuency transformation of *Penicillium chrysogenum*. Bio/Technology 5, 494–497.
- Cardoza, R.E., Moralejo, F.J., Gutiérrez, S., Casqueiro, J., Fierro, F., Martín, J.F., 1998. Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the gdhA gene of Aspergillus awamori encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. Curr. Genet. 34, 50–59.
- Casqueiro, J., Gutierrez, S., Bañuelos, O., Hijarrubia, M.J., Martín, J.F., 1999. Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. J. Bacteriol. 181, 1181–1188.
- Coque, J.J., Liras, P., Martin, J.F., 1993. Genes for a beta-lactamase, a penicillinbinding protein and a transmembrane protein are clustered with the cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*. EMBO J. 12, 631–639.
- Díez, B., Gutierrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H., Martín, J.F., 1990. The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. J. Biol. Chem. 265, 16358–16365.
- Evers, M.E., Trip, H., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A., Driessen, A.J., 2004. Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotics biosynthesis. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 88, 111–135.
- Fernández, F.J., Cardoza, R.E., Montenegro, E., Velasco, J., Gutiérrez, S., Martín, J.F., 2003. The isopenicillin N acyltransferases of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* differ in their ability to maintain the 40-kDa alphabeta heterodimer in an undissociated form. Eur. J. Biochem. 270, 1958–1968.
- Fernández, F.J., Gutiérrez, S., Velasco, J., Montenegro, E., Marcos, A.T., Martín, J.F., 1994. Molecular characterization of three loss-of-function mutations in the isopenicillin N-acyltransferase gene (*penDE*) of *Penicillium chrysogenum*. J. Bacteriol. 176, 4941–4948.
- Fernández-Aguado, M., Teijeira, F., Martín, J.F., Ullán, R.V., 2013a. A vacuolar membrane protein affects drastically the biosynthesis of the ACV tripeptide and the beta-lactam pathway of *Penicillium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 795–808.

- Fernández-Aguado, M., Ullán, R.V., Teijeira, F., Rodríguez-Castro, R., Martín, J.F., 2013b. The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by the PaaT protein in *Penicillium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 3073–3084.
- Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B., Gutiérrez, S., Fernández, F.J., Martín, J.F., 1995. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6200–6204.
- Fujiki, Y., Matsuzono, Y., Matsuzaki, T., Fransen, M., 2006. Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. Biochim. Biophys. Acta 1763, 1639–1646.
- García-Estrada, C., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Fernández-Bodega, M.A., Durek, P., von Dohren, H., Martín, J.F., 2011. A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. Chem. Biol. 18, 1499–1512.
- García-Estrada, C., Vaca, I., Fierro, F., Sjollema, K., Veenhuis, M., Martín, J.F., 2008. The unprocessed preprotein form IATC103S of the isopenicillin N acyltransferase is transported inside peroxisomes and regulates its self-processing. Fungal Genet. Biol. 45, 1043–1052.
- Garcia-Estrada, C., Vaca, I., Lamas-Maceiras, M., Martin, J.F., 2007. *In vivo* transport of the intermediates of the penicillin biosynthetic pathway in tailored strains of *Penicillium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 169–182.
- Gutierrez, S., Díez, B., Álvarez, E., Barredo, J.L., Martín, J.F., 1991. Expression of the penDE gene of Penicillium chrysogenum encoding isopenicillin N acyltransferase in Cephalosporium acremonium: production of benzylpenicillin by the transformants. Mol. Gen. Genet. 225, 56–64.
- Gutiérrez, S., Velasco, J., Marcos, A.T., Fernández, F.J., Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B., Martín, J.F., 1997. Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48, 606–614.
- Harris, D.M., Westerlaken, I., Schipper, D., van der Krogt, Z.A., Gombert, A.K., Sutherland, J., Raamsdonk, L.M., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A., Pronk, J.T., Daran, J.M., 2009. Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated *cephem* antibiotic precursor. Metab. Eng. 11, 125–137.
- Hirai, T., Heymann, J.A., Maloney, P.C., Subramaniam, S., 2003. Structural model for 12-helix transporters belonging to the major facilitator superfamily. J. Bacteriol. 185, 1712–1718.
- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Teijeira, F., Mauriz, E., Martín, J.F., 2009. The global regulator *LaeA* controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. Biochimie 91, 214–225.
- Lamas-Maceiras, M., Vaca, I., Rodríguez, E., Casqueiro, J., Martín, J.F., 2006. Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an aryl-capping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. Biochem. J. 395, 147–155.
- Liras, P., 1999. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. Cephamycins produced by actinomycetes. Antonie Van Leeuwenhoek 75, 109–124.
- Martin, J.F., Casqueiro, J., Liras, P., 2005. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. Curr. Opin. Microbiol. 8, 282–293.
- Martín, J.F., García-Estrada, C., Ullán, R.V., 2012a. Genes encoding penicillin and cephalosporin biosynthesis in Acremonium chrysogenum: two separate clusters are required. In: Gupta, V.K., Ayyachamy, M. (Eds.), Biotechnology of Fungal Genes. Science Publishers (An Imprint of Edenbridge Ltd., British Channel Islands), Enfield, New Hampshire 03478, USA., pp. 113–138.
 Martín, J.F., García-Estrada, C., Ullán, R.V., 2013. Transport of substrates into
- Martín, J.F., García-Estrada, C., Ullán, R.V., 2013. Transport of substrates into peroxisomes: the paradigm of β-lactam biosynthetic intermediates. BioMol. Concept. 4, 197–211.
- Martín, J.F., Ullán, R.V., García-Estrada, C., 2010. Regulation and compartmentalization of beta-lactam biosynthesis. Microb. Biotechnol. 3, 285–299.
- Martín, J.F., Ullán, R.V., García-Estrada, C., 2012b. Role of peroxisomes in the biosynthesis and secretion of beta-lactams and other secondary metabolites. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39, 367–382.
- Müller, W.H., van der Krift, T.P., Krouwer, A.J., Wosten, H.A., van der Voort, L.H., Smaal, E.B., Verkleij, A.J., 1991. Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. EMBO J. 10, 489–495.
- Ozcengiz, G., Demain, A.L., 2013. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. Biotechnol. Adv. 31, 287–311.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saier , M.H., 1998. Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1–34.
- Paulsen, I.T., 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. Curr. Opin. Microbiol. 6, 446–451.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H., Skurray, R.A., 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. 60, 575–608.
- Paulsen, I.T., Skurray, R.A., 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes—an analysis. Gene 124, 1–11.
- Punt, P.J., Kramer, C., Kuyvenhoven, A., Pouwels, P.H., van den Hondel, C.A., 1992. An upstream activating sequence from the *Aspergillus nidulans gpdA* gene. Gene 120, 67–73.
- Reddy, V.S., Shlykov, M.A., Castillo, R., Sun, E.I., Saier , M.H., 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. FEBS J. 279, 2022–2035.
- Rottensteiner, H., Kramer, A., Lorenzen, S., Stein, K., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R., 2004. Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19pbinding sites that are an integral part of their targeting signals. Mol. Biol. Cell 15, 3406–3417.

- Russo, P., Li, W.Z., Hampsey, D.M., Zaret, K.S., Sherman, F., 1991. Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of cyc1 mRNA in the yeast Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. 10, 563–571.
- Saier , M.H., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jahn, P.S., Lew, K., Liu, J., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Tseng, T.T., Virk, P.S., 1999. The major facilitator superfamily. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1, 257–279.
- Scheckhuber, C.Q., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2013. Improving penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by glyoxalase overproduction. Metab. Eng. 18, 36–43.
- Teijeira, F., Ullán, R.V., Fernández-Aguado, M., Martín, J.F., 2011. CefR modulates transporters of beta-lactam intermediates preventing the loss of penicillins to the broth and increases cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum*. Metab. Eng. 13, 532–543.
- Teijeira, F., Ullán, R.V., Guerra, S.M., García-Estrada, C., Vaca, I., Martín, J.F., 2009. The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production. Biochem. J. 418, 113–124.
- Ullán, R.V., Campoy, S., Casqueiro, J., Fernández, F.J., Martín, J.F., 2007. Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. Chem. Biol. 14, 329–339.
- Ullán, R.V., Casqueiro, J., Bañuelos, O., Fernández, F.J., Gutierrez, S., Martín, J.F., 2002b. A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in Acremonium chrysogenum. J. Biol. Chem. 277, 46216–46225.
- Ullán, R.V., Casqueiro, J., Naranjo, L., Vaca, I., Martín, J.F., 2004. Expression of *cefD2* and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis. Mol. Genet. Genomics 272, 562–570.
- Ullán, R.V., Godio, R.P., Teijeira, F., Vaca, I., García-Estrada, C., Feltrer, R., Kosalková, K., Martín, J.F., 2008a. RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression. J. Microbiol. Methods 75, 209–218.
- Ullán, R.V., Liu, G., Casqueiro, J., Gutierrez, S., Bañuelos, O., Martín, J.F., 2002a. The *cef*T gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux

pump protein that significantly increases cephalosporin C production. Mol. Genet. Genomics 267, 673–683.

- Ullán, R.V., Teijeira, F., Guerra, S.M., Vaca, I., Martín, J.F., 2010. Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C. Biochem. J. 432, 227–236.
- Ullán, R.V., Teijeira, F., Martin, J.F., 2008b. Expression of the Acremonium chrysogenum cefT gene in Penicillum chrysogenum indicates that it encodes an hydrophilic beta-lactam transporterCurr. Genet. 54, 153–161.
- van de Kamp, M., Driessen, A.J., Konings, W.N., 1999. Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. Antonie Van Leeuwenhoek 75, 41–78.
- van der Lende, T.R., van de Kamp, M., Berg, M., Sjollema, K., Bovenberg, R.A., Veenhuis, M., Konings, W.N., Driessen, A.J., 2002. Delta-(L-alpha-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. Fungal Genet. Biol. 37, 49–55.
- Veiga, T., Gombert, A.K., Landes, N., Verhoeven, M.D., Kiel, J.A., Krikken, A.M., Nijland, J.G., Touw, H., Luttik, M.A., van der Toorn, J.C., Driessen, A.J., Bovenberg, R.A., van den Berg, M.A., van der Klei, I.J., Pronk, J.T., Daran, J.M., 2012. Metabolic engineering of beta-oxidation in *Penicillium chrysogenum* for improved semisynthetic cephalosporin biosynthesis. Metab. Eng. 14, 437–448.
- Wang, F.Q., Liu, J., Dai, M., Ren, Z.H., Su, C.Y., He, J.G., 2007. Molecular cloning and functional identification of a novel phenylacetyl-CoA ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 360, 453–458.
- Weber, S.S., Kovalchuk, A., Bovenberg, R.A., Driessen, A.J., 2012. The ABC transporter ABC40 encodes a phenylacetic acid export system in *Penicillium chrysogenum*. Fungal Genet. Biol. 49, 915–921.
- Yan, N., 2013. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transportersTrends Biochem. Sci. 38, 151–159.
- Yang, J., Xu, X., Liu, G., 2012. Amplification of an MFS transporter encoding gene penT significantly stimulates penicillin production and enhances the sensitivity of *Penicillium chrysogenum* to phenylacetic acid. J. Genet. Genomics 39, 593–602.
- Yu, Z.L., Liu, J., Wang, F.Q., Dai, M., Zhao, B.H., He, J.G., Zhang, H., 2011. Cloning and characterization of a novel CoA-ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. Folia Microbiol. (Praha) 56, 246–252.

Publicaciones originales

-

_

New insights into the isopenicillin N transport in *Pencillium chrysogenum*

Marta Fernández-Aguado^b, Juan F. Martín^b, Raquel Rodríguez-Castro^a, Carlos García-Estrada^a, Silvia María Albillos^a, Fernando Teijeira^a, Ricardo V. Ullán^{a^{*}}.

^a Institute of Biotechnology of León (INBIOTEC), Av. Real s/n, 24006 León, Spain

^b Area of Microbiology, Department of Molecular Biology, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071, León Spain

^{*}Corresponding author:

Dr. Ricardo Vicente Ullán. Institute of Biotechnology of Leon (INBIOTEC), Av. Real s/n, 24006 León, Spain Phone: +34 987 210308; Fax: +34 987 210388. E-mail: <u>rvicu@unileon.es</u>

Supplementary figure legends

Supplementary figure 1. Significant alignments of *P. chrysogenum* PenM protein against whole protein databases (Genebank, Protein Data Bank, Protein Information Resource, Protein Research Foundation). The most significant alignments are obtained with proteins involved in the detoxification of a variety of compounds found in human pathogenic ascomycetes. Conserved amino acids are shaded in grey.

Supplementary figure 2. Multiple sequence significant alignment of *P. chrysogenum* PenM protein and proteins from phylogenic related fungi. Most of the aligned proteins are hypothetical MFS secondary transporters. Shaded in grey are shown the conserved amino acids.

Supplementary figure 3. In silico analysis of PenM. Representative pieces of information gathered from on-line resources about some aspects of PenM deduced from the analysis of its sequence. A. Hydropathy profile along PenM protein amino acid sequence produced by TopPred 0.01. Topology prediction of membrane proteins (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred) showing twelve clear peaks of hydrophobicity corresponding to PenM putative transmembrane spanning domains (their position is marked with vertical bars above the plot). The red and green lines delimit an interval at a relative hydrophobicity value around 1.0 to aid the identification of the potential TMS. The horizontal scale represents the amino acid position while the vertical scale represents relative hydrophobicity. B. Two-dimensional model of the 12-TMS P. chrysogenum PenM protein and purposed topological placement in the membrane of the peroxisome predicted by SACS HMMTOP Transmembrane Prediction Page (http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/hmmtop.py). The picture evidences the putative transmembrane segments as well as the cytoplasmic inter-segment or luminal loops. The largest cytoplasmic inter-segment loop would be the connector between the two 6TMS blocks where PenM poses, belonging to the MFS superfamily. C. PenM tridimensional conformation modelingcreated by SwissProt (http://swissmodel.expasy.org/). A frontal and a sagital view (from a cytoplasmic perspective) of the potential PenM spatial organization protein where 12 a-helixes corresponding to the transmembrane segments organized around a putative central substrate binding chamber can be perceived. D. PenM amino acid sequence and features of the protein. The full length of each TMS is marked by bold characters. The grey shades mark the central transmembrane helix segment of each TMS. The cytoplasmic helix cap of the TMS is represented by lowercase italic letters while lower case normal ones represent the luminal helix cap of the TMS. Red underlined characters indicate the PenM Pex19p binding site overlapping the N-termini of the seventh TMS. This Pex19p binding domain was predicted by peroxisomeDB (http://www.peroxisomedb.org/). Highly conserved motifs of the MFS superfamily are displayed below the sequence (Paulsen and Skurray, 1993): the name of the motif is followed by the consensus sequences where x refers to any amino acid, capital letter refers to highly conserved amino acid throughout the MFS superfamily and lowercase letter refers to those less conserved amino acids throughout the superfamily. Sequence numbers on the right refer to the rightmost residue on each line.

Supplementary figure 4. RT-PCR and Northern blot analysis showing the relative expression level of the biosynthetic *pcbAB*, *pcbC* and *penDE* genes in the *penM*-overexpressing strains. A. Semiquantitative RT-PCR analysis of *pcbAB* transcript levels. The expression of the *pcbAB* genes was tested by semiquantitave RT-PCR carried out with total RNA of the *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 strain (Wis 54-1255) and the *penM*-overexpressing

transformants. Assessment of RT-PCR products after electrophoresis in 0.8% agarose gels of *pcbAB* gene of Wis 54-1255, SbrM-111, SbrM-153, SbrM-173, SbrM-177 and SbrM-199. Graphs representing the relative expression values for *pcbAB* (IOD_{*pcbC*}/IOD_{*actA*}) show clearly an increased expression of the *pcbAB* gene in all of the *penM*overexpressing transformants. **B**. Northern blot hybridization analysis of *pcbC* and *penDE* transcript levels. Hybridization signals rendered by the mRNAs from *pcbC*, *penDE* and *actA* hybridized with specific-labelled probes and measures of relative expression obtained in the *penM*-overexpressing transformants (SbrM-111, SbrM-153, SbrM-173, SbrM-177 and SbrM-199) and the parental strain (Wis 54-1255). Graphs representing the relative expression values for *pcbC* (IOD_{*pcbC*}/IOD_{*actA*}) and *penDE* (IOD_{*penDE*}/IOD_{*actA*}) show clearly an increased expression of both genes in all of the *penM*-overexpressing transformants. Note that the dotted line is the basal expression level established by Wis 54-1255 in each case.

		1	0	20	30	40	50	60	70	80
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	MKDG			<u>F</u>	ETPSVDGSTS	ASNR	EKLGTDI	LEIGPVDLSD	GGKEEK
С.	posadasii C735 delta SOWgp	M	ADSI	RASTMV	EAGGT	DQQI	PKSSSRSPSVI	HRGEKSSDNT	VDL-ELAISD	VGDKDV
Ρ.	<i>brasilensis</i> sp. 'lutzii'	M	VKP	VSDG	-DDCDTR	SVDQ	OTLRPYFPAD	THKGLVD	IEK-RPCLPS	EDVGCT
A.	capsulatus G186AR	M	AASI	OKASRILEPN	LDEGASL	SSHS	STSRPHSPE <mark>N</mark> I	kh a mst n aadi	LEK-GLNLHN	GGEDKS
A.	gypseum CBS 118893	MPSSLPQIP	IFAESI	DEASTIVPST	SDGNDNAFFS	DKRSVPSTSLE	ESIRPESKTDI	NKGLNVSTAP	VTIANADIEK	GTSASS
Α.	capsulatus H88	M	AASI	OKTSTIAEPN	LDDGASL	SSHS	STSRPHSPE <mark>N</mark> I	KH A MST N AADI	LEK-GLNLHN	GGEDKS
		9	0	100	110	120	130	140	150	160
Ρ.	chrvsogenum Wis 54-1255	V	KDI	PNLVDWDGPD	DPENPLNWTS	KRKITATCSI	ALITFLTPLG	SSMFAPGVGO	LVKDFNVTST	ELSSFV
С.	posadasii C735 delta SOWgp	KVPE	ESRDI	PNIVDWDGPD	DPQNPLNWTI	KKKVMIVSSI#	AIITFITPLG	SSMFAPGVAD	VMREFQSHSP	ELASFV
P.	<i>brasilensis</i> sp. 'lutzii'	PVCDTSESDO	JEVSDI	LNKVDWDGPD:	DPMNPYNWPM	TKKTSNVLNI	LITFLTPLG:	SSMFAPGIMD	VMREFKSSNP	ELASFV
Α.	capsulatus G186AR	RNQSEPGO	JESAE:	SNIVDWDGPD	DPMNPHNWPR	TKKIGIVVVI	AMITFLTPLG:	SSMFAPATAE	VMSEFNTSNP	ELASFV
Α.	gypseum CBS 118893	VTKRVPEGY	EYDDI	PNIVYWDGPD	DPAHPENWSS	TKKIVIVTSIC	GLITLLTPLG	SSMFAPGVGE	VMKEFHNSSP	ELASFV
Α.	capsulatus H88	QSRNQSESG	JESAES	SSIVDWDGPD	DPMNPHNWPR	TKKIGIVVVI	AMITFLTPLG:	SSMFAPATAE	VMSEFKTSNP	ELASFV
		1'	70	180	190	200	210	220	230	240
P.	chrysogenum Wis 54-1255	VSVYLLGY <mark>C</mark> H	GPLI	IAPLSELYGR	QYVYHVCNIL	YVIWTIACAFA	AP <mark>EI</mark> GSLVVF1	RFFAG <mark>L</mark> AGSCI	PLTIGAGSIA	DMFVQE
С.	<i>posadasii</i> C735 delta SOWgp	VSVYLLGYAI	FGPLI	LAPMSELYGR	SPVYHVCNVF	FVVFNVACAVA	ANSLDSLIVF	RFFAGVAGSA	PLTIGAGSMA	DMIRQE
Ρ.	brasilensis sp. 'lutzii'	VSVYLVGYA	GPLI	IAPLSELYGR	MYLYHSCNVL	FVIFNIACAL	APDLGSLIGFI	RFLAGAAGSCI	PLTIGAASLA	DMITQK
Α.	capsulatus G186AR	VSVYLLGYA	FGPLI:	IAPLSELYGR	MYLYHVCNIL	FIVFNVSCAV	APSLDSLIVFI	RFFAGAAGSCI	PLTLGAASLA	DMIRQE
А. Л	gypseum CBS 118893	VSVYLLGFS	CDLT.	LAPLSEMYGR I ADL SELVCPI	VPLYTVCNIL MVLVHVCNIL	FVVFNIACAVA	ANSLGSLIGFI	RFLAGAAGSA	PLITIGAGTIS.	DMIRQE
А.	Capsulatus noo	VSVILLUGIAI	GPLLI.	LAPLOLLIGN	MILIHVCIVIL	F I VFINVSCAVA	чьэпроптац	rffagaagge.	LTIGAASTA	DMIKQE
		2	50	260	270	280	290	300	310	320
P.	chrysogenum Wis 54-1255	QRGGAMAAWA	ALGPL	IGPVVGP V AG	AYLAQAKGWR	WSFYVLAMAAC	GAITISSLFS	IRESYAPTLL	ARKTK <mark>KL</mark> QKE	TGNMNL
С.	<i>posadasii</i> C735 delta SOWgp	KRGAAM A AWA	ALGPLI	LGPVIGPIAG	GYLTEA <mark>K</mark> GWR	WTFWVLAIVSC	GAITINTFIF	MRESYHPILL	ARKTKRLIKE	TGNQNL
Ρ.	brasilensis sp. 'lutzii'	KRGAAMGAWA	AIGPL	IGPVVGPIAG	GYLTEAMGWR	WTFWILAIASC	GAVTLNTFIFI	MTESCHSILLI	ERKTKRLIKE	TGNLNL
А. л	Capsulatus G186AR	KRGAAMGAWA	ALGPL'	CDVTCDVAC	GYLTEAMGWR	WIFWILAIASC	JVVSINTFLFI	INFOVUDTI	ERKRKRLVKE Advitvdi tve	TGNHNL
А.	capsulatus H88	KRGAAMGAWA	ALGPL ¹	VGPVVGPIAG	GYLTEAMGWR	WTFWILAIASC	GVVSINTFLF	LSESCHPVLLI	ERKRKRLVKE	TGNHNL
		3.	30	340	350	360	370	380	390	400
n	chrussessum Wig E4 12EE		יים דים שנ							
г. С	posadasii C735 delta SOWop	RSALDIGRIE	OKOLTI	LISIVRPINM	LFRSPIVFLL LFCSDIVFLI		.VIJ.FTTTG	VFQQQ1NFSQ(CAVGLIILGU CAVGLIAFI.CI	GIGSUC
р.	brasilensis sp. 'lutzii'	KSVLDTGKT.	KELF1	LFSIVRPTKM	LFMSPIVFLI	SLFTAVIYGYI	IYLLFTT FT S	VFEROYHFSK	GSTGLAFLGI	GVGSML
Α.	capsulatus G186AR	KSVLDTGKT	PKQLFI	LFAIIRPTKM	LFLSPIVFLL	SLFMAVVYGYI	LYLLFTTFAN	~ VFVEKYNFST	GSVGLAFLGI	GVGSIM
A.	gypseum CBS 118893	KSALDSGLQI	PKELF	IRSIIRPTKM	L <mark>LF</mark> SPIVFLL	SL <mark>YA</mark> AVVYGYI	LYLLFTTI SG	VFIGKYHFTQ	GV	GIGCLL
Α.	capsulatus H88	KSVLDTGKTI	PKQLFI	lf <mark>a</mark> iirptkm	LFLSPIVFLL	SLF <mark>M</mark> AVVYGYI	LYLLFTTFAN	VFVEKYNFST	GSVGLAFLGI	GVGSIM
		41	L0	420	430	440	450	460	470	480
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	GLFLIGATSI	ORLLN	YLAAKN-GEK	KPEYRLPPMV	PGAIFVPISLE	MYGWTAYYQ	THWIVPIIGT	SFLGTGMMIT	FMCVST
С.	posadasii C735 delta SOWgp	GLGFISIVSI	ORLLKI	KLSAKS-GEM	KPEYRLPPLI	PGGLFIPVGL	FWYGWTAEYG	VHYIVPIIGT	FFVGVGMIVT	MMATST
Ρ.	brasilensis sp. 'lutzii'	GLVVIGTTSI	DRILQ	ILAKKNNGEL	KPEYRIPLMI	PGGLCIPIGLE	FWYGWTAEKG	VHYVVPIVGT	GFVGVGMILI	FMTGST
А. л	Capsulatus G186AR	GLAISSAFSI	JI.ITO	RLAKRININGEM	KPEYRIPLMI VDEVDI DDI I	PGGLCVPIGLE	WYGWI'AEKG'	VHYLAPIVGT	SFVGGGMLLL.	FMTGST
<i>А</i> .	capsulatus H88	GLATSSAFSI		STAKENNGEM	KPEYRTPI.MT	PGGLCVPIGL	WYGWTAEKG	VHYLAPTVGT	FVGCGMTTT	FMTGST
	er-saracas nos	0								
~		49	90	500	510	520	530	540	550	
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	YLVDAF'T NY A	ASVM	AANTVFRSLA	GALLPLAGPK	MYAVLGLGWGI	NSLLGFIALA	FCALPVIFWI	YGERIRTSPK	FQVTF
С.	posadasıı C/35 delta SOWgp	YLVDAYTIHA		AANTLLRSVI	GAVLPLGGLR	MYPAT CLOUCE	NSLLAFIALA	LVPLPV1FFR	YGERIRTSKR	f'QMTF FDX700
г. Д	capsulatus G186AR	T T ADAF TORS	ASAM		GAVLPLCGLK	MYSTI,CI.CWC	ISLLGFIALA	ULD LDWALAND	GERMRTCKP	EHAEE.
л. А.	gvpseum CBS 118893	YLVDAFTLH	ASAT.	ANTVLRSTE	GAVLPL/CGOR	MYRALGI.GWG	ISLLGFVALA	LAPLPVVFYV	YGERIRTSKR	FAINT
А.	capsulatus H88	YLVDAFTIHA	ASAM	AATTLLRSLG	GAVLPLCGLK	MYSTLGLGWG	ISLLGFIALA	LTPIPWVFYQ	YGERMRTSKR	FHVEF

Supplementary figure 1. Fernández-Aguado et al., 2014

		10	20	30	40	50	60	70	80	
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	M		-KDGEETPSVI	OGSTSASNREK	LGTDLEIGP	/DLSDGGKEEF	(VKDP	NLVDWD	51
Ρ.	marneffei ATCC 18224	MGPKGLLPLDSIQHV	KVLCETNIN	FHPAEVAADLV	/PAEKIDQGQI	VNKDVERGSS	STTEKGNYVE	EIIAVEPVDL	NLVDWD 8	30
£'.	oxysporum F05176	M		-KHVEVDDQL\	/SAATAAPIPE	EEDLEKSEF	RDLEEGSTSVE	EFDDPPSDDP	NIVNWD !	54
л. А.	fumigatus Af293	M		3 OD OD OD O 3 3 3 3	-SCEKSISPSI	DLEKNLVVQLE	ENPTSDCFVTI	DYVAS	HVVDWD 4	41 - 4
л. А.	clavatus NRRL	MD	CR	-ASRSTGAAAN	ASCEKSICPLL	LEKNLVVQVI	SNPTSGCFVT1	DYVTS		54 12
		MD		-HGKPQG	W51555L	JLEKNVIFHEF	IQIADAVIÇ	QRDAS	NIVDWD	±3
		90	100	110	120	130	140	150	160	
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	GPDDPENPLNWTSKF	KITATCSIA	LITFLTPLGSS	SMFAPGVGQLV	KDFNVTSTEI	SFVVSVYLI	GYCFGPLII	APLSEL :	131
Ρ.	marneffei ATCC 18224	GPDDPENPFNWPASF	KAMMTTSIA	LITFLTPLGSS	SMFAPGVPNVM	REFHSSNESI	LAAFIVSVYLI	GYCFGPLVI	APLSEM 1	160
F.	oxysporum Fo5176	GPDDPANPQNWSMKK	KTINVILVS	SVTFVTPLASS	SIFAPSIDQVM	IREFHSTNEQI	LASFIVSVYLI	LGYCFGPLVI	APLSEM 1	134
Ν.	fischeri NRRL 181	GPDDLARPVNWHKKF	KWLNVTSVA	FLTFLTPLASS	SMVAPAGGLVI	ESFNITSESI	LASFVVSIYLV	/GFAVGPLVL	GPLSEI	121
Α.	fumigatus Af293	GPDDFARPVNWHKKF	KWLNVTSVA	MUTELTPLASS		ETFNITSESI	COFVICIVIA	/GFAVGPLVL	GPLSEI .	134 122
Α.	Clavalus NKRL	GRDDPARP INWIGR	AV CA VII VII WAS	MUIFUIPUADS	MIVAPAQALI VI	103110111011	1991 V 19111V	/GFAVGPLVL	GPLOEI .	123
		170	180	190	200	210	220	230	240	
Ρ.	chrvsogenum Wis 54-1255	YGRQYVYHVCNILYV	/IWTIACAFA	PEIGSLVVFRE	FAGLAGSCPI	TIGAGSIAD	IFVQEQRGGAN	AAWALGPLI	GPVVGP	211
Ρ.	marneffei ATCC 18224	YGRQPLYTACNLLYT	IFNVACALA	PDMGSLSVFRE	FAGVAGSCPI	TIGAGSLAD	11 PQNKRGAAN	AIWAMGPLF	GPVIGP 2	240
F.	oxysporum Fo5176	YGRLPLYHICNVLFV	AFTVACAKA	PNLGGLIAFRI	LAGLAGSCPI	JTIGAGSLADN	11SKEKRGAAN	1SSWALGPLF	GPVIGP 2	214
Ν.	fischeri NRRL 181	YGRLRVYQACNAVFI	VWNIACAVS	PNIGSLLAFRI	LFAGIAGSCPI	JTLGAGSIADI	LFVPEERGAAN	ISIYSMGPLM	GPVVGP	201
Α.	fumigatus Af293	YGRLRIYQACNAVFI		PNVGSLLAFRI	LFAGIAGSCPI	JTLGAGSIADI	LFVPEERGAAN	ASIYSMGPLM	GPVVGP	214
Α.	Clavatus NRRL	IGRERIQMCNVVFI	.IWNIACAVI	PINVGSLLAFRI	JF AGLAGSCPL	111GAG2 TADI	JF IABERGAAI	IN A MOING 5 TH	GPVVGP .	203
		250	260	270	280	290	300	310	320	
D	chrusogenum Wig 54-1255	VAGAYLAOAKGWRWS	FYVLAMAAG	ATTISSLEST	RESYAPTILAR	KURKI OKETO		GRTPKELFL	YSTVRP (291
г. Р.	marneffei ATCC 18224	VAGGYLTEAKGWRWI	FWVLAIAGG	AVTISSLFTM	RESYAYVLLDF	KAKRLRKET	INSNLRSVLD	GRSSKELFM	FSIVRP 3	320
F.	oxysporum Fo5176	IAGGYL <mark>SA</mark> AKGWRWS	FWVVAIVAG	AITIVAFIFM	RETYAYALLEK	KAKKLRKETO	INTKLRSILD	IGTTTKEVFR	LAITRP 2	294
N.	fischeri NRRL 181	IAGGYLAEA <mark>A</mark> GWRWJ	FWVISMAGG	AVFAFSLLFQI	TETYEPVLLQF	RADQLRKET	GDMILRSKLAP	PNISARDNFI	RSIVRP 2	281
Α.	fumigatus Af293	IAGGYLAEAAGWRWI	FWVI <mark>S</mark> MAGG	AVFAFSLVFQI	TE TYE PVLLQF	RVDQLRKEAC	GDMTLRSKLAP	PNISARDNFI	RSIVRP	294
Α.	clavatus NRRL	IAGGYLSEAVGWRWI	FWVIAMAAG	GVFAFSVLFQI	ſESY <mark>E</mark> PVLLQÇ	RVDRLSKET	INAELRSKLAI	PNIRPRENFI	RSIVRP	283
		I 330	I 340	1 350	I 360	I 370	I 380	I 390	I 400	
_				I	1			1		
Р. р	chrysogenum Wis 54-1255	TKMLFRSPIVFLLSI	YVGVLYGYL VTAVTVCVL	YLLFTTTSVE VI.I.FTTMTTVF	CQQQXNFSQGA	AVGLIYLGLG\	GSLIGLFLIC	GATSDRLLNY	LAA-KN . LTASND 4	370 100
г. F.	oxysporum Fo5176	TKMLLFAPIVSLLSF	YMALVYGYL	YLLFTAMPALE	FEGEYHFSSGS	SVGLSYIGLG	/GSLTGLVIS	GASIDRFAOY	LTSKNG (374
Ν.	fischeri NRRL 181	TKMLFLSPIVAIFSV	YLGIVYGYL	YLLFTTITSVY	QTTYQFSQGA	AGLTYLGIG	/GSLIGLLIFC	TISDKILIY	LTKRNN (361
Α.	fumigatus Af293	TKMLFLSPIVAIFSV	YLGIVYGYL	YLLFTTITPVY	ZQTTYQFSQGA	AGLTYLGIG	/GSLIGLLIF(GTISDKILIY	LTKQND (374
Α.	clavatus NRRL	TKMLLLSPIVLLFSI	YIAMGYGYL	YLLFTTITSVI	MINYHFSQGA	AGLTYLGIGI	IGSLVGLLVFO	SVSDRILIY	LTKRNN	363
		410	420	430	440	450	460	470	480	
P										1 = 0
Р. D	chrysogenum W1s 54-1255	GUAKPEYRLPPMVPG	SWI.TPI.ALF	MYGWIAYYQII	WIVPIIGISP WIVPIIGISP	LGIGMMIIFN T.CMCMMIAFN	ACVSIILVDAR ATSTYLUDA	TINIAASVMA TVYSASVMA	ANIVER 4	±50 180
г. F.	oxysporum Fo5176	GEPKPEYRLPFMGGA	CFIVPAGLE	MFGWSAEHKDF	WIVIIIGTSF	LGCGMIIVFN	CISVYLVDA	VOYAASAIA	ASTULR 4	100 154
Ν.	fischeri NRRL 181	GVREPEFRMPPLIPC	SLFIPIGLF	WYGWSAEKQLI	HWMMPIVGTGI	VGFGMLASFI	LPIQTYLVDA	SEHAASVTA	SMTVVR 4	441
Α.	fumigatus Af293	GVREPEFRMPPLIPC	SLFVPIGLF	WYGWSAEKQLF	HWMMPIVGTGF	"VGFGMLASFI	LPIQTYLVDA	FSEHAASVTA	SMTVVR 4	154
Α.	clavatus NRRL	GVAEPEFRMPPLIPC	SLFVPIGLF	WYGWSVERQLI	WMIPIIGTGF	"VGFGILAAFI	LSTQTYLVDAH	FSEHAASVTA	SMTVIR 4	443
		400	EOO	E10	FOO	FOO				
		490	500	510	s∠∪	530				
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	SLAGALLPLAGPKMY	AVLGLGWGN	SLLGFIALAFC	ALPVIFWIYO	JERIRTSPKF(2VTF Aver			508 520
Р. F	Marneilei Al'CC 18224	SI VGALLPLAGGKM	KSI GYGWGN	SLLGFIADAA	DI'DELEAKAC	ERTRRKMURT FRIERE	VVKF VVKF		:	8در 12
1' • N	fischeri NRRL 181	SLIGAFLPLAGPAMY	ARLGLGWGN	SMLGFISLAM	LPLPVVFYYY	KRIRTYPIF	(VTF		-	199
Α.	fumigatus Af293	SLIGAFLPLAGPAMY	ARLGLGWGN	SMLGFIALTMI	LPLPVVFYYYO	KKIRTYPAF(QVTF		ļ	512
Α.	clavatus NRRL	SLAGAFLPLAGPAMY	ARLGLGWGN	SMLGFIALAM	VPLPVFFFCYC	KRIRALPLFN	VTF		1	501

Supplementary figure 2. Fernández-Aguado et al., 2014

		10	20	30	40	50	60	70	80	
P.	chrysogenum Wis 54-1255	M	KDGEETPSVD	GSTSASNREKI	LGTDLEIGF	VDLSDGGKEI	2	KVKE	PNLVD	49
Α.	terreus NIH2624	M			AEPTF	SALEKGPKE	EERSQ	DDEKERDF	PD-IVD	32
Α.	nidulans FGSC A4	MSSA			TLA	TEVDRAEKGI	<u></u>	NGPSENS	SDEKVD	29
Α.	niger CBS 513.88	M			GASDF	PIANPDLEKG	PPAT	VQPTERHQ		33
Α.	oryzae 3.042	MHCLOSDVVKRDTI	 R∩∩Hat.av/T.D	SATASBDV/KNI	ILPIF	SVLEKGGKAI	LESNRSSGEII	NDLENVPKEDL		41 80
Α.	ILAVUS NRRL3357	MACAQOPVIKAPIL	RQQHALAVLP	SAIASREVIN	LT9GTMIELTE	'SVLENGGNAI	TEOINCOOGE II			80
		90	100	110	120	130	140	150	160)
P	chrysogenum Wis 54-1255	WDGPDDPENPLNWT	SKRKITATCS	TALITFLE	GSSMFAPGVGC	LVKDFNVTS	TELSSEVVSV	TLIGYCFGPLI	TAPLS	129
Α.	terreus NIH2624	FEGPDDPENAMNWP	TRKKMRQLVL	MAFNTFITPL	ASSMFAPGVGI	VMRDFHSTD(MLASFVVSVI	VLGYMVGPFI	IAPLS	112
Α.	nidulans FGSC A4	WDGPDDPANPMNWS	TSKKTAQLVL	MAANTFITPL	ASSMFAPG <mark>IKO</mark>	WMMEFHSSD:	TMLASFVVSVI	VLGYVVGPFV	/IAPLS	109
Α.	niger CBS 513.88	YDGPDDPENPFNWP	RWKKGRQLVL	MAFNTFITPL	ASSMFAPGV <mark>E</mark> I	OVMIDFHST <mark>S</mark>	MLASFVVSV	YVLGYMIGPFI	LIAPLS	113
Α.	oryzae 3.042	WDGPDDPANPFNWS	TPKKARQLVF	MAFNTFVSPL	ASSMFAPGVQY	WMRDFH T TD (OML <mark>G</mark> SFVVSV?	YILGYMLGPFI	LIAPLS	121
Α.	flavus NRRL3357	WDGPDDPANPFNWS	TPKKARQLVF	MAFNTFVSPL	ASSMFAPGVQY	VMRDFHTTDÇ	QML <mark>G</mark> SFVVSV?	YILGYMLGPFI	LIAPLS	160
		170	180	190	200	210	220	230	240)
Ρ.	chrvsogenum Wis 54-1255	ELYGRQYVYHVCNI	LYVIWTIACA	FAPEIGSLVVI	FRFFAGLAGSC	PLTIGAGSI	ADMFVQEQRGO	GAMAAWALGPI	IGPVV	209
Α.	terreus NIH2624	ELYGRVPLYHACNV	LFLIFTIACA	VAQTLPQLIVI	FRLLAGIAGVO	CPLTIGSGTVA	ADMVPKEKRAG	GIMAIWALGPI	MGPVI	192
Α.	nidulans FGSC A4	ELYGRVPLYHACNV	MFLVFTIACA	VAKTLPQLIVI	FRLFAG <mark>V</mark> AGVC	CPITIGSGTI	ADMTLQEKRAC	GIMAIWALGPI	LGPVV	189
Α.	niger CBS 513.88	EIYGRVYLYHACNI	LFLIFTIACA	VAQTMPQLIVI	FRLLAGTAGVO	CPLTIGSGTVA	ADMVP <mark>K</mark> EKRA(GIMAIWA <mark>M</mark> GPI	LGPVV	193
Α.	oryzae 3.042	EIYGRVPLYHACNV	IFLVFTIACA	VAQTLPQLIVI	FRLFAGIAGVC	PITIGSGTVA	ADMVPVEKRA(GIMAIWALGPI	LGPVV	201
Α.	ILAVUS NRRL3357	ELIGRVPLIHACNV	IFLVFIIACA	VAQILPQLIVI	FRLFAGIAGVC	PIIIGSGIVA	ADMVPVEKRAC	JIMAIWALGPI	LGPVV	240
		250	260	270	280	290	300	310	320)
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	GPVAGAYLAOAKGW	RWSFYVLAMA	AGAITISSLF	SIRESYAPTLI	ARKTKKLOKI	ETGNMNLRSAI	LDTGRTPKELF	LYSIV	289
Α.	terreus NIH2624	GPVCGGFLAENEGW	RWVFWVIAIA	TAVMTIGCVL	AYRESYAPVII	_ ERKVARLRKI	TGNENLRSI	YDRGLSTKELF	WFTLA	272
Α.	nidulans FGSC A4	GPVAGGFL <mark>S</mark> EAEGW	RWVFWVIAIT	TGVISIGALI	AYRESYAPVLI	ARKAARLRKI	ETGNPSLRSVE	HDTGRTPKQVF	VDAFT	269
Α.	niger CBS 513.88	GPVAGGFLAEAEGW	RWVFWV <mark>I</mark> AIA	TAVMSILCMI	WYRETYAPVII	ERKAARLRKA	ATGNPNLRSVI	HDRGQQAHELL	LVALA	273
Α.	oryzae 3.042	GPIAGGFLAESVGW	RWVFWVLAIA	TGVMTIGCLL	SYRESYAPVLI	RRKTERLRKI	ETGNPNLRSA	RGDTKITKELF	TTALS	281
Α.	IIAVUS NRRL3357	GP IAGGF LAE SVGW	RWVFWVLAIA	I.GAMI.TGCTT!	SYRESYAPVLL	REFLERISE	GIGNPNLRSAF	KGDIKTIKELF	TTALS	320
		330	340	350	360	370	380	390	400)
P.	chrysogenum Wis 54-1255	RPTKMLFRSPIVFL	LSLYVGVIYG	YLYLLFTTIT:	SVFQQQYNFSQ	GAVGLTYLGI	GVGSLIGLFI	LIGATSDRLLN	IYLAAK	369
Α.	terreus NIH2624	RPVKLLFLSPIVFM	MAMFAAVTYG	YLYLMFTTLTI	PIFENNYGFSF	PGIAGLAYLGI	FGIGSVIGLV	VCGAVANHIAV	THSAK	352
Α.	nidulans FGSC A4	RPIKFLFLSPIVFL	FSLFSTISYG	YLYLMFTTIT	SIFEGQYGWAP	SIAGLAYLG	FGIGSMVGLIV	/SGAIGNKIAA	ADHTAK	349
А. Л	niger CBS 513.88	RPVKLLVKSPIVLL	MVLFAAITYG	YLYLMF'I'I'I'I'	SIFEDVYHFSF	GVAGLAYLGI	GVGCLIGLVI	LCGAVSNHIAR	RTHSAR	353
А. А.	flavus NRRL3357	RPMKLLFRSPIVFL	lslfaaviig Lslfaavtyg	YLYLMFTTLTI	PIFRNIIGFSS	GLAGLAYLGI	FGIGSILGLG	LCGVV SNRIAV LCGVVSNRIAV	/SHIAR	400
		410	420	430	440	450	460	470	480)
Ρ.	chrysogenum Wis 54-1255	NGEKKPEYRLPPMV	PGAIFVPISL	FMYGWTAYYQ	THWIVPIIGTS	SFLGTGMMITH	FMCVSTYLVDA	AFTNYAASVMA	ANTVF	449
Α.	terreus NIH2624	-GCFRPESRLPPMI	VGCWLIPIGL	FWYGWSAKAQ	THWIVPILGTO	FAVGLMTVI	FMAANTYLVDS	SYLRYAASVTA	ANTAI	431
А. Л	nidulans FGSC A4	-GIFKPESRLPPMI	FGSLAIPIGL	FWYGWSAEAK	THWIVPIIGTO	WFAVGLMVVI	FMVANTYLVDS	SYLLHAASVTA	ANTAL	428
л. А.	orvzae 3.042	-GCFIPESRLPPMV	FGSWAIPIGL	FWYGWSAOAH	THWIVPILGIG	WFATGLMIVI WFATGIMWW	MASNTYLVD:	SYLRHAASVIA		432
Α.	flavus NRRL3357	-GCFKPESRLPPML	FGSWAIPAGL	FWYGWSAOAH	THWIVPILGTO		FMASNTYLVD	Sylrhaasvta	AATVL	479
				~						
		490	500	510	520	530				
P.	chrysogenum Wis 54-1255	RSLAGALLPLAGPK	MYAVLGLGWG	NSLL <mark>G</mark> FIALA	FCALPVIFWIY	GERIRTSPK	FQVTF			508
Α.	terreus NIH2624	RSLVGAVLPLAGPA	MYDSLGLGWG	NSLLAFIALA	MCACPLLFWKY	GEKIRTNPRI	FQINL			490
А. л	nigar CPS 512 89	RSLGGALLPLAGPD	MYDALGLGWG	NSLLAFIALA	MCACPVLFWKY	GEMIRTHPRE	'QIRL			487
л. Д	orvzae 3,042	RSLVGALLPLAGPS	MYDALGLGWG	NSLLAFIALVI NSLLAFIALM	MCACPLLFWRY	GEFTRTHDDI	TAT.			491 490
Α.	flavus NRRL3357	RSLIGAVLPLAGPS	MYDALGLGWG	NSLLAFIALA	MCACPLLFWKY	GEFIRTHPRE	FQIAL			538

Supplementary figure 2. Fernández-Aguado et al., 2014





В

D



С

PenM 3D sagital view





MKDGEETPSVDGSTSASNREKLGTDLEIGPVDLSDGGKEEKVKDPNLVDWDGPDDPENPL 60 nwtskrKITATCSIALITFltplgsSMFAPGVGQLVKDFNVTSTELssfvvsVYLLGYCF 120 Motif D2: LGXXXXX PVxP GPLIIaplselYGRQYVyhvcnILYVIWTIACAfapeiGSlvvfrfFAGLAGSCPLTIGa 180 Motif A: GxLaDrxGrKxxI Motif B: LxxxRxxqGxgas gsiadMFVQEQRggamaaWALGPLIGPVVGpvagayLAQAKGWRWsfyvlaMAAGAITIS 240 Motif C: gxxxGPxxGGxL SLFsiresyAPTLLARKTKKLQKETGNMNLRSALDTGRTPKELFLYSIVRPTKMLFRSPi 300 VfllsLYVGVIYGYLYLLfttitsVFQQQYNFSQGAvgltylGLGVGSLIGLFLigatsd 360 RLLNYLAAKNGEkkpeyrLPPMVPGAIFVPislfmyGWTAYYQTHwivpiiGTSFLGTGM 420 MITFmcvstyLVDAftnyaASVMAANTVFRSLagallPLAGPKMYAVLGLGWGnsllgFI 480 Motif G: GxxxGPL ALAFCALPvifwiYGERIRTSPKFQVTF 508

Supplementary figure 3. Fernández-Aguado et al., 2014

A Semiquantitative RT-PCR analysis of *pcb*AB transcipt levels



B Northern blot hybridization analysis of *pcbC and pen*DE transcipts levels



Supplementary figure 4. Fernández-Aguado et al., 2014

Publicaciones originales ------

-

-



Capítulo 3 Resultados y discusión

Imagen portada Capítulo 3: Visión parcial de las hifas del micelio de una cepa derivada de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 crecida en medio CCM líquido durante 48 h para su visualización en microscopio confocal de fluorescencia. La pared celular determina el perfil de las hifas y en algunos casos también son evidentes los septos intercelulares de pared celular. Se observan también grandes formas vesiculares intracelulares, que en la mayoría de los casos correspondería a vacuolas. La fluorescencia determina la posición intracelular de los peroxisomas.

1

Proteínas transportadoras en la biosíntesis de betalactamas. Relevancia y caracterización.

En este capítulo final de la presente Tesis Doctoral se ha pretende poner de relieve la situación actual de los antibióticos betalactámicos. Igualmente se hará una descripción del origen evolutivo de la compartimentación metabólica en general y de la biosíntesis de PenG en particular. Se ha puesto el foco en los peroxisomas dado lo importantes que son estos orgánulos para la biosíntesis de penicilina y dada su condición de verdaderos compartimentos metabólicos, no sólo en hongos productores de penicilinas, sino en los organismos eucariotas en general. En relación con la compartimentación metabólica se reseña sustancialmente el papel esencial que juegan las proteínas transportadoras para hacer que la compartimentación sea un aspecto provechoso para las células, conduciendo así la exposición hacia la justificación del objetivo que dio origen al trabajo abordado en esta Tesis y que es la caracterización de proteínas transportadoras vinculadas a la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*.

En este apartado también se hace un repaso del trabajo experimental desarrollado y se hace una breve exposición de los resultados obtenidos y de las conclusiones que pueden ser inferidas en cada caso. Para finalizar este apartado de Discusión y Objetivos, se hace un comentario general de las conclusiones globales que pueden extraerse de la consideración conjunta del trabajo desarrollado.

1.1. La reedición de la investigación de los compuestos betalactámicos por la industria farmacéutica.

El mundo desarrollado ha mantenido bajo control las enfermedades y procesos infecciosos durante décadas. Esto ha sido posible gracias a la implementación de medidas que en pleno s. XXI se consideran básicas e incuestionables, como la aplicación de políticas de higiene y salud pública (como la limpieza y potabilización de las aguas de consumo) y el acceso a terapias contra enfermedades infecciosas, como vacunas y antibióticos.

Tradicionalmente, los productos naturales (moléculas pequeñas codificadas genéticamente) sintetizados por hongos y bacterias, han sido las principales fuentes de antibióticos empleados en la práctica clínica. A diferencia de lo que ocurre con otro tipo de fármacos, los compuestos antibióticos completamente sintéticos son minoritarios porque los productos naturales gozan de una mayor potencia antimicrobiana. Esto se debe a que los productos antibióticos naturales, han estado sometidos a una presión selectiva durante la evolución que los ha favorecido por su capacidad de penetración en las células bacterianas. Los productos microbianos no han sido modelados evolutivamente para su empleo como medicamentos, sino

para desempeñar su función en la fisiología y ecología bacteriana. La función natural de los productos antibióticos microbianos, se enmarca en la interacción del microorganismo productor con otros organismos. Para esta interacción es necesaria esta capacidad de penetración, que a su vez es precisamente lo que confiere a los productos naturales una potencia antimicrobiana privilegiada (Wright, 2014).

Los antibióticos betalactámicos han constituido uno de los grupos de sustancias de aplicación clínica más relevantes desde el descubrimiento y el desarrollo de la producción industrial de la primera penicilina natural, la PenG, hasta la actualidad. La PenG constituye una de esas singularidades biológicas que son los antibióticos naturales: es una molécula relativamente compleja, inestable, producida en baja cantidad en condiciones silvestres y sin embargo con un rango antimicrobiano relativamente amplio y prácticamente inocua para las células de eucariotas. El descubrimiento de la penicilina inauguró la denominada *"Era de los Antibióticos"*, pues después de ella serían halladas sustancias antibióticas de una naturaleza diferente como los aminoglicósidos (1943), los cloranfenicoles (1946), los macrólidos (1948), las tetraciclinas (1944) y otros (Lewis, 2013). El abanico de compuestos betalactámicos también se enriqueció con el aislamiento de la primera cefalosporina [cefalosporina C, (Brotzu, 1948)], la primera clavama [ácido clavulánico, (Howarth y col. 1976)], la primera monobactama [nocardicina, (Hashimoto y col. 1976)] y la primera carbapenema [tienamicina, (Albers-Schöenberg y col. 1978)].

La importancia de los antibióticos betalactámicos no se circunscribe exclusivamente al ámbito clínicosanitario, tal y como refleja el continuo incremento de la producción industrial de estos compuestos. Las ingentes cantidades de dinero que las betalactamas mueven en el mercado farmacéutico pone de manifiesto su preponderancia económica. En el año 2000 la producción mundial de penicilinas alcanzó la asombrosa cifra de 60000 toneladas (Thykaer y Nielsen, 2003). En cuanto a las cefalosporinas, dos tercios de las cefalosporinas semisintéticas se producen a partir del intermediario 7-ACA, cuya producción alcanzó las 3000 toneladas a nivel mundial en 2002 (Ozcengiz y Demain, 2013). En el año 2003, el mercado de antibióticos betalactámicos suponía el 65 % del mercado global de antibióticos, con un montante económico que llegó a los 15000 millones de dólares (10000 millones obtenidos mediante la comercialización de cefalosporinas y 5000 millones mediante la comercialización de penicilinas) (Elander, 2003; Ozcengiz y Demain, 2013).

A pesar de su gran importancia sanitaria y económica, la investigación y el desarrollo de antibióticos basados en productos microbianos, incluidos los de tipo betalactámico, se encuentran inmersos en un periodo de crisis. En las últimas décadas las grandes compañías farmacéuticas han reducido sustancialmente los recursos dedicados a las líneas de investigación y desarrollo de sustancias antibióticas de origen natural. Como ejemplo de ello, el número de nuevos agentes antibacterianos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*, Agencia de alimentos y medicamentos del gobierno de los Estados Unidos) ha experimentado una disminución paulatina durante los últimos 30 años. En el periodo de 1983-1987 se aprobaron 16 nuevos antimicrobianos mientras que el número de nuevas aprobaciones se redujo a 7, 5 y 2 en los periodos de 1998-2002, 2003-2007 y 2008-2012 respectivamente. Desafortunadamente esta tendencia no parece que se vaya a revertir en un futuro cercano. Las 15 mayores compañías farmacéuticas a nivel mundial y responsables del desarrollo del 93 % de los 57 nuevos agentes antibacterianos aprobados por la FDA desde 1980 hasta 2003, tienen incluidos actualmente en sus

programas de investigación y desarrollo 418 agentes terapéuticos, de los cuales tan solo el 5 % son antibacterianos (Spellberg y col. 2004).

Detrás de este abandono por parte de las industrias farmacéuticas subyacen razones económicas. El tremendo coste que supone desarrollar nuevos antibióticos y conseguir la aprobación por parte de las autoridades competentes para su uso clínico, probablemente no compensaría el potencial beneficio económico devengado de su comercialización en un tiempo razonable para la industria productora (Livermore y col. 2011). También y no menos importantes son las limitaciones científico-técnicas que conlleva el desarrollo de nuevos antibióticos. Hay que tener en cuenta que las bacterias (contra las que han de actuar los antibióticos) han evolucionado durante millones de años, adaptándose a ambientes muy diferentes y preparándose para interactuar con amplio rango de moléculas de bajo peso molecular. Como resultado, las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos para percibir, evitar, metabolizar o atenuar todos estos compuestos químicos y por ello también son capaces de desarrollar sistemas de protección y defensa contra los compuestos antibióticos que se utilizan para combatirlos. Los antibióticos, por tanto, han de eludir estos sistemas de protección y defensa para resultar efectivos. Estos sistemas incluyen, por ejemplo, envueltas celulares complejas y poco permeables, que evitan la entrada de los compuestos o sistemas de transporte de amplio rango de sustrato para la extrusión de estas moléculas, evitando así su acumulación intracelular (Wright, 2014).

Como consecuencia del abandono de las líneas de I+D en productos antibióticos, cada año se introducen en el mercado menos antibióticos nuevos. Dicho desabastecimiento de antimicrobianos está haciendo que se debilite nuestra capacidad para el control sobre las infecciones, ya que los agentes infecciosos evolucionan continuamente para burlar su acción, al adquirir diferentes mecanismos de resistencia frente a estos fármacos. A lo largo del siglo pasado científicos y médicos suplían la pérdida de potencia de los antibióticos en uso con el empleo de nuevos fármacos. Esta estrategia de proporcionar nuevos agentes antimicrobianos al mismo ritmo que los viejos perdían su efectividad tuvo éxito en el pasado, pero actualmente esta situación de equilibrio ha cambiado. Los agentes patógenos se han hecho paulatinamente más resistentes a múltiples fármacos y el descubrimiento de nuevas sustancia antibióticas eficaces no evoluciona al mismo ritmo (Laxminarayan y col. 2013).

El creciente problema de la aparición de resistencias bacterianas y la aparición de infecciones causadas por nuevas cepas patógenas multirresistentes, asociado a la grave escasez de nuevos antibióticos, debido al parón en las investigaciones en los últimos años, ha generado una urgente necesidad clínica de disponer de nuevos antimicrobianos (Walsh y Wright, 2005; Freire-Moran y col. 2011). En el año 2002, se estimaba que se disponía de alrededor de 16500 productos antibióticos de origen natural (Berdy, 2005). Esta colección de compuestos constituye un recurso valioso para el desarrollo de nuevos fármacos que impidan la regresión de las condiciones sanitarias a un estado equiparable al de la época pre-antibiótica (Wright, 2014). En este contexto, algunos expertos apuntan al resurgimiento también de los antibióticos betalactámicos. La eficiencia antibacteriana y la baja toxicidad de estos compuestos habría hecho renacer el interés por estos compuestos, en una nueva etapa de bonanza para los betalactámicos (Walsh y Wright, 2005; Coates y Hu, 2007; Hamed y col. 2013).

La síntesis de betalactamas requiere de procesos fermentativos para generar la estructura química básica responsable de la actividad antibiótica, que luego puede ser purificada y modificada químicamente para la obtención de nuevas especies químicas. En este punto el objetivo sería conseguir una mejora de la eficiencia de los procesos fermentativos y también de aplicar la biología sintética para ampliar la diversidad química y mejorar la funcionalidad de los nuevos compuestos betalactámicos que permita continuar explotando la potencialidad antibiótica de estos compuestos (Thaker y Wright, 2012; Zakeri y Lu, 2013).

1.2. Compartimentación de la biosíntesis de penicilina en P. chrysogenum.

Desde que en el laboratorio NRRL, como parte del proceso de optimización de la producción industrial de penicilina, fuese adoptada una cepa de *P. chrysogenum* como el organismo productor del antibiótico, esta especie fúngica ha sido tomada como la principal fuente de este antibiótico. Como ya se describió en el apartado de Introducción de la presente Tesis, *P. chrysogenum* es un hogo filamentoso microscópico que se caracteriza, aparte de por su capacidad para producir penicilina, por la tonalidad verde de su micelio y por el aspecto de pincel de su aparato conidiogénico. *P. chrysogenum* es un hongo ambiental común y, excepto en casos excepcionales, no tiene un gran impacto clínico como agente patógeno. Uno de los aspectos más novedosos que conciernen a este hongo es la reciente constatación de la existencia de su ciclo de reproducción sexual.

A la cepa *P. chrysogenum* NRRL 1951 (empleada en los albores de la producción industrial de la penicilina en el laboratorio NRRL en la década de los 40) y las cepas superproductoras empleadas por las factorías en la actualidad, las separan múltiples rondas seriadas de mutación y selección, o lo que es lo mismo una evolución dirigida y a marchas forzadas que ha dado lugar a cepas de *P. chrysogenum* que producen hoy 100000 veces más penicilina que entonces, hace casi 70 años (Elander, 2003; Rokem y col. 2007; Ozcengiz y Demain, 2013). Este tremendo incremento de la capacidad productiva, como se describió previamente, hizo accesible la penicilina al gran público, contribuyó a mejorar la calidad de vida y además se convirtió en un lucrativo negocio para la industria farmacéutica moderna.

El valor médico y económico de la penicilina impulsó el estudio de su ruta biosintética como uno de los frentes a abordar para aspirar a la modulación de la capacidad productiva de los organismos productores. A día de hoy existe un profundo conocimiento de la vía de biosíntesis de penicilinas como se expuso, principalmente, en los apartados 3 y 4 de la Introducción.

En *P. chrysogenum* los tres genes estructurales de la biosíntesis de penicilinas forman parte de una misma agrupación génica, que además incluye otros marcos de lectura codificantes (van den Berg y col. 2008). Ninguno de estos marcos de lectura que acompañan a los genes de biosíntesis es estrictamente esencial para la producción de penicilina, pero sí son determinantes para la productividad eficiente de la ruta biosintética en cuestión (García-Estrada y col. 2007). Entre estos genes incluidos en el *cluster* de biosíntesis no hay ninguno que codifique un regulador específico de la ruta. Tampoco ninguno de ellos codifica un transportador específico de betalactamas, a diferencia de lo que ocurre en los *clusters* de biosíntesis de betalactamas en otros organismos productores, que si albergan genes codificantes de estos transportadores de autorresistencia (Hamed y col. 2013).

Como ya se ha apuntado en varias ocasiones, la ruta biosintética de penicilinas en *P. chrysogenum* está compartimentada. Las tres reacciones vertebrales de esta vía del metabolismo secundario transcurren
entre el citosol y el lumen peroxisomal. Además, se considera que desde la vacuola existe un aporte importante de la cisteína y la valina consumidas por la ACVS en el citosol para la formación del tripéptido LLD-ACV. Esto implicaría a tres compartimentos subcelulares en la biosíntesis de penicilina: el citosol, la vacuola y el peroxisoma. En el caso concreto de la ruta de biosíntesis de penicilina, sólo el citosol y el peroxisoma serían verdaderos compartimentos metabólicos mientras que la vacuola sólo se consideraría un compartimento de almacenamiento, al no albergar el desarrollo de ninguna reacción de la vía de biosíntesis de penicilina.

1.2.1. La compartimentación metabólica desde la perspectiva de la evolución.

La compartimentación metabólica asociada a membranas, que hace referencia a la distribución diferencial en la célula de las enzimas implicadas en una ruta metabólica, es un fenómeno característico de eucariotas (Martin, 2010). Diferentes teorías evolutivas interpretan la compartimentación como un proceso que permite aumentar la complejidad de las estructuras vivas y que las habilita para adaptarse y ser más eficientes en condiciones ambientales cambiantes. Por tanto la compartimentación podría interpretarse como un proceso imprescindible para la evolución de los organismos y el incremento de la diversidad biológica.

Diversas teorías evolutivas asocian la aparición de la compartimentación intracelular con la aparición de las primeras formas de vida eucarióticas a partir de formas ancestrales procarióticas. La teoría de la endosimbiosis seriada de Margulis (Sagan, 1967) apunta a tres fenómenos de endosimbiosis que explicarían la aparición de los organismos eucariotas. Cada proceso de endosimbiosis implica la aparición de un nuevo compartimento metabólico subcelular: i) la fusión de una arquea fermentadora y termoacidófila y una espiroqueta nadadora habrían originado el nucleoplasma y el flagelo eucariota, dando lugar al primer organismo eucariota, aún anaerobio, habría incorporado simbiónticamente una proteo-bacteria de vida libre respiradora de oxígeno, lo que le habría dotado de la capacidad de metabolizar este gas, cada vez más presente en la atmósfera, dando origen al precursor de las mitocondrias y peroxisomas presentes en las células actuales (los hongos y los animales somos el resultado de esta segunda incorporación) y iii) por último, este organismo respirador se habría fusionado simbióticamente con una cianobacteria fotosintética, precursora de los cloroplastos vegetales, dando lugar a un nuevo endosimbionte capaz de respirar oxígeno y transformar la energía solar en materia orgánica y oxígeno (precursor de las plantas).

Según la teoría simbio-autógena de Thomas Cavallier-Smith la conversión de la primitiva célula procariota en célula eucariota tuvo lugar mediante importantes cambios en la estructura de la célula que precedieron a la simbiogénesis que originó mitocondrias y cloroplastos (Cavalier-Smith, 2006; Cavalier-Smith, 2010). Uno de estos cambios está asociado a la aparición del sistema de endomembranas de los eucariotas, un compartimento metabólico subcelular muy importante. Según este autor, la membrana de núcleo y la del retículo endoplásmico se habrían originado a partir de una reorganización de la membrana citoplasmática de un procariota primitivo. En las bacterias la membrana plasmática está asociada al cromosoma y los ribosomas que sintetizan las proteínas de membrana y esta crece por inserción directa de proteínas y lípidos. En los eucariotas actuales la membrana plasmática crece por fusión de vesículas liberadas por gemación de las endomembranas, mientras que el retículo endoplásmico lo hace por inserción directa de lípidos y proteínas sintetizadas por los ribosomas asociados a su cara externa. El otro gran cambio tendría

que ver con el origen del citoesqueleto (interno) a partir de la pared bacteriana. En las bacterias la pared celular participa en la segregación del ADN y en la división celular. En las células eucariotas lo microtúbulos y microfilamentos median la segregación cromosómica y la división celular, respectivamente y están asociados a motores moleculares de dineína, cinesina y miosina que proporcionan la energía que el citoesqueleto necesita para ejercer su función.

1.2.2. Origen evolutivo de los peroxisomas.

Mientras que el origen endosimbiótico de algunos orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos es ampliamente aceptado por la comunidad científica, el de otros, como los peroxisomas no está tan claro. Todos los peroxisomas son orgánulos rodeados de una membrana simple y carecen de material genético propio. Esto significa que todas las proteínas peroxisomales están codificadas por el genoma nuclear y son traducidas por ribosomas citosólicos. La incorporación de dichas proteínas al orgánulo se realiza mediante un sistema de importación específico, dependiente de señales de direccionamiento incluidas en la propia secuencia proteica (Brown y Baker, 2008; Girzalsky y col. 2009; Ma y Subramani, 2009). El sistema de reclutamiento e importación de las peroxinas está ampliamente conservado. Otro mecanismo común en todos los peroxisomas es aquel responsable de la división para la formación de nuevos peroxisomas. En términos de metabolismo, sin embargo, los peroxisomas son orgánulos enormemente diversos (*ver*: Introducción - 4.3.4.1. Visión general del peroxisoma). La mayoría de los peroxisomas albergan vías para la oxidación de ácidos grasos, para la biosíntesis de lípidos y para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, pero aparte de estas no parece que haya un conjunto de enzimas específicas y características de los peroxisomas.

El hecho de que los peroxisomas de organismos muy diferentes presenten un mecanismo común para su división, biogénesis y mantenimiento apunta a un origen evolutivo común para todos los peroxisomas. Sin embargo, la naturaleza de ese origen evolutivo no ha sido esclarecida (de Duve, 2007), existiendo dos vertientes de hipótesis: una respalda el origen endosimibiótico de los peroxisomas, mientras que otra defiende su origen a partir del sistema endomembranoso. Cuando se observó que los peroxisomas pueden formarse de novo a partir de otros preexistentes y pueden incorporar proteínas posttranscripcionalmente (igual que mitocondrias y cloroplastos), se sugirió que los peroxisomas habrían surgido a consecuencia de un fenómeno de endosimbiosis (Lazarow y Fujiki, 1985). Los protoperoxisomas habrían sido incorporados a las células como entes especializados para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, en un momento en que los niveles de oxígeno atmosférico se estaban incrementando y este gas resultaba tóxico para la gran mayoría de los organismos vivos. La otra línea de hipótesis sugiere que los peroxisomas se habrían originado a partir del sistema de endomembranas celulares. Este planteamiento surgió al comprobar experimentalmente que existe una estrecha relación entre el retículo endoplásmico y el peroxisoma (Novikoff y Shin, 1964). Algunas de las evidencias que apoyan esta vinculación es que ciertas proteínas peroxisomales de membrana deben de ser direccionadas al retículo endoplásmico antes de alcanzar los peroxisomas (Tabak y col. 2003). Además, mutantes deficientes en peroxisomas pueden formar otros nuevos a partir del retículo endoplásmico (Erdmann y Kunau, 1992). Adicionalmente, entre los componentes de los sistemas de importación de proteínas del peroxisoma y del retículo endoplásmico existe cierto grado de homología, lo que sugiere la existencia de una relación evolutiva entre ambos (Gabaldón y col. 2006; Schlüter y col. 2006).

En cualquier caso, si se acepta la existencia de un ancestro común a todos los peroxisomas, sólo hay dos posibles escenarios evolutivos que expliquen los elevados niveles de diversidad metabólica de los peroxisomas actuales: una simplificación metabólica diferencial del ancestro común (De Duve, 1969a) o a la adquisición diferencial de enzimas (o incluso vías metabólicas enteras), que es la posibilidad más aceptada actualmente. Así, los peroxisomas son considerados productos evolutivos con un proteoma altamente plástico, cuyo potencial metabólico se ha amoldado durante la evolución para adaptarse a las necesidades específicas de cada linaje de celular (Gabaldón, 2010). La especialización para la biosíntesis de PenG sería un ejemplo de esta adaptación de los peroxisomas a las necesidades específicas de la células en un organismo productor, como lo es *P. chrysogenum*.

1.3. Compartimentación de las rutas metabólicas.

En las células, el tráfico de las proteínas, incluidas las enzimas, está gobernado en muchos casos por secuencias señal que determinan su destino final en la célula. Según esta secuencia señal, las proteínas van a ser reclutadas por un mecanismo molecular concreto que las desplazará a su destino y las incorporará en su emplazamiento correspondiente (una membrana, el lumen de un orgánulo, etc.). Sin embargo este sistema de direccionamiento no es infalible y aunque una proteína porte una señal de direccionamiento, una cierta cantidad de esa proteína (se estima que alrededor de un 0.1-1 % de la actividad total) podría acabar en un destino diferente al marcado por el péptido señal. Este fenómeno se conoce como *"minor misstargetting"*. Si este proceso se ha dado de forma continuada a lo largo de la evolución y ha afectado a todas las proteínas de cada célula, habría permitido la presencia de enzimas operantes en la misma ruta metabólica en diferentes localizaciones subcelulares como parte del proceso de evolución de las vías metabólicas.

En la evolución de las rutas metabólicas la unidad de selección no es una única enzima aislada, que por sí misma resultaría inútil, sino una conversión de sustrato a producto y su catalizador correspondiente, es decir una reacción química. El fenómeno de *"minor misstargetting"* habría permitido a lo largo de la evolución que una determinada proteína hubiese experimentado todas las posibles variables de localización dentro de la célula. Cada localización aportaría un conjunto de condiciones microambientales concretas, que influirían en la funcionalidad de la enzima. Los mecanismos evolutivos podrían actuar de forma independiente sobre cada fracción enzimática (la fracción de enzima en cada emplazamiento), potenciando aquellas que fuesen más eficientes y provechosas para la célula y deprimiendo las que no lo fuesen tanto. Puesto que la funcionalidad de la enzima depende del ambiente físico-químico, la localización subcelular influiría de manera decisiva sobre el proceso selectivo.

1.4. Papel de las proteínas transportadoras en la compartimentación metabólica.

Las nuevas variantes de compartimentación metabólica que hubieran surgido durante la evolución debido al fenómeno de "*minor misstargetting*", habrían estado inmediatamente sujetas a selección y fijación. Asociado a esta reorganización de la distribución de las vías metabólicas, debió desarrollarse un sistema de transporte que permitiera nuevos flujos de metabolitos que posibilitasen el trasvase de sustratos y productos de cada reacción a través de las membranas. Estos sistemas de transporte entre los diferentes compartimentos tienen como objetivo asegurar la eficiencia de las vías metabólicas relocalizadas. Como se expuso en el capítulo de Introducción (apartado 4. Compartimentación de la biosíntesis de PenG), las membranas biológicas son barreras que la mayoría de los compuestos no pueden atravesar por sí mismos, requiriendo, para ello, la intervención de proteínas de membrana con función transportadora.

Las proteínas transportadoras son imprescindibles para la célula en general. Por su importancia para la ruta de biosíntesis de PenG en concreto, que transcurre a caballo entre el citosol y los peroxisomas, ha habido varios estudios que se han dedicado a tratar de caracterizar alguna de las proteínas transportadoras vinculadas a ella. En organismos productores de penicilinas sólo se han descrito unos pocos transportadores cuya función influye sobre la vía de biosíntesis de betalactamas. Este es el caso de PenT (Yang y col. 2012) y ABC40 (Weber y col. 2012b) en *P. chrysogenum* y AtrD en *A. nidulans* (Andrade y col. 2000). Ninguno de los genes que codifican estas proteínas están incluidos en el *cluster* biosintético correspondiente a la penicilina.

En otros organismos productores de betalactamas, el propio *cluster* de biosíntesis alberga genes que codifican proteínas transportadoras. Por su presencia en estas agrupaciones junto a los genes biosintéticos, dichos transportadores podrían desempeñar un rol en la detoxificación o autorresistencia en el organismo frente a la sustancia antibiótica que él mismo produce. Algunos de estos transportadores han sido caracterizados funcionalmente. Este es el caso, entre otros, de las proteínas CefT (Ullán y col. 2002; Ullán y col. 2008a), CefP (Ullán y col. 2010) y CefM (Teijeira y col. 2009), cuyos genes codificantes están presentes en el *cluster* temprano de biosíntesis de cefalosporinas de *A. chrysogenum*. La caracterización de estos transportadores fue llevada a cabo por el grupo de trabajo dentro del que se ha desarrollado el presente trabajo experimental.

A pesar de estas investigaciones, la red de transporte de sustratos, intermediarios y productos de las rutas de biosíntesis de betalactamas en P. chrysogenum y A. chrysogenum aún no está totalmente esclarecida. Lo que parece claro es que en dicha red de transporte los transportadores activos desempeñan un papel crucial. No obstante, todos los transportadores mencionados en los dos párrafos precedentes, pertenecen a esta categoría, siendo ABC40 y AtrD transportadores activos primarios de tipo ABC y los restantes (PenT, CefT, CefP y CefM) transportadores activos secundarios de tipo MFS. Otros indicios refrendarían la importancia y la implicación de los transportadores activos en la ruta de biosíntesis de betalactamas, al menos en P. chrysogenum. Primero, más de la mitad de las numerosas proteínas transportadoras codificadas en el genoma de P. chrysogenum corresponden a transportadores activos (51 ABC y 415 MFS) (van den Berg y col. 2008) lo que refleja su importancia biológica en este organismo. Segundo, el verapamilo, una droga antagonista de transportadores MDR (como MFSs y ABCs), afecta negativamente a la producción de penicilina, indicando que su secreción podría estar mediada por este tipo de transportadores activos. Tercero, el PAA, un efector positivo de la biosíntesis de penicilina, estimula la transcripción de, entre otros, muchos genes que codifican, presuntamente, proteínas transportadoras y además en las cepas superproductoras de penicilina diversos genes codificantes de transportadores también muestran incrementado su nivel de expresión. La sobreexpresión de proteínas transportadoras, por tanto, está asociada a condiciones favorables para la producción de penicilina (van den Berg y col. 2008).

Por otro lado, la secreción de penicilina podría estar mediada por transportadores no especializados estrictamente en el transporte de compuestos betalactámicos, tal y como lo demuestra el logro de la producción de penicilina tras la expresión heteróloga de la ruta biosintética completa en la levadura *H. polymorpha* (Gidijala y col. 2009). Los transportadores MFS, dada su capacidad para transportar una gran variedad de sustratos poco relacionados estructuralmente, se adaptarían bien a este rol de transportar, en un organismo determinado, compuestos que este produce solamente de forma circunstancial. Además, la membrana del peroxisoma, que es un orgánulo crucial para la producción eficiente de penicilina, no es especialmente rica en proteínas, lo que parece contrastar con su alta versatilidad metabólica. Esto podría estar indicando que esta membrana no puede albergar transportadores específicos para cada compuesto que ha de ser importado o exportado del peroxisoma, sino que más bien poseería transportadores generalistas y adaptables, como los MFS (Bartoszewska y col. 2011a).

Caracterización de PenV, PaaT y PenM

2

Dada la importancia de los transportadores en la ruta biosintética de penicilina, el objetivo de la presente Tesis se centró, precisamente, en la caracterización de proteínas transportadoras funcionalmente vinculadas a la ruta de biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*. Aparentemente en el *cluster* de biosíntesis de penicilinas de *P. chrysogenum* no existe ningún gen susceptible de codificar una proteína transportadora. Para acotar la búsqueda de proteínas transportadoras de *P. chrysogenum* potencialmente implicadas en la ruta de biosíntesis de penicilina y aprovechando el conocimiento que se tiene sobre el papel funcional de CefT, CefP y CefM en el productor de cefalosporinas *A. chrysogenum*, se escogieron para su análisis las proteínas de *P. chrysogenum* con mayor grado de homología a estas de *Acremonium*.

2.1. Una proteína vacuolar afecta drásticamente a la biosíntesis del tripéptido ACV y a la ruta de biosíntesis de betalactamas en *Penicillium chrysogenum*.

(A vacuolar membrane protein affects drastically the biosinthesis of the ACV tripeptide and the beta-lactam pathway of *Penicillium chrysogenum*. (2013). Applied Microbiology and Biotechnology. 97(2):795-808.)

En este artículo se describe la caracterización de una proteína, a la que se denominó PenV, cuyo análisis *in silico* apunta a que se trata de una proteína de membrana, por tener un carácter marcadamente hidrofóbico y por poseer dominios característicos presentes en otras proteínas de membrana. Estos dominios característicos, por otro lado, no posibilitaron por si mismos la asignación de PenV a una familia concreta de proteínas de membrana. Los estudios de localización llevados a cabo con una proteína de fusión fluorescente derivada de PenV, PenV-DsRed, pusieron en evidencia experimentalmente que PenV verdaderamente se localiza en una membrana biológica, concretamente en la membrana de las vacuolas de *P. chrysogenum*.

Cuando se consiguió reprimir post-transcripcionalmente el nivel efectivo de expresión del gen *penV* y por consiguiente, en teoría, también la reducción del nivel de proteína PenV, mediante la inducción de un mecanismo de ARN de interferencia mediado por siARNs, se observó cómo había una reducción del flujo metabólico a lo largo de toda la ruta de biosíntesis de PenG. Se constató una evidente reducción de la producción de los intermediarios LLD-ACV e IPN y del producto PenG a consecuencia del silenciamiento del gen *penV*. Este efecto sobre la eficiencia productiva de la ruta también se puso de manifiesto a nivel de la

expresión de los genes de biosíntesis, que presentan perfiles de expresión alterados a causa del silenciamiento.

En un intento por llevar a cabo la sobreexpresión del gen *penV*, de forma llamativa, también se registró una disminución de la producción de IPN y PenG, un efecto poco esperado por su paralelismo con el efecto del silenciamiento. Se piensa que el aumento del nivel de transcripción del *penV* asociado a la sobreexpresión efectiva del gen, pudo desencadenar un mecanismo de respuesta defensiva en la célula que habría implicado la destrucción de los transcritos de *penV*. Esto explicaría que en el intento por sobreexpresar el gen *penV* se hubieran obtenido efectos fenotípicos semejantes a los causados por el silenciamiento.

Por tanto, se comprobó que la represión post-transcripcional de *penV* afecta negativamente incluso a la etapa inicial de la biosíntesis de PenG, es decir, a la producción de LLD-ACV, y experimentalmente se probó el emplazamiento de la proteína PenV en la membrana de la vacuola. Se sabe que las vacuolas actúan como reservorios de aminoácidos y que en *P. chrysogenum*, durante la biosíntesis de penicilina, se produce un aporte de cisteína y valina desde la vacuola al citosol para la síntesis de LLD-ACV por parte de la ACVS. Puesto que PenV está emplazada en la membrana que separa el punto de almacenaje de estos aminoácidos y la enzima citosólica que ha de utilizarlos como precursores en la ruta de biosíntesis, se propuso como posible función de PenV la exportación de aminoácidos desde la vacuola al citosol, lo que significa que PenV sería una permeasa aminoacídica. Esto explicaría que el silenciamiento de *penV*, el gen codificante de la permeasa PenV, provocase la reducción del este flujo de aminoácidos disponibles para la ACVS y se redujera, en primera instancia, la biosíntesis del tripéptido LLD-ACV y a consecuencia de ello disminuyera también la síntesis del resto de intermediarios por la limitación de la cantidad de sustrato.

2.1.1. Determinación de la proteína de *P. chrysogenum* con mayor homología a la proteína CefP de *A. chrysogenum* y del gen que la codifica. Caracterización *in silico* de *penV*/PenV.

La proteína CefP de *A. chrysogenum* ha sido caracterizada como una proteína transportadora de tipo MFS implicada en la entrada de IPN hacia el peroxisoma en este hongo productor de cefalosporinas (Ullán y col. 2010). Cuando la secuencia de CefP se alineó con el proteoma deducido de *P. chrysogenum*, no se registró ninguna proteína estrictamente homóloga a ella, pero se escogió la que mayor porcentaje de homología presentaba con CefP para continuar con el análisis experimental. Esta fue la proteína CAP99503, renombrada como PenV, que mostraba un 39.3 % de identidad con la proteína de referencia CefP y que es codificada por el marco de lectura Pc22g22150, renombrado *penV*.

El análisis *in silico* del tándem *penV*/PenV (gen/proteína) apunta a que muy probablemente PenV sea una proteína de membrana. El alineamiento de *penV* con las bases de datos globales, muestra que a nivel de secuencia este gen tiene un alto porcentaje de identidad con otros genes fúngicos que codifican proteínas con una hipotética función transportadora. La proteína PenV muestra homología con varios dominios, que la caracterizan como una proteína de membrana (Figura suplementaria 1: 1 A).

i) Dominio RSN1_TM [pfam13967]: (posición 38-200) este dominio abarca las tres primeras regiones transmembranales de ciertas proteínas integrales de membrana con 11 TMS implicadas en el transporte vesicular en *S. cerevisiae*. En esta levadura las proteínas que portan este

dominio están implicadas en los procesos tardíos de exocitosis desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática (Wadskog y col. 2006).

ii) Dominio DUF4463 [pfam14703]: (posición 255-360) es un dominio citosólico de función desconocida presente en proteínas de membrana

iii) Dominio DUF221 [pfam02714]: (posición 377-707) es un dominio de función desconocida que aparece en hipotéticas proteínas transmembranales de función indeterminada

iv) Dominio COG5594 [COG5594]: (posición 5-832) este dominio aparece en proteínas integrales de membrana aún no caracterizadas.

PenV es una proteína hidrofóbica, lo que apoyaría la localización de PenV en una membrana celular. Diferentes herramientas informáticas predicen 11 tramos de alta hidrofobicidad en PenV que constituirían 11 TMS plegados con una organización en α -hélices (Figura suplementaria 1: 1 B, 1 C, 1 D).

PenV no muestra ninguna secuencia señal reconocible y tampoco es posible obtener una predicción de su estructura tridimensional mediante los programas informáticos habituales, lo que significa que en las bases de datos no hay un registro de proteínas con una estructura macromolecular semejante a la de PenV.

2.1.2. Silenciamiento del gen diana mediante siARNs y determinación del efecto del silenciamiento sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibióticos.

Para la construcción del plásmido para el silenciamiento del gen *penV* se clonó un fragmento exónico del mismo de 443 pb en el vector pJL43-RNAi, para dar lugar al plásmido denominado p*penV*-RNAi, que se transformó en protoplastos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Como resultado de la transformación se obtuvieron múltiples transformantes resistentes a fleomicina, que se analizaron mediante hibridación de *Southern* para determinar si en alguno de ellos se había dado la correcta integración en el genoma del casete para el silenciamiento de *penV*. Varios de los clones analizados, TAT-1, TAT-16, TAT-60, TAT-65 y TAT-69 mostraron el patrón de restricción esperado para los transformantes positivos. Tres de estos transformantes positivos, TAT-1, TAT-65 y TAT-69, se seleccionaron para determinar cómo afectaba el silenciamiento de *penV* a la ruta de biosíntesis de penicilina.

Tras fermentar las cepas transformantes y la cepa de referencia en condiciones de producción de penicilinas, se llevó a cabo el análisis del nivel de expresión de *penV*. Según este análisis, se logró un silenciamiento efectivo del gen *penV* en el transformante TAT-1. Tanto mediante RT-PCR como mediante hibridación de *northern* se constató una evidente disminución de la transcripción de *penV* en TAT-1, estimándose esta reducción de en torno al 65 % mediante el análisis de *northern* y de en torno al 70 % mediante el análisis de RT-PCR, con respecto a la cepa parental de referencia Wisconsin 54-1255. En las otras dos cepas transformantes analizadas, TAT-65 y TAT-69, no se obtuvo un silenciamiento efectivo del gen *penV*. En TAT-1, el transformante verdaderamente silenciado, también se determinó la alteración de los niveles de transcripción de los genes para la biosíntesis de penicilina *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*. En el caso del gen *pcbAB* se registró un incremento transcripcional, que podría deberse a un efecto para la compensación de la reducción del flujo de aminoácidos desde la vacuola, provocado por el silenciamiento del gen *penV* y por la presumible reducción de la dosis de la proteína PenV. En el caso de los genes *pcbC* y

penDE se registró una reducción del ARNm correspondiente, quizá ocasionado por la limitación en la disponibilidad _{LLD}-ACV e IPN, sustratos para las enzimas IPNS e IAT, codificadas por *pcbC* y *penDE*, respectivamente. Esta baja disponibilidad de _{LLD}-ACV e IPN estaría ocasionada en último término por la reducción del flujo de aminoácidos desde la vacuola debido al silenciamiento del gen diana.

El análisis del perfil de producción de los intermediarios LLD-ACV e IPN y del producto PenG demostró que el silenciamiento de *penV* tiene un efecto muy claro sobre la eficiencia de producción de estos compuestos en las cepas transformantes. Para determinar el perfil de producción de cada compuesto, los transformantes TAT-1, TAT-65 y TAT-69 se fermentaron en condiciones de producción de penicilina junto con la cepa parental Wisconsin 54-1255. Las muestras de fermentación se analizaron mediante bioensayo frente a la bacteria sensible a betalactamas *M. luteus* y mediante técnicas cromatográficas, como TLC y HPLC. Mediante la prueba de TLC se determinó que el transformante silenciado TAT-1 produce menos LLD-ACV que la cepa parental. El antibiograma de los caldos de cultivo del los transformantes frente a M. luteus mostró que en el transformante TAT-1 se produce una drástica disminución de la producción de penicilinas, hasta representar, en el último tiempo de muestreo, tan solo el 9 % o el 25 % de la producción de la cepa control en las fermentaciones en medio DP (con un 0.1 % p/v de PAA) y en medio CP (con un 0.4 % p/v de PAA), respectivamente. Mediante el análisis de las muestra de fermentación de TAT-1 y Wisconsin 541255 por HPLC, se confirmaron los datos de producción inferidos del antibiograma. La producción tanto de IPN (en fermentación en medio DP) como de PenG (en fermentaciones en medios DP y CP) es menor en el transformante TAT-1 (a consecuencia del silenciamiento de penV) que en la cepa parental. En el último tiempo de muestreo estas producciones sólo representan, aproximadamente, el 9 % (IPN en medio DP), el 18 % (PenG en medio DP) y el 26 % (PenG en medio CP) de la producción de Wisconsin 54-1255.

2.1.3. Sobreexpresión del gen *penV* mediante el uso de un promotor de expresión fuerte y caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG.

Para la construcción del plásmido para la sobreexpresión del gen penV se clonó, íntegro, el marco codificante del gen, de 2.6 Kb, en el vector pIBRC43 Bg/II (Kosalková y col. 2009), para dar lugar al plásmido denominado pSpenV. En este plásmido el gen penV queda bajo el control del promotor de expresión fuerte Pgdh. El plásmido pSpenV se empleó para transformar protoplastos de P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 junto con el plásmido auxiliar pJL43, que otorga resistencia a fleomicina. Los clones resistentes a fleomicina se analizaron mediante hibridación de Southern para determinar la correcta integración del casete de sobreexpresión de penV en su genoma. El análisis de hibridación de Southern reveló que dos de los nueve clones analizados, los designados como TSV-118 y TSV-125, mostraban el patrón de restricción esperado para los transformantes de sobreexpresión positivos. Estos transformantes se fermentaron en condiciones de producción de penicilinas y se analizó su perfil de producción de IPN y PenG, para determinar qué consecuencias tiene la sobreexpresión del gen penV sobre la producción de betalactamas en las cepas transformantes por comparación con la cepa Wisconsin 54-1255. En contra de lo que cabría esperar, en una de las cepas transformadas, en la TSV118, se produjo una reducción de la producción de PenG, un efecto paralelo al ocasionado por el silenciamiento, aunque la reducción de la tasa de producción resultó ser más leve en este caso. Mediante bioensayo la reducción de producción de PenG en la cepa TSV118 se estimó en torno al 80 % en medio DP y al 75 % en medio CP a último tiempo de fermentación. Mediante HPLC estas reducciones se estimaron en torno al

83 % en medio DP y en torno al 75 % en medio CP, también a último tiempo de fermentación. La reducción de la producción de PenG hizo pensar que probablemente el aumento del nivel de transcripción de *penV* desencadenase en *P. chrysogenum* un mecanismo de defensa contra secuencias invasoras, que implica también una represión transcripcional de *penV*. Por otro lado, la cepa TSV125 mostró una producción de PenG similar a la de la cepa parental, indicando que la función de esta proteína probablemente no es limitante para la ruta de biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum* en condiciones normales.

2.1.4. Determinación de la localización in vivo de la proteína de fusión fluorescente roja PenV-DsRed.

Para determinar la localización subcelular de la proteína PenV, se construyó el plásmido pPenV-DsRed, En este plásmido el gen penVestá fusionado en marco por su extremo C-terminal con el gen dsRed-2. A partir del promotor Pgdh, que controla ambos genes en el plásmido, se produce un transcrito que al traducirse genera la proteína de fusión fluorescente roja PenV-DsRed. El plásmido pPenV-DsRed se transformó en protoplastos de P. chrysogenum Wisconisn 54-1255 junto con el plásmido p43EGP-SKL, a partir del que se expresa la proteína fluorescente verde EGFP-SKL, que se localiza por defecto en los peroxisomas, en virtud de la señal de direccionamiento SKL que posee. Los protoplastos transformados se seleccionaron por su capacidad de crecer en un medio selectivo suplementado con fleomicina y varios de los transformantes resistentes fueron analizados mediante Southern blot para determinar la integración del casete de expresión para la proteína de fusión PenV-DsRed. Mediante el análisis de Southern se comprobó que los transformantes TVRed-15 y TVRed-39 portaban el casete de interés. El transformante TVRed-39 y la cepa parental Wisconsin 54-1255 fueron crecidas en medio líquido CCM y una muestra de los cultivos fue analizada al microscopio confocal de fluorescencia. Esto permitió apreciar que en la cepa TVRed-39 la proteína de fusión derivada de PenV, se localiza a lo largo de una estructura laminar intracelular. Dicha estructura laminar delimita formaciones con aspecto de vesículas de un tamaño mucho mayor que los peroxisomas, marcados en verde en esta cepa por la proteína EGFP-SKL expresada a partir del plásmido p43EGP-SKL.

Para determinar que estructura laminar era la que alojaba la proteína PenV, el micelio de la cepa parental Wisconsin 54-1255, crecida en medio CCM, se incubó con el colorante vital FM4-64 durante 10 o 30 minutos. Tras las incubaciones se observaron las muestras en el microscopio confocal de fluorescencia. El colorante lipofílico FM4-64 es rojo y fluorescente y se emplea para marcar específicamente la membrana de las vacuolas en células vivas. Tras la incubación breve de 10 minutos con el colorante, este se mostraba tiñendo la membrana plasmática celular, debido al carácter lipofílico del colorante y al no haber transcurrido el tiempo suficiente como para permitir su penetración al interior de las células. Tras la incubación prolongada de 30 minutos, cuando el colorante ya ha sido interiorizado, en las muestras de la cepa Wisconsin 54-1255 aparecen marcadas con FM4-64 el mismo tipo de estructuras laminares intracelulares en las que se observó la fluorescencia roja debida a PenV-DsRed en la cepa TVRed-39. Esto significa que la proteína PenV nativa se localiza en la membrana vacuolar en las células de *P. chrysogenum.*

2.2. El transporte de ácido fenilacético a través de la membrana del peroxisoma está mediado por la proteína PaaT en *Penicillium chrysogenum*.

(The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by PaaT protein in *Penicillium chrysogenum.* 2013. Applied Microbiology and Biotechnology. 97(7):3073-3084.)

En esta parte del trabajo se describe la caracterización de la proteína PaaT. Según el análisis *in silico* de la secuencia de esta proteína y de su gen codificante, por su marcado carácter hidrofóbico PaaT es una proteína de membrana. Más concretamente, se trataría de una proteína transportadora de tipo MFS, pues PaaT presenta dominios estructurales típicos de este tipo de transportadores, que presentan una organización estructural altamente conservada y reconocible, consistente en 12 TMS ordenados en dos módulos de 6 TMS cada uno. La predicción de la posible estructura tridimensional de PaaT se adecua a la estructura prevista para los transportadores MFS, con un canal central delimitado por los 12 TMS organizados como α -hélices hidrofóbicas. Además, PaaT presenta una posible señal para la unión a Pex19p, que dirigiría su inserción en la membrana peroxisomal. No en balde, la determinación de la localización *in vivo* de la proteína PaaT, llevada a cabo mediante la expresión de la proteína quimérica PaaT-DsRed en células de *P. chrysogenum*, demostró que PaaT se encuentra verdaderamente localizada en los peroxisomas de este hongo.

El silenciamiento de *paaT*, inducido por la expresión del casete para su silenciamiento incluido en el plásmido p*paaT*-RNAi y por tanto la reducción de la dosis de PaaT, provoca una reducción de la producción de PenG en las cepas silenciadas con respecto a la cepa parental. La producción de IPN en las mismas cepas, sin embargo, no se ve alterada, lo que apunta a que, funcionalmente, la proteína PaaT, interviene de alguna manera en la conversión de IPN a PenG. La sobreexpresión de *paaT* y por tanto el presunto incremento de la actividad PaaT, en este caso sí tiene un efecto contrapuesto al del silenciamiento. Las cepas transformadas que sobreexpresan PaaT experimentan un incremento de la capacidad de producción de PenG y un incremento del consumo del intermediario IPN para lograr esa subida de la producción del producto final.

La proteína PaaT media la tolerancia a PAA. Esto se demostró en un estudio en el que se puso de manifiesto que cepas con una menor dosis de PaaT (cepas silenciadas en *paaT*) exhibían más dificultades para desarrollarse en presencia de PAA y que, por el contrario, las cepas con una mayor actividad PaaT (cepas que sobreexpresan *paaT*) se desarrollan más en el medio suplementado con PAA, siempre en comparación con la cepa de referencia Wisconsin 54-1255.

De acuerdo al análisis de su secuencia y como ratificaron los estudios de localización, PaaT es un proteína de membrana peroxisomal. Según el efecto del silenciamiento sobre la producción de metabolitos betalactámicos, PaaT, a nivel funcional, afecta a la producción de PenG pero no a la de IPN. En base a estos hechos se propuso que la función de PaaT sería mediar en la importación de PAA hacia el peroxisoma.

2.2.1. Determinación de la proteína de *P. chrysogenum* con mayor homología a la proteína CefT de *A. chrysogenum* y del gen que la codifica. Caracterización *in silico* de *paaT*/PaaT

La proteína CefT de *A. chrysogenum* pertenece a la familia MFS de transportadores secundarios. Esta proteína está implicada en la secreción de betalactamas hidrofílicas y confiere resistencia a fenilacetato

(Ullán y col. 2002; Ullán y col. 2008a). La proteína CefT se alineó con el proteoma de *P. chrysogenum* y la proteína CAP9027, codificada por el marco de lectura Pc21g01300, que mostró el mayor porcentaje de identidad con CefT (72 %), se analizó con detalle. CAP95027 y Pc21g01300 fueron renombrados como PaaT y *paaT*, respectivamente, y según el análisis bioinformático de ambos, PaaT parece ser una proteína de membrana y concretamente de la membrana peroxisomal, en virtud de la presencia de una posible secuencia señal para la unión a Pex19p. Esta señal hace a la proteína PaaT susceptible de ser incorporada a la membrana del peroxisoma

El gen *paaT* muestra una homología significativa con genes que presuntamente codifican proteínas transportadoras en otros hongos, en algunos casos pertenecientes a la superfamilia MFS. La búsqueda de dominios conservados en PaaT, la caracterizan inequívocamente como miembro de la superfamilia de transportadores MFS, puesto que posee los siguientes dominios (Figura suplementaria 2: 2 A):

i) Dominio MFS [cd06174]: (posición 103-526) dominio que caracteriza la proteína como miembro de la superfamilia MFS. La familia MFS está constituida por un conjunto grande y diverso de transportadores secundarios que facilitan el transporte de una gran variedad de sustratos a través de la membrana plasmática y de las endomembranas celulares. Si se observa el esquema este dominio está dividido en dos tramos, igual que los MFS tiene dos mitades, un C-terminal y otra N-terminal.

ii) Dominio 2_A_01_02 [TIGR00880]: (posición 143-279) dominio característico de proteínas de tipo MDR.

iii) Dominio MFS_1 [pfam07690]: (posición 106-490) dominio característico de transportadores de tipo MFS.

Además, PaaT también muestra alineamientos significativos con los siguientes dominios que aparecen en otras proteínas de membrana especializadas en el transporte de diferentes sustratos (Figura suplementaria 2: 2 A):

i) Dominio efflux_Bcr_CflA [TIGR00710]: (posición 97-525) dominio característico de transportadores de la subfamilia Bcr/CflA, que forman parte de la superfamilia MFS. Esta subfamilia incluye, entre otros, la proteína de resistencia a biciclomicina de *E. coli* Bcr, la proteína de resistencia a cloranfenicol y florfenicol de *Salmonella typhimurium* DT104 y la proteína de resistencia a cloranfenicol CmlA codificada en el plásmido R1033 de *Pseudomonas sp.*

ii) Dominio PRK11102 [PRK11102]: (posición 111-515) dominio presente en proteínas para la detoxificación de biciclomicina y otras sustancias

iii) dominio AraJ [COG2814]: (posición 89-490) dominio característico de permeasas para arabinosa y por tanto implicadas en el transporte de carbohidratos.

El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de PaaT, indica que esta es una proteína con 12 segmentos altamente hidrofóbicos, que representarían segmentos transmembranales de la proteína, organizados en dos grupos de 6 TMS. Algunos programas informáticos para el análisis de la hidrofobicidad de las proteínas o para la predicción de su topología consideran que PaaT sólo tendría 11 TMS, al excluir uno de los posibles segmentos TMS cuyo grado de hidrofobicidad no estaría muy marcado (Figura suplementaria 2: 2 B, 2 C). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia de 12 TMS es imprescindible para la capacidad funcional de los transportadores MFS. Algunos trabajos publicados que tratan precisamente sobre el análisis de transportadores MFS mediante herramientas bioinformáticas, explican que si bien en ocasiones estos programas excluyen o consideran dudosos de constituir un TMS a algunos fragmentos hidrofóbicos, hay que recordar que todos los MFS han de tener al menos 12 TMS y por tanto estos fragmentos, aunque poco hidrofóbicos, han de ser considerados como tales.

El modelado tridimensional de la proteína PaaT muestra la ordenación del los 12 TMS con estructura secundaria en hélice α , en torno a un canal central, a través del que sería translocado el sustrato de PaaT de un lado a otro de la membrana peroxisomal. En este modelado también se aprecia el gran lazo hidrofílico que separa las dos secciones de 6 TMS del transportador (Figura 16). Este lazo hidrofílico también es apreciable en el gráfico de hidrofobicidad (Figura suplementaria 2: 2 B) y en el esquema de la topología de PaaT (Figura suplementaria 2: 2 C).





2.2.2. Silenciamiento del gen *paaT* mediante siARNs y determinación del efecto del silenciamiento sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibióticos.

El plásmido para el silenciamiento de *paaT*, denominado p*paaT*-RNAi, se obtuvo clonando un fragmento exónico de *paaT* de 472 pb en el plásmido pJL43-RNAi. El plásmido de silenciamiento fue transformado en protoplastos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. A continuación los protoplastos transformados fueron seleccionados por su capacidad de crecer en un medio suplementado con fleomicina y varios de los clones resistentes fueron analizados por *Southern* para determinar la correcta integración a nivel genómico del casete de silenciamiento donado por el plásmido p*paaT*-RNAi. En este caso, el proceso de

transformación fue altamente efectivo, ya que en todos los clones analizados se había producido la integración del casete de silenciamiento en el genoma y además el gen *paaT* endógeno estaba intacto. Para la caracterización funcional de PaaT se seleccionaron al azar seis transformantes, los nombrados SilT-2, SilT-6, SilT-10, SilT-12, SilT-23 y SilT-30.

Cuando se analizó mediante hibridación de *northern* el nivel de transcrito correspondiente a *paaT* en cada una de las cepas tras su fermentación en condiciones de producción de penicilinas, se comprobó que en todas ellas se había logrado un efecto de silenciamiento. Este silenciamiento resultó especialmente efectivo, al menos a nivel de transcripción, en las cepas SilT-12, SilT-23 y SilT-30 en las que se encontró un nivel de reducción de la transcripción de en torno al 90 % con respecto a la cepa parental Wisconsin 54-1255. En la cepa SilT-6 fue en la que se registró el silenciamiento menos eficaz, estimándose una reducción del nivel de transcrito de *paaT* de en torno al 20 % con respecto a la cepa de referencia.

A pesar de las diferencias observadas en el nivel de transcripción de *paaT* en las diferentes cepas, no se observó un traslado lineal de esta gradación transcripcional a la eficiencia biosintética de la ruta de biosíntesis de PenG. Las cepas modificadas genéticamente y la cepa parental fueron fermentadas en condiciones de producción de penicilinas en medio CP (con un 0.4 % p/v de PAA). La producción de antibióticos fue determinada mediante HPLC en muestras tomadas a diferentes tiempos de fermentación. En todos los transformantes se constató una reducción de la producción de PenG a consecuencia del mecanismo de silenciamiento inducido por la transformación con el plásmido p*paaT*-RNAi. Esta reducción de la producción de PenG con respecto a aquella registrada para la cepa de referencia, fue aproximadamente de entre el 25 % (en las cepas SilT-12, SilT-23 y SilT-30) y el 44 % (en la cepa SilT-10) a último tiempo de muestreo. El máximo nivel de silenciamiento, por tanto, no coincide con el mayor nivel de reducción de la biosíntesis de PenG. También se midió la producción de IPN, pero no se detectaron diferencias significativas de producción de IPN entre las cepas silenciadas y la cepa parental. Esto indica que la función biológica de PaaT es relevante para la biosíntesis de PenG pero no así para la producción de IPN.

2.2.3. Sobreexpresión del gen *paaT* mediante el uso de un promotor de expresión fuerte y caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG.

El plásmido para la sobreexpresión del gen *paaT*, el pS*paaT*, fue construido clonando en el vector pIBRC43*Bgl*II un fragmento de 1.813 Kb incluyendo el gen de interés. Este plásmido, en el que *paaT* queda bajo el control del promotor fuerte P*gdh* para potenciar su tasa de transcripción, fue empleado para cotransformar protoplastos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 junto con el plásmido pJL43 con el fin de obtener cepas con una dosis incrementada de PaaT. De nuevo se llevó a cabo una criba de los protoplastos transformados cultivándolos en un medio selectivo suplementado con fleomicina. También de nuevo se comprobó mediante una hibridación de *Southern* la incorporación efectiva del casete para la sobreexpresión del gen *paaT* en el genoma de varios clones elegidos al azar. Los cuatro clones que mostraron el perfil de hibridación esperado para los transformantes positivos, los llamados SBRT-48, SBRT-139, SBRT-154 y SBRT-156, se analizaron para determinar qué efecto tiene la sobreexpresión del gen *paaT* en la biosíntesis de penicilina.

En primer lugar, se procedió a determinar mediante hibridación de *northern* si a nivel transcripcional se podía verificar un incremento de la expresión del gen *paaT* durante las fermentaciones en condiciones de

producción de penicilinas, debido a la expresión del casete de sobreexpresión incluido en el plásmido pS*paaT*. Efectivamente, en todos los transformantes analizados se pudo constatar un incremento de la expresión del gen *paaT*. En los transformantes SBRT-48 y SBRT-139, se midió un incremento del nivel de transcripción del 40 % y del 50 % respectivamente, en comparación con la Wisconsin 54-1255.

Las cepas en las que se sobreexpresaba *paaT* fueron fermentadas en condiciones de producción de penicilinas y las muestras tomadas periódicamente se analizaron mediante HPLC para determinar la producción de antibióticos. Todas las cepas transformadas con pS*paaT*, y por lo tanto expresando el casete de sobreexpresión de *paaT* y con una actividad PaaT presuntamente potenciada, experimentaban un incremento de su capacidad para producir PenG con respecto a la cepa de referencia Wisconsin 54-1255. Este efecto de incremento de la producción de PenG era el esperado, por ser el efecto contrario al provocado por el silenciamiento del gen diana. Estos incrementos, según los registros de HPLC fueron del 30 % (SBRT-156) al 100 % (SBRT-139). También mediante HPLC se cuantificó la producción entre los transformantes y la cepa parental, pero a tiempos tardíos se observa un ligero descenso en la producción en las cepas que sobreexpresan *paaT*, lo que podría explicarse por una conversión más eficiente de IPN en PenG permitiendo el incremento de la tasa de producción de este último compuesto.

2.2.4. Determinación de la localización in vivo de la proteína de fusión fluorescente roja PenV-DsRed.

La determinación de la localización subcelular de PaaT se llevó a cabo mediante la expresión heteróloga de las proteínas fluorescentes PaaT-DsRed y EGFP-SKL (dirigida a peroxisomas). Estas proteínas están codificadas, respectivamente, en los plásmidos pPaaT-DsRed y p43EGFP-SKL, portando, este último, además, el casete de resistencia a fleomicina para la selección de los clones transformados. Estos plásmidos se transformaron conjuntamente en protoplastos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. La correcta integración de los casetes para la expresión de las dos proteínas fluorescentes se determinó mediante hibridación de *Southern*. El único doble transformante obtenido, denominado TDsRed-8, fue crecido en medio CCM. Las muestras de cultivo líquido tomadas a las 72 h de cultivo se observaron al microscopio confocal de fluorescencia. Las imágenes obtenidas demuestran que la proteína PaaT se localiza en peroxisomas, puesto que se da una coincidencia total entre la localización de la proteína fluorescente roja PaaT-DsRed derivada de PaaT. La co-localización de las fluorescencias verde (debida a EGFP-SKL) y roja (debida a pS*paaT*) se manifiesta como una fluorescencia amarilla.

2.2.5. Ensayo de tolerancia a PAA de las cepas genéticamente modificadas en paaT.

El fenilacetato resulta tóxico si alcanza altos niveles intracelulares al provocar una acidificación del citoplasma, lo que interfiere con la homeostasis general de la célula. A la vez, este compuesto es imprescindible para la biosíntesis de PenG porque es el precursor de la cadena lateral de esta penicilina hidrofóbica.

La proteína CefT de *A. chrysogenum,* homóloga a la proteína PaaT de *P. chrysogenum,* participa en los procesos de detoxificación del PAA en dicho hongo filamentoso. De esta forma se consideró la posible implicación de PaaT en el transporte de fenilacetato en *P. chrysogenum.* Este extremo resulta factible en

vista de que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión del gen *paaT* afectan a la ruta biosintética de PenG.

Para evaluar el papel funcional de PaaT, se crecieron en medio sólido suplementado con concentraciones crecientes de PAA (del 0.2 %, 0.4 %, 0.8 % PAA p/v) tanto las cepas silenciadas (SilT-2, SilT-6, SilT-10, SilT-12, SilT-23 y SilT-30) como las sobreexpresadas (SBRT-48, SBRT-139, SBRT-154 y SBRT-156) en paaT. Para cada cepa y condición se determinó la tasa de crecimiento vegetativo, considerando como crecimiento basal aquel registrado para cada cepa crecida en ausencia de PAA (0 % p/v). El crecimiento de las cepas será tanto menor cuanto más toxico resulte el PAA para la cepa ensayada y, al contrario, a menor toxicidad más crecimiento. Considerando la ruta de biosíntesis de PenG como una vía para la detoxificación de PAA, se entiende que cuanto más efectiva sea esta ruta, más resistente será la cepa al efecto nocivo del PAA. De acuerdo al ensayo de tolerancia, las cepas sobreexpresadas en *paaT* crecen más que la cepa Wisconsin 54-1255 a cualquier concentración dada de PAA, es decir, que son menos sensibles que la cepa parental a la toxicidad del PAA. Por el contrario, las cepas silenciadas en *paaT* crecen menos que la cepa parental en presencia de PAA, lo que significa que son más sensibles al efecto tóxico del ácido que la cepa parental. La menor toxicidad del PAA sobre las cepas que sobreexpresan *paaT* se debería a que la mayor eficiencia de la ruta de biosíntesis de PenG permite el consumo de mayor cantidad de PAA mediante dicha vía de tal forma que el PAA al incorporase al 6-APA para formar PenG deja de ser tóxico. El efecto contrario se observa en las cepas silenciadas en paaT, que crecen menos en presencia de PAA porque su grado de detoxificación a través de la vía de biosíntesis de PenG es menor porque su eficiencia de producción de PenG está reducida debido al silenciamiento de *paaT*.

2.3. Nuevos datos sobre el transporte de isopenicilina N en *Penicillium chrysogenum*.

(New insights into the isopenicillin N transport in *Penicillium chrysogenum*. 2014. Metabolic Engineering.22:89-103).

La proteína PenM, según su análisis *in silico* es una proteína hidrofóbica que presenta dominios estructurales conservados característicos de proteínas transportadoras de membrana de la superfamilia MFS. La proteína PenM tiene 12 TMS ordenados en dos módulos de 6 TMS cada uno que delimitan una cámara central hidrofóbica para el transporte del sustrato. Esta proteína, además, presenta un sitio de unión a Pex19p que permitiría su inserción en la membrana peroxisomal. Esta potencial localización de PenM fue confirmada experimentalmente mediante la expresión heteróloga de la proteína fluorescente roja PenM-DsRed en células de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

El silenciamiento de *penM* inducido por la expresión del casete de silenciamiento portado por el plásmido p*penM*-RNAi y la consiguiente reducción de la dosis de PenM, provoca una reducción de la síntesis de PenG. Dicha reducción de los niveles de PenG tienen lugar tanto a nivel intracelular como extracelular. El efecto del silenciamiento del *penM* sobre la producción de IPN no es tan claro. Por otro lado, la sobreexpresión de *penM*, gracias a la expresión del casete de sobreexpresión portado por el plásmido pS*penM*, provoca un incremento de la producción, tanto de PenG como de IPN.

Según el análisis bioinformático, PenM es un transportador de tipo MFS y el estudio de su localización *in vivo* apunta a que está ubicado en la membrana peroxisomal. A la proteína PenM se le atribuye la participación en la importación de IPN desde el citoplasma hasta el lumen peroxisomal a través de la membrana peroxisomal.

2.3.1. Determinación de la proteína de *P. chrysogenum* con mayor homología a la proteína CefM de *A. chrysogenum* y del gen que la codifica. Caracterización *in silico* de *penM*/PenM.

El gen *cefM* de *A. chrysogenum* codifica un transportador peroxisomal de tipo MFS que estaría implicado en el transporte de PenN desde el lumen peroxisomal hacia el citosol a través de la membrana peroxisomal. Tomando la proteína CefM de *A. chrysogenum* como modelo, se hizo una búsqueda de proteínas significativamente homólogas a ella en el proteoma de *P. chrysogenum*, hallándose la proteína CAP 95819 (renombrada PenM), codificada por el gen Pc21g9220 (renombrado *penM*), como la más parecida a la proteína de referencia de *A. chrysogenum*. CefM y PenM muestran una identidad del 52 %, que no es tan alta como para asegurar que *cefM* y *penM* sean genes ortólogos funcionales.

El alineamiento de *penM* revela que este gen presenta homología con genes que codifican proteínas MFS en otros hongos. Además *penM* muestra varios dominios conservados que confirman que PenM es una proteína transportadora, perteneciente a la superfamilia MFS (Figura suplementaria 4: 4 A). Estos dominios conservados son los mismos que los que se describieron para *paaT* (dominios MFS [cd06174], 2_A_01_02 [TIGR00880], MFS_1 [pfam07690], efflux_Bcr_CflA [TIGR00710], PRK11102 [PRK11102] y AraJ [C0G2814]).

El análisis del perfil de hidrofobicidad de PenM muestra que esta proteína tiene 12 TMS altamente hidrofóbicos. Los 12 TMS predichos en PenM estarían distribuidos en dos bloques de 6 TMS, respondiendo a la organización 6 TMS/6 TMS típicamente característica y definitoria de las transportadores secundarios de tipo MFS (Figura suplementaria 4: 4 B, 4 C). En la proteína nativa los TMS estarían estructurados como α -hélices (Figura suplementaria 4: 4 D). La predicción tridimensional de PenM muestra las 12 α -hélices de PenM distribuidas en torno al canal central para el transporte del sustrato del transportador.

La proteína PenM no posee ninguna secuencia señal característica a parte de un sitio de unión a Pex19p, que determina la posibilidad de que esta proteína pueda ser insertada en la membrana peroxisomal. Según los datos arrojados por el análisis *in silico,* PenM es una proteína transportadora de tipo MFS, residente en la membrana peroxisomal de *P. chrysogenum*.

2.3.2. Silenciamiento de *penM* mediante siARNs y determinación del efecto del silenciamiento sobre la ruta de biosíntesis de penicilina a nivel transcripcional y de producción de antibióticos.

El plásmido p*penM*-RNAi para el silenciamiento de *PenM*, fue construido clonando un fragmento exónico de *penM* en el plásmido pJL43-RNAi. Una vez transformado el plásmido en protoplastos de *P. chrysogenum* y tras la selección de estos en medio mínimo selectivo (suplementado con fleomicina) varios clones elegidos al azar se analizaron mediante hibridación de *Southern*. El resultado de dicha hibridación mostró que los cinco clones analizados (SilM-11, SilM-35, SilM-57, SilM-73 y SilM-88) respondían al patrón de restricción esperado en caso de que el casete de silenciamiento de *penM*, se hubiera integrado en el genoma, es decir, que todos los clones analizados eran transformantes positivos.

En las muestras de fermentación en condiciones de producción de penicilinas, el análisis mediante RT-PCR semicuantitativa para la cuantificación del nivel de transcrito correspondiente a *penM* en cada cepa transformada, reveló que había una disminución efectiva del ARNm correspondiente a *PenM*, en comparación con la cepa parental, en cuatro de los transformantes: SilM11, SilM-73, SilM-88 y sobre todo en SilM35, para el que se registró una reducción de la expresión de *penM* de en torno al 87 %.

La producción de PenG, determinada mediante HPLC en las muestras de fermentación recogidas periódicamente, mostró que todas las cepas transformadas tenían una capacidad de producción de PenG reducida, en comparación con la cepa Wisconsin 54-1255. El caso del transformante SilM-35, aquel para el que se registró la mayor tasa de reducción de la transcripción de *penM*, resultó especialmente llamativo. En este transformante la reducción de la producción fue tan drástica que no se pudo detectar mediante HPLC, o sea que la producción de PenG fue virtualmente anulada en este transformante debido al silenciamiento del gen diana. En las cepas transformadas tampoco se estaba produciendo una acumulación intracelular de PenG, lo que podría haber explicado la reducción de la secreción de esta penicilina. Esto vendría a significar que el silenciamiento de *penM* afecta directamente a la síntesis de PenG, no a su secreción.

Otra de las razones que podrían explicar la drástica reducción de la capacidad para sintetizar PenG en los transformantes silenciados en *penM* y en concreto en el transformante SilM-35, sería la posible interrupción del gen *penDE* (que codifica la IAT) a causa del proceso de transformación o a causa de la pérdida de actividad de la enzima IAT en estos transformantes. La presencia de la subunidad catalítica de 29 KDa de la IAT se acreditó mediante inmunodetección con anticuerpos específicos en extractos proteicos crudos en todas las cepas transformantes. Adicionalmente, la actividad IAT en estos mismos extractos fue demostrada mediante un ensayo enzimático *in vitro*, sin que fueran apreciadas diferencias significativas en la capacidad para sintetizar PenG entre las cepas transformantes y la cepa parental de referencia. El resultado positivo de ambos ensayos daba a entender que en SilM-35 el gen *penDE* no estaba interrumpido y que la enzima IAT expresada a partir del gen tenía potencial para ser activa, ya que *in vitro* demostraba capacidad para formar PenG a partir PAA-CoA y 6-APA.

En las muestras de fermentación de los transformantes silenciados en *penM* también se determinó la producción de IPN mediante HPLC. En este caso no se pudo observar un efecto tan evidente del silenciamiento de *penM* sobre la producción de esta penicilina. Por ejemplo, a las 48 h de fermentación se midió una producción de IPN de 15.24 µg/ml por parte de la cepa Wisconsin 54-1255 y de 26.95 µg/ml en el caso de la cepa transformante SilM-35, lo que representa una producción superior en la cepa silenciada. Sin embrago a las 72 h las producciones de IPN registradas fueron 23.81 µg/ml para la cepa parental y 17.23 µg/ml para la cepa SilM-35, lo que representa una producción disminuida en la cepa silenciada.

2.3.3. Sobreexpresión del *penM* mediante el uso de un promotor de expresión fuerte y caracterización del efecto de la sobreexpresión sobre la ruta biosintética de PenG.

El plásmido para la sobreexpresión de *penM*, pS*penM*, se obtuvo clonando en el vector pIBRC43*Bg*/I la región codificante de *penM*, quedando esta bajo el control de un promotor de expresión fuerte, el P*gdh* de *A. nidulans*, y el terminador T*cyc1* de *S. cerevisiae*. El plásmido pS*penM*, junto con el plásmido pJL43, se transformó en protoplastos de la cepa Wisconsin 54-1255. Tras la transformación, varios clones resistentes a fleomicina se analizaron mediante una hibridación de *Southern* y se determinó que de los

nueve clones analizados, siete mostraban el perfil de restricción esperado para los transformantes positivos. De los siete transformantes positivos se eligieron cinco al azar (SbrM-111, SbrM-153, SbrM-172, SbrM-177 y SbrM-199) para continuar con el proceso experimental.

Tras su fermentación en condiciones de producción de penicilinas, mediante RT-PCR se determinó que todas las cepas transformadas con pS*penM* mostraban un cierto incremento del nivel de ARNm correspondiente a *penM* con respecto a la cepa de referencia Wisconsin 54-1255. La sobreexpresión de *penM* fue especialmente efectiva en la cepa SbrM-153. Mediante RT-PCR se determinó que el nivel de transcripción de *penM* en SbrM-153 triplicaba el nivel de transcripción del mismo gen en la cepa de referencia.

El efecto de la sobreexpresión de *penM* sobre la producción de compuestos betalactámicos se estudió fermentando las cepas transformadas en condiciones de producción de penicilina. La determinación de las concentraciones de PenG e IPN en las muestras de fermentación mediante HPLC, mostró que las cepas transformantes tienden a producir mayor cantidad de ambos compuestos que la cepa parental, apuntando a un incremento del flujo metabólico a través de la ruta debido a la sobreexpresión de *penM* y al incremento de la dosis de PenM.

2.3.4. Determinación de la localización in vivo de la proteína de fusión fluorescente roja PenM-DsRed.

Protoplastos de la cepa Wisconsin 54-1255 se transformaron con los plásmidos pPenM-DsRed y pEGFP-SKL (control de localización peroxisomal). La integración de los casetes para la expresión de la proteína híbrida fluorescente roja PenM-DsRed (codificada en el plásmido pPenM-DsRed) y para la proteína híbrida fluorescente verde dirigida a peroxisomas EGFP-SKL (codificada en el plásmido p43EGFP-SKL), se comprobó mediante sendas hibridaciones de *Southern*. Como resultado de la transformación se obtuvieron dos cepas dobles transformantes (TMRed-8 y TMRed-25), es decir, expresando simultáneamente las dos proteínas fluorescentes de interés. Ambas cepas se cultivaron en medio CCM y se tomaron muestras que se visualizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia. La fluorescencia verde debida a la proteína EGFP-SKL marca los peroxisomas como estructuras discretas de pequeño tamaño y redondeadas. La fluorescencia roja debida a la proteína PenM-DsRed marca exactamente las mismas estructuras, por lo que la superposición de ambas fluorescencias genera una señal fluorescente amarilla. Esta prueba demuestra que la proteína PenM se localiza en los peroxisomas en *P. chrysogenum*.

2.3.5. Ensayo de transporte de intermediarios.

En el transformante SilM-35 la reducción de la productividad de PenG podría deberse a una limitación de la importación de IPN hacia el peroxisoma o a un bloqueo de la secreción de PenG, ambos procesos a nivel de la membrana peroxisomal.

Puesto que PenM está localizada en la membrana peroxisomal y que su función tiene influencia sobre la ruta de biosíntesis de PenG, para determinar el posible sustrato transportado por PenM, se adaptó uno de los ensayos de transporte de intermediarios expuestos en García-Estrada y col. (2007). Para ello, la cepa parental y el transformante silenciado SilM-35 se fermentaron en medio DF suplementado con diferentes concentraciones de 6-APA. El 6-APA puede atravesar tanto la membrana plasmática como la membrana peroxisomal mediante difusión pasiva, por lo que mediante la adición de este compuesto al medio de

cultivo este estaría disponible para ser utilizado como sustrato por la IAT intraperoxisomal. Mediante este ensayo se comprobó que en la cepa parental la producción de PenG no variaba a pesar de la suplementación con 6-APA. En cambio, en el caso de la cepa SilM-35, cuya producción basal de PenG es ínfima en comparación con la de la cepa parental, la producción de PenG se incrementaba a la par que se incrementaba la concentración de 6-APA añadido al medio de fermentación. Esto significa que en el transformante SilM-35 el transporte de PenG desde el peroxisoma no está limitado, es decir que la proteína PenV no interviene en la exportación de PenG fuera del peroxisoma. Por tanto, lo más probable es que la proteína PenM participe en el transporte de IPN desde el citoplasma y a través de la membrana peroxisomal para dar suministro de sustrato a la IAT.

Este papel de PenM en la importación de IPN al peroxisoma se ajusta a los efectos fenotípicos observados en los transformantes silenciados y en los transformantes en los que *penM* se sobreexpresa. El silenciamiento de *penM* reduce la dosis de proteína PenM y por tanto limita el flujo de entrada de IPN en el peroxisoma, es decir que se reduce el sustrato disponible para la IAT, lo que determina la menor producción de PenG. Por el contrario, la sobreexpresión de *penM* aumentaría el número de unidades de PenM en la membrana peroxisomal, lo que permitiría aumentar el flujo de IPN hacia el interior del peroxisoma y aumentaría la producción de PenG gracias al incremento del sustrato disponible para la IAT en el interior del peroxisoma.

2.4. PenV, PaaT y PenM en el contexto de la red de transporte de la ruta de biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*.

Gracias al trabajo experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral, se han caracterizado algunos de los procesos de transporte implicados en la biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*.

Las etapas iniciales de la ruta de biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*, que son la formación del tripéptido lineal LLD-ACV y la penicilina hidrofílica IPN, transcurren vinculadas al citosol. Directamente relacionada con estas etapas iniciales de la ruta biosintética de PenG estaría la proteína PenV, la primera de las hipotéticas proteínas transportadoras descritas en este trabajo. PenV ha sido presentada como una presunta permeasa aminoacídica emplazada en la membrana vacuolar, cuya función sería suministrar cisteína y/o valina almacenadas en la vacuola a la ACVS citosólica para que esta pudiera producir LLD-ACV, el primer intermediario de la ruta de biosíntesis de PenG.

La etapa final de la biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum* transcurre vinculada a los peroxisomas, donde residen las enzimas IAT y Phl. Estas enzimas hacen posible la síntesis de PenG cuando la IAT añade a la IPN la cadena lateral PAA-CoA. Para que formación de PenG sea posible, la IPN, que es sintetizada en le citosol por la IPNS, ha de ser importada al lumen peroxisomal. La difusión pasiva de la IPN a través de la membrana del peroxisoma es poco eficiente por lo que la importación peroxisomal de esta penicilina estaría mediada por proteínas transportadoras. En el presente trabajo ha sido propuesto que la proteína PenM, un transportador de tipo MFS localizado en la membrana peroxisomal podría estar implicado en el flujo de la IPN hacia el interior del peroxisoma posibilitado su empleo por IAT para la síntesis de PenG. Para sintetizar PAA-CoA (que se incorpora como cadena lateral de la PenG), es también necesaria la importación de fenilacetato hacia el interior del peroxisoma. La proteína MFS PaaT, descrita y caracterizada en este trabajo, intervendría en la importación del PAA a través de la membrana

peroxisomal. Una vez en el interior del peroxisoma, el PAA sería procesado por la Phl a su forma activa PAA-CoA, que sería la versión del fenilacetato utilizable por la IAT para la síntesis del producto final antibiótico PenG (Figura 17).



Figura 17. La ruta de biosíntesis de PenG es una vía metabólica compartimentadas, es decir, que diferentes reacciones transcurren en diferentes compartimentos subcelulares. Para poder llevar a término la ruta biosintética PenG han de existir proteínas transportadoras que hagan pasar los intermediarios de un lado a otro de las membranas. En el dibujo se representa esquemáticamente una célula de *P. chrysogenum* donde se refleja la localización de cada reacción de la vía biosintética así como el emplazamiento de las proteínas transportadoras presuntamente implicadas en la red de transporte vinculada a esta vía metabólica. Para cada proteína transportadora en el dibujo se refleja el sustrato molecular transportado en cada caso, los compartimentos entre los que se produce tal proceso de transporte así como el sentido del proceso. Las proteínas descritas y caracterizadas en el presente trabajo se representan mediante corpúsculos de diferentes colores. PenV se representa mediante un corpúsculo de color amarillo localizado en la membrana vacuolar para la extracción de cisteína y/o valina de la vacuola. PaaT se representa como un corpúsculo de color azul situado en la membrana peroxisomal para la importación de PAA hacia el lumen peroxisomal. También en la membrana peroxisomal está representado el transportador PenM como un corpúsculo de color morado encargado de la importación de IPN desde el citoplasma hacia el interior del peroxisoma.

3

Consideraciones finales a los fenómenos de transporte en la ruta de biosíntesis de penicilina

En el trabajo experimental recogido en el presente documento se ha tratado de arrojar luz a uno de los aspectos quizá menos explorados y entendidos de la ruta de biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*, como lo es la compartimentación metabólica a la que está sometida esta vía del metabolismo secundario. La compartimentación metabólica es posible gracias a las membranas biológicas, bicapas lipídicas con un componente proteico y glucídico, que constituyen barreras de permeabilidad selectiva. Esta característica de impermeabilidad parcial es lo que permite mantener ambientes químicamente diferenciados a uno y otro lado de la membrana.

Desde el punto de vista evolutivo, la compartimentación metabólica se explica porque la presión de selección habría actuado favoreciendo aquellas reacciones enzimáticas más eficientes y la eficiencia de las reacciones depende enormemente de las características del microambiente en el que se desarrollan. Cada enzima tiene unas condiciones óptimas de actuación concretas, lo que significa que diferentes enzimas tienen diferentes eficiencias en el mismo microambiente. O lo que es lo mismo, un microambiente puede resultar adecuado para la actuación de una enzima, pero no tanto para otra enzima diferente.

La compartimentación metabólica requiere procesos de transporte a través de las membranas biológicas, ya que enzimas que intervienen en reacciones sucesivas de una vía pueden estar localizadas en compartimentos diferentes, separadas físicamente por una de estas membranas. Los sustratos, los cosustratos, los productos e incluso los cofactores de las reacciones enzimáticas han de atravesar estas membranas para dar continuidad al flujo metabólico a través de la ruta. El problema es que la gran mayoría de los compuestos no tienen la capacidad de difundir libremente a través de estas membranas. Para posibilitar el traslado de los compuestos para los que las membranas son impermeables, intervienen proteínas transmembranales con función transportadora. Las proteínas transportadoras, por tanto son imprescindibles en las rutas metabólicas compartimentadas, como lo es la ruta de biosíntesis de PenG.

Las reacciones para la producción de IPN (catalizada por la IPNS) y para la producción de PenG (en la que intervienen las enzimas IAT y Phl), que ocurren sucesivamente en la ruta de biosíntesis de PenG, escenifican la compartimentación que caracteriza a esta vía metabólica: la IPNS es una enzima citosólica mientras que la IAT y la Phl actúan en el interior de los peroxisomas y la membrana peroxisomal es la barrera fisiológica que se interpone entre ambas reacciones. La IPN producida por la IPNS en el citosol ha de atravesar la membrana del peroxisoma para poder ser empleada como sustrato por la IAT. De igual forma el PAA ha de pasar a través de la membrana del peroxisoma para ser activado a PAA-CoA intraperoxisomalmente, para poder ser utilizado también por la IAT. Además la PenG, el producto final de

la ruta, sintetizado en el interior de los peroxisomas, en un principio, ha de estar sometido a un proceso de exportación también a través de la membrana peroxisomal primero y a través de la membrana citoplásmica después, para llegar al medio extracelular. Los mecanismos de transporte de PAA, IPN y PenG a través de la membrana peroxisomal no han sido esclarecidos hasta ahora.

El transporte de PAA, IAT y PenG a través de la membrana peroxisomal no son los únicos procesos de transporte que intervienen en la ruta de biosíntesis de PenG. La membrana plasmática y la de la vacuola también soportan el tráfico de compuestos que intervienen en esta ruta.

La dificultad para estudiar los procesos de transporte molecular mediados por proteínas transportadoras radica en la naturaleza intrínseca de estas proteínas y en la dinámica del propio proceso de translocación. Las proteínas de membrana son marcadamente hidrofóbicas, lo que entorpece enormemente su purificación. Además la evaluación del proceso de transporte mediado por estas proteínas es difícil de llevar a cabo *in vitro*, debido a que su localización nativa en una membrana y limitando a un lado y a otro con ambientes químicamente distintos es imposible de reproducir en el laboratorio. Estos problemas que afectan a la caracterización de proteínas transportadoras a nivel estructural y funcional han entorpecido el desarrollo de estudios encaminados al descubrimiento de transportadores implicados en la ruta de biosíntesis de PenG.

Además, la escasez de estudios previos relativos a la búsqueda y caracterización de estos transportadores hace que el presente trabajo sea original pero a la vez también impone la desventaja de no poder contrastar los resultados obtenidos mediante este trabajo con otros, lo que sin duda contribuiría a enriquecer la discusión y las conclusiones obtenidas.

Mediante el presente trabajo, se han descrito tres proteínas transportadoras, a las que se denominó PenV, PaaT y PenM. Estas tres proteínas están en alguna forma vinculadas a la ruta de biosíntesis de PenG, puesto que la modulación de la expresión de los genes que las codifican (mediante silenciamiento o sobreexpresión) altera el perfil de producción de metabolitos relacionadas con la vía de producción de betalactamas en *P. chrysogenum*. El hallazgo de estas proteínas y su vinculación con la ruta de biosíntesis de betalactamas demuestra la importancia de las proteínas transportadoras en esta vía metabólica. Además, dos de las proteínas caracterizadas, PaaT y PenM, pertenecen a la superfamilia de transportadores secundarios MFS, apoyando la proposición hecha en publicaciones previas, en las que se afirmaba que los transportadores secundarios desempeñan un papel relevante en la movilización de compuestos betalactámicos durante la biosíntesis de PenG (van den Berg y col. 2008; Gidijala y col. 2009; Martín y col. 2010; Bartoszewska y col. 2011a). Esta implicación de transportadores de tipo MFS en la vía de biosíntesis de PenG reafirma la versatilidad funcional de este tipo de transportadores, caracterizados por su capacidad para transportar múltiples sustratos estructuralmente diversos, lo que permite la adaptación de la fisiología celular a diferentes condiciones.

Para la caracterización de las proteínas PenV, PaaT y PenM se han aplicado diferentes técnicas de biología molecular, incluyendo técnicas de ingeniería genética que posibilitan la intervención dirigida sobre el gen diana de interés en cada caso. Dos de las técnicas de ingeniería genética puestas en práctica para la caracterización de las proteínas PenV, PaaT y PenM fueron la sobreexpresión mediante el uso de un promotor de expresión fuerte y el silenciamiento por ARN de interferencia mediado por siARN. La técnica de sobreexpresión mediante el uso de promotores fuertes es una estrategia que ha sido empleada de

forma recurrente, que persigue el incremento del nivel de transcripción de un gen, y por tanto de la dosis proteica y de la actividad asociada a dicha proteína.

La técnica de silenciamiento inducido por siARN, es válida para la caracterización de la función de genes, pero quizás no tan ampliamente aplicada como la anterior. El objetivo de esta técnica es reducir la expresión de un gen diana a nivel post-transcripcional para, en último término, limitar la función de la proteína asociada. En este caso, la técnica de silenciamiento se aplicó como alternativa a la interrupción génica, una estrategia difícil de llevar a cabo en hongos filamentosos, entre otras razones, por la baja ta sa de recombinación homóloga que se da en estos organismos. En el presente trabajo, la técnica de silenciamiento resultó eficiente para la obtención de cepas modificadas genéticamente y con una manifestación fenotípica evidente del efecto del silenciamiento. Así la estrategia de silenciamiento fue validada para la caracterización funcional de genes, especialmente si eran obtenidos grados de silenciamiento elevados, siendo ejemplo de ello las cepas TAT-1 y SilM-35, fundamentalmente (con un grado de silenciamiento del gen *penV* de un 70 % y del gen *penM* de un 87 %, respectivamente). En estas cepas, la drástica reducción de los niveles de expresión de los genes diana se manifestó mediante marcados efectos fenotípicos que contribuyeron a la determinación de la función del gen analizado.

Por otro lado, el silenciamiento puede ser difícil de evaluar. No se tienen datos de que tasa de reducción del nivel de expresión del gen diana ha de alcanzarse para obtener un efecto fenotípico claro. Probablemente el porcentaje de reducción del nivel de transcripción necesario varíe de unos genes a otros, en función, por ejemplo, de lo vital de la función del gen silenciado para la célula. Además, tal y como se ha comprobado en el presente trabajo a veces no es posible establecer una relación estrictamente lineal entre el nivel de silenciamiento logrado y el grado del efecto fenotípico ocasionado por esta reducción de la expresión. Quizás en este caso concreto, en que se evalúan proteínas transportadoras, esta falta de linealidad en la relación causa-efecto podría deberse a la existencia de una redundancia funcional en el proceso de transporte evaluado. Es decir, que podrían existir proteínas transportadoras capaces de suplir de manera parcial en su función a la proteína transportadora analizada. Esto no sería extraño en el caso de los transportadores MFS, entre los que se da una amplia versatilidad para el transportados por diferentes proteínas transportadoras.

Los tres genes caracterizados en este trabajo se encuentran fuera del *cluster* de biosíntesis de penicilina de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. El *cluster* biosintético se localiza en el *supercontig* 21. El gen *penV* está en el *supercontig* 22 y los genes *paaT* y *penM*, aunque comparten *supercontig* con el *cluster* de biosíntesis se encuentran a 4.7 y 2.8 Mb, respectivamente. Como ya se ha mencionado en otros apartados, existen otros ejemplos de genes no incluidos en el *cluster* de biosíntesis de PenG, cuyo producto enzimático desempeña un papel crucial en la ruta biosintética, como por ejemplo la PPTasa (codificada por el gen *ppt*) o la Phl (codificada por el gen *phl*). El hecho de que genes emplazados fuera del *cluster* de biosíntesis influyan en la eficiencia productiva de la ruta podría constituir una señal de cómo a lo largo de la evolución se habría producido un reclutamiento de elementos para la optimización funcional de la ruta de biosíntesis de PenG en el organismo productor. En el caso de los transportadores MFS como los descritos en este trabajo, este reclutamiento sería un reflejo de la adaptabilidad fisiológica y funcional a las necesidades de la célula que permiten estos transportadores, gracias a su flexibilidad para adaptarse a transportar diferentes rangos de sustrato.



Capítulo 4 **Conclusiones**

Imagen portada Capítulo 4: Durante un proceso de selección de cepas transformantes derivadas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, aspecto de diferentes muestras fúngicas crecidas sobre medio mínimo selectivo, tras un periodo de incubación de 5 días a 28ºC. Se puede observar como las diferentes cepas muestran una capacidad diferencial de crecimiento en las condiciones mencionadas.

Compendio de conclusiones

1.1. Conclusiones experimentales (*penV*/PenV).

1

- El gen *penV*, situado en el *superconting* 22 del genoma de *P. chrysogenum* y por tanto fuera del *cluster* de biosíntesis de penicilinas, codifica una proteína de membrana hidrofóbica con 11 TMS organizados como α-hélices en la proteína nativa.
- La reducción del nivel de expresión de *penV* inducida por el mecanismo de ARNi afecta negativamente a la producción de ACV, IPN y PenG, tal y como demuestra el análisis de estos metabolitos en muestras de fermentación. Además la expresión de los genes biosintéticos se ve alterada debido al silenciamiento de *penV*.
- 3. La expresión de *penV* a partir de un promotor de expresión fuerte no modifica la producción de penicilina.
- 4. La proteína PenV se localiza en la membrana vacuolar, puesto que la proteína quimérica PenV-DsRed se sitúa en las mismas membranas intracelulares marcadas por el colorante lipofílico FM-4-64 que marca específicamente la membrana de estos orgánulos en células vivas.
- 5. El papel de la proteína PenV sería el de actuar como una permeasa aminoacídica que exportara desde la vacuola los sustratos aminoacídicos de ACVS, por lo que el silenciamiento de PenV y la consiguiente reducción de la actividad PenV, limitaría la disponibilidad de sustratos para ACVS causando la reducción de la síntesis de ACV en primera instancia y en consecuencia también la de IPN (sintetizada a partir de ACV) y PenG (producida a partir de IPN).

1.2. Conclusiones experimentales (paaT/PaaT).

- 6. El gen *paaT*, situado en el *superconting* 21 del genoma de *P. chrysogenum* pero fuera del *cluster* de biosíntesis de penicilinas, codifica una proteína de membrana hidrofóbica, perteneciente a la superfamilia MFS y con 12 TMS organizados en α-hélices en la proteína nativa.
- 7. El silenciamiento de *paaT* reduce la producción de PenG pero no la del intermediario IPN.
- 8. El incremento del nivel de transcripción de *paaT* al inducir su expresión a partir de un promotor de expresión fuerte provoca un incremento de la producción de PenG y un ligero descenso de la producción de IPN, probablemente debido al aumento del consumo de IPN para su conversión en PenG.
- 9. La proteína PaaT se localiza en los peroxisomas de *P. chrysogenum* como indica la colocalización de la proteína fluorescente roja PaaT-DsRed y la proteína fluorescente verde EGFP-SKL, de localización peroxisomal. Este hecho se manifiesta por la aparición de fluorescencia amarilla en los lugares de coincidencia entre ambas proteínas quiméricas, como resultado de esta co-localización.
- 10. La proteína PaaT, desde su emplazamiento en la membrana peroxisomal, interviene en el transporte de PAA hacia el interior del peroxisoma. Esto permite su influencia simultánea en la determinación de la tolerancia al PAA y en la conversión de IPN a PenG por su incorporación como cadena lateral hidrofóbica en su forma activada.

1.3. Conclusiones experimentales (*penM*/PenM).

- 11. El gen *penM*, situado en el *superconting* 21 del genoma de *P. chrysogenum* pero fuera del *cluster* de biosíntesis de penicilinas, codifica una proteína de membrana hidrofóbica, perteneciente a la superfamilia MFS y con 12 TMS organizados en α-hélices en la proteína nativa.
- 12. Altos niveles de silenciamiento del gen *penM*, y por tanto de reducción de la dosis de proteína PenM, consiguen una supresión casi total de la producción de PenG.
- 13. La sobreexpresión de *penM*, y por tanto el aumento de la dosis de proteína PenM, provoca un incremento del flujo metabólico global a través de la ruta biosintética lo que implica un incremento de la producción de PenG.
- La proteína PenM se localiza en los peroxisomas de *P. chrysogenum* puesto que la proteína fluorescente roja PaaT-DsRed y la proteína fluorescente verde EGFP-SKL, dirigida por defecto a los peroxisomas, se localizan en la misma estructura subcelular.
- 15. La proteína PenM participa en la importación de IPN a través de la membrana peroxisomal, ya que el silenciamiento de *penM* reduce la producción de PenG al limitar la disponibilidad de IPN para la IAT, mientras que su sobreexpresión aumenta la producción de PenG al incrementar la cantidad de IPN que penetra al peroxisoma para poder ser empleada por la IAT.

1.4. Conclusiones teóricas generales.

- 1. Las proteínas transportadoras, especialmente los MFS, desempeñan un papel crucial en la ruta de biosíntesis de PenG en *P. chrysogenum*, pues siendo PenV una permeasa para aminoácidos y PaaT y PenM dos transportadores MFS, la alteración del nivel de expresión de sus genes codificantes afecta ostensiblemente la producción de PenG.
- 2. La técnica de ARNi mediada por siRNA constituye una estrategia válida y eficaz para la caracterización funcional de genes cuando dicha estrategia provoca una reducción drástica del nivel de transcrito correspondiente al gen diana, un genotipo que podría ser considerado como similar al genotipo *"Knock-out"*.
- 3. Las proteínas transportadoras que resultan ser productos proteicos de genes emplazados fuera del *cluster* de biosíntesis de PenG, pueden ejercer efectos claros sobre la vía biosintética, al haber sido reclutados durante la evolución de la vía metabólica para incrementar la eficiencia productiva de la ruta biosintética.
- 4. Las proteínas MFS cuya función interfiere con la biosíntesis de penicilinas constituyen dianas moleculares, diferentes a los propios genes biosintéticos, para la obtención de cepas fúngicas "a la carta" con una capacidad productiva incrementada o adaptada a los requerimientos de la investigación.

Anexo

Época	Lugar	Acontecimientos
Edad antigua	Antigua Grecia e India	Usaban plantas y mohos para el tratamiento de infecciones, debido a que producían sustancias antibióticas pero no pudieron distinguir o destilar los componentes activos responsables de la cura.
Medicina tradicional	Serbia y Grecia	El pan enmohecido fue un tratamiento tradicional para heridas e infecciones
Tradición en Rusia	Rusia	Los campesinos usaban tierra del suelo como tratamiento para las heridas infectadas.
c. 150 a. C.	Sri Lanka	Los soldados del ejército del rey Dutugemunu (161 – 137) almacenaban tortas de aceite (un postre tradicional cingalés) durante largos periodos en el desván antes de alistarse en sus campañas para elaborar con ellos un emplasto de propiedades desinfectantes y cauterizantes para curar las heridas.
1640	Inglaterra	Se conservan registros de farmacia en los que aparece la idea de utilizar mohos como tratamiento, por ejemplo John Parkington, herborista del Rey, quien abogaba por el uso terapéutico de mohos en su libro de farmacología de 1640.
1870	Inglaterra	John Scott Burdon-Sanderson, quien comenzó su carrera en el St. Mary's Hospital de Londres entre 1852–1858, observó en 1870 que los fluidos de cultivos cubiertos con mohos no producían bacterias.
1871	Inglaterra	Joseph Lister, un cirujano inglés, padre de la antisepsia moderna, influido por los descubrimientos de Burdon- Sanderson, investiga y describe en 1871 que las muestras de orina contaminadas con moho no permitían el crecimiento de bacterias. También describió la acción antibacteriana sobre los tejidos humanos de lo que él llamó <i>Penicillium glaucum</i> .
1874	Inglaterra	William Roberts observó en 1874 que la contaminación por bacterias está generalmente ausente en cultivos del moho <i>Penicillium glaucum</i> .
1875	Inglaterra	John Tyndall, siguiendo los trabajos de Burdon-Sanderson expuso ante la <i>Royal Society</i> la acción antibacteriana del hongo <i>Penicillium</i> en 1875.
1877	Francia	Louis Pasteur y Jules Francois Joubert observaron en 1877 que los mohos del género <i>Penicillium</i> inhibían el crecimiento de cultivos de <i>Bacillus anthracis</i> (identificado como el bacilo del causante del ántrax dos años antes).
1887	Francia	Carl Garré llega en 1887 a conclusiones similares.
1895	Italia	Vincenzo Tiberio efectúa extractos del hongo <i>Penicillium</i> y los inyecta en animales con bacterias virulentas, con resultados inconcluyentes.
1897	Francia	Ernest Duchesne describió el antagonismo entre <i>Escherichia coli</i> y un moho del género <i>Penicillium,</i> así como la capacidad del mismo hongo para la cura de la fiebre tifoidea en animales. Sus resultados fueron ignorados por el Instituto Pasteur. Duchesne se aprovechaba de una práctica de los mozos de cuadra árabes, que guardaban las sillas de cuero de los caballos en lugares húmedos y oscuros para que sobre ella crecieran mohos, que curaban las heridas que la propia montura causaba a los animales.
1920	Bélgica	André Gratia y Sara Dath observaron la actividad bacteriolítica de <i>Penicillium</i> sobre el bacilo del ántrax.
1923	Costa Rica	El costarricense Clodomiro Picado Twight publicó sus trabajos sobre la acción inhibitoria de <i>Penicillium sp.</i> sobre el crecimiento de estafilococos y estreptococos.
1928	Inglaterra	Fleming advirtió un halo de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a un moho verdeazulado contaminante en una placa de cultivo de <i>Staphylococcus sp.</i>
1930	Inglaterra	Cecil George Paine, un patólogo de la Clínica Real de Sheffield, aplicó penicilina en un intento de tratar la psicosis pero sin éxito. Sin embargo si consiguió curar a cuatro pacientes de oftalmía neonatal, una infección gonocóccica que afecta a los bebés.
1938	Inglaterra	En Oxford, Howard Walter Florey organizó un equipo multidisciplinar y numeroso con numerosos, siendo notables entre ellos Ernst Boris Chain y Norman Heatley, para abordar la innovadora tarea de producir penicilina.
1941 -1943	Estados Unidos	En Peoría (Illinois): Moyer, Coghill y Raper del Laboratorio de Investigaciones Regional del Norte, del USDA (NRRL) desarrollan y optimizan un método para producir penicilina a escala industrial con cepas de <i>Penicillium</i> .
1941 -1944	Estados Unidos	Diversas compañías farmacéuticas colaborando con instituciones académicas y gubernamentales desarrollaron el método práctico de fermentación en tanque industrial para la producción de grandes cantidades de penicilina de grado farmacéutico.

Tabla Suplementaria 1. Cronología del aprovechamiento y el estudio de las propiedades antibióticas de los hongos

amarilla representan las regiones organizadas en β -lámina. Los segmentos TMS pronosticados por el perfil de hidrofobicidad y por la predicción topológica coinciden posicionalmente con las regiones que tendrían una organización en α -hélice según este esquema. Gráfico que representa la http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred]). Las marcas del margen superior marcan los segmentos con un grado de hidrofobicidad más elevado que constituirían los segmentos transmembranales de la proteína. C) Disposición topológica de la proteína PenV en la membrana que la alberga, mostrando los 11 TMS predichos por el perfil de hidrofobicidad (fuente SACS MEMSAT2: ucsf.edu/cgi-bin/memsat.py]) D) Esquema de la estructura secundaria de PenV (fuente PSIPRED: Protein Secondary Structure Prediction Server [http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/]). En el esquema, los cilindros morados representan las regiones de PenV que tendrían una organización en α-hélice en la proteína nativa, mientras que las flechas hidrofobicidad media a lo largo de secuencia aminoacídica de PenV (fuente TopPred 1.10: Topology prediction of membrane proteins los dominios conservados en la proteína PenV (fuente NCBI>Protein>Structure>Conserved Domain Search [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed]). B) Figura suplementaria 1: A) Esquema de la posición relativa de Transmembrane Prediction Page [<u>http://www.sacs.</u>1





Figura suplementaria 2: A) Esquema de la posición relativa de los dominios conservados en la proteína PaaT. Los dominios más significativos de PaaT (MFS [cd06174], 2_A_01_02 [TIGR00880], MFS_1 [pfam07690]) indican que esta proteína es un transportador de B) Gráfico que representa la hidrofobicidad media a lo largo de secuencia aminoacídica de PaaT (fuente TopPred 1.10: Topology prediction of membrane grado de hidrofobicidad más elevado que constituirían los segmentos transmembranales de la proteína. C) Disposición topológica de la <u>.gi-bin/memsat.pv]</u>). En (B) y (C) es evidente la posición del lazo hidrofílico (LH) que separaría los mitades N-terminal y C-terminal del MFS, igual que se observaban en el modelado tridimensional (Figura 23). D) Esquema de la estructura secundaria de PaaT (fuente PSIPRED: Protein Secondary Structure Prediction Server [http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/]). En el esquema, los cilindros morados representan las regiones de PaaT que lámina. Los segmentos TMS pronosticados por el perfil de hidrofobicidad y por la predicción topológica coinciden posicionalmente con las eur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred]). Las marcas del margen superior marcan los segmentos con un proteína PaaT en la membrana que la alberga, mostrando los 12 segmentos hidrofóbicos predichos (uno poco hidrofóbico) por el perfil tendrían una organización en lpha-hélice en la proteína nativa, mientras que las flechas amarilla representan las regiones organizadas en etabmed]). de hidrofobicidad (fuente SACS MEMSAT2: Transmembrane Prediction Page [<u>http://www.sacs.ucsf</u> http: tipo MFS (fuente NCBI>Protein>Structure>Conserved Domain Search regiones que tendrían una organización en α -hélice según este esquema. proteins [http://mobyle.n




Figura suplementaria 3: A) Esquema de la posición relativa de los dominios conservados en la proteína PenM. Los dominios más significativos de PaaT (MFS [cd06174], 2_A_01_02 [TIGR00880], MFS_1 [pfam07690]) indican que esta proteína es un transportador de tipo MFS (fuente NCBI>Protein>Structure>Conserved Domain Search [<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</u>]). B) Gráfico que representa la hidrofobicidad media a lo largo de secuencia aminoacídica de PenM (fuente TopPred 1.10: Topology prediction of ppred]). Las marcas del margen superior marcan los segmentos con un grado de hidrofobicidad más elevado que constituirían los segmentos transmembranales de la proteína. C) Disposición topológica de la proteína PenM en la membrana que la alberga, mostrando los 12 TMS predichos por el perfil de hidrofobicidad (fuente SACS MEMSAT2: Transmembrane Prediction Page [http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/memsat.py]). En (B) y (C) es evidente la posición del lazo hidrofilico (LH) que separaría los mitades Nt y C del MFS. D) Esquema de la estructura secundaria de PenM (fuente PSIPRED: ac.uk/psipred/]). En el esquema, los cilindros morados representan la regiones de PenM que tendrían una organización en α-hélice en la proteína nativa, mientras que las flechas amarilla representan las regiones organizadas en β -lámina. Los segmentos TMS pronosticados por el perfil de hidrofobicidad y por la predicción topológica coinciden posicionalmente con las regiones que tendrían una organización en α-hélice según este esquema. oin/portal.pv?# Protein Secondary Structure Prediction Server [<u>http://bioinf.cs.ucl.</u> membrane proteins [<u>http:</u>



	8080 8	800		8	000	000	19989999999999999999999999999999999999			
	ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତି ତ	0000		300	0000	ගම්ම	8 8 9 9 9			
	00000000000000000000000000000000000000	00000		38	0000	0000	00 00			
		80	300	0000	000	0000	609906888	10 121 121 121 121 121 121 121 121 121 1		
		88		800	0000	000	ecesses			
		000		300	0000	0000	600000000 CEH 000000000000000000000000000000000000	ALICONTRACTOR		
		000	8000	8	0000	000 COD	6605665533 ₆ 66056655336 5606665602	Transition of the second of t		
_		0000		300	0000	0000	88	инстранствое инстванствое и		
oxisoma	මීකතරගතා මී	800	90	8	8	800	800 600	10 20 10 20 10 10 20 10 20 10 20 10 20 10 20 10 20 10 20 10 20 10 20		
men per		909 909		0000	80	BOOD	cooo toplasma	Predict Concord Predict Concord Predic		
Lu	890099	0000		300	0000	000	Ci 🚳			
	8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	808		0000	8000	0000	60000000000000000000000000000000000000			
J		8					639399 90605030999 90605030999 90605030999 90605030999 90	D		

_

_

Bibliografía

_

Α

Aharonowitz, Y.; Cohen, G.; Martín, J.F. (1992). **Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution.** *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 461-495 doi:10.1146/annurev.mi.46.100192.002333. PMID:1444264.

Aksam, E.B.; Koek, A.; Kiel, J.A.; Jourdan, S.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. (2007). A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of Hansenula polymorpha cells. *Autophagy*. 3(2): 96-105 doi:3534 [pii]. PMID:17172804.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002). **Chapter 12: Peroxisomes.** *En* Molecular biology of the cell (Fourth edition). *Editores* Anonymous Garland Science, New York.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2007). Molecular biology of the cell. Fifth edition. Garland Science, London.

Albers-Schöenberg, G.; Arison, B.H.; Hensens, O.T.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Kaczka, E.A.; Rhodes, R.E.; Kahan, J.S.; Kahan, F.M. (1978). Structure and absolute configuration of thienamycin. J. Am. Chem. Soc. 100: 6491-6499.

Álvarez, E.; Cantoral, J.M.; Barredo, J.L.; Díez, B.; Martín, J.F. (1987). **Purification to homogeneity and characterization of** acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 31(11): 1675-1682. PMID:2829713.

Álvarez, E.; Meesschaert, B.; Montenegro, E.; Gutierrez, S.; Díez, B.; Barredo, J.L.; Martín, J.F. (1993). **The isopenicillin-N** acyltransferase of Penicillium chrysogenum has isopenicillin-N amidohydrolase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single penDE gene. *Eur. J. Biochem.* 215(2): 323-332. PMID:8344300.

Andrade, A.C.; Van Nistelrooy, J.G.; Peery, R.B.; Skatrud, P.L.; De Waard, M.A. (2000). The role of **ABC transporters from** *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol. Gen. Genet.* 263(6): 966-977. PMID:10954082.

André, B.; Hein, C.; Grenson, M.; Jauniaux, J.C. (1993). The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol. Gen. Genet.* 237(1-2): 17-25. PMID:8455553.

Aplin, R.T.; Baldwin, J.E.; Cole, S.C.; Sutherland, J.D.; Tobin, M.B. (1993a). On the production of alpha, beta-heterodimeric acyl-coenzyme A: isopenicillin N-acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. Studies using a recombinant source. *FEBS Lett* 319(1-2): 166-170. PMID:8384123.

Aplin, R.T.; Baldwin, J.E.; Roach, P.L.; Robinson, C.V.; Schofield, C.J. (1993b). **Investigations into the post-translational** modification and mechanism of isopenicillin N:acyl-CoA acyltransferase using electrospray mass spectrometry. *Biochem. J.* 294 (Pt 2): 357-363. PMID:8396910.

В

Backus, M.P. y Stauffer, J.F. (1955). The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycol.* 47: 429-463. PMID:21008340.

Baldwin, J.E.; Bird, J.W.; Field, R.A.; O'Callaghan, N.M.; Schofield, C.J. (1990). Isolation and partial characterization of ACV synthetase from *Cephalosporium acremonium* and *Streptomyces clavuligerus*. J. Antibiot. 43: 1055-1057.

Bañuelos, O.; Casqueiro, J.; Fierro, F.; Hijarrubia, M.J.; Gutierrez, S.; Martín, J.F. (1999). Characterization and lysine control of expression of the lys1 gene of Penicillium chrysogenum encoding homocitrate synthase. *Gene.* 226(1): 51-59. PMID:9889317.

Bañuelos, O.; Casqueiro, J.; Gutiérrez, S.; Riaño, J.; Martín, J.F. (2000). The specific transport system for lysine is fully inhibited by ammonium in *Penicillium chrysogenum*: an ammonium-insensitive system allows uptake in carbon-starved cells. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 77(1): 91-100. PMID:10696883.

Bañuelos, O.; Casqueiro, J.; Steidl, S.; Gutierrez, S.; Brakhage, A.; Martín, J.F. (2002). **Subcellular localization of the homocitrate synthase in** *Penicillium chrysogenum. Mol. Genet. Genomics.* 266(5): 711-719 doi:10.1007/s00438-001-0591-z [doi]. PMID:11810244.

Barcus, A.L.; Burdette, S.D.; Herchline, T.E. (2005). Intestinal invasion and disseminated disease associated with *Penicillium chrysogenum. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 4: 21 doi:10.1186/1476-0711-4-21. PMID:16371150.

Barredo, J.L.; Díez, B.; Álvarez, E.; Martín, J.F. (1989a). Large amplification of a **35-kb DNA fragment carrying two** penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 16(5-6): 453-459. PMID:2515004.

Barredo, J.L.; Cantoral, J.M.; Álvarez, E.; Díez, B.; Martín, J.F. (1989b). Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet.* 216(1): 91-98. PMID:2499766.

Barredo, J.L.; van Solingen, P.; Díez, B.; Álvarez, E.; Cantoral, J.M.; Kattevilder, A.; Smaal, E.B.; Groenen, M.A.; Veenstra, A.E.; Martín, J.F. (1989c). Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A: 6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum. Gene.* 83(2): 291-300. PMID:2555269.

Barreiro, C.; Martín, J.F.; García-Estrada, C. (2012). Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum. J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 105109 doi:10.1155/2012/105109 [doi]. PMID:22318718.

Bartnicki-García, S., (1973). **Fundamental aspects of hyphal morphogenesis.** *En* Microbial differentiation. *Editores* J.M. Ashworth y J.E. Smith. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. pp. 245-267.

Bartoszewska, M.; Opalinski, L.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. (2011a). **The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi.** *Biotechnol. Lett.* 33(10): 1921-1931 doi:10.1007/s10529-011-0664-y [doi]. PMID:21660569.

Bartoszewska, M.; Kiel, J.A.; Bovenberg, R.A.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. (2011b). Autophagy deficiency promotes beta-lactam production in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(4): 1413-1422 doi:10.1128/AEM.01531-10 [doi]. PMID:21169429.

Benko, P.V.; Wood, T.C.; Segel, I.H. (1969). Multiplicity and regulation of amino acid transport in *Penicillium chrysogenum*. Arch. Biochem. Biophys. 129(2): 498-508. PMID:5772963.

Berdy, J. (2005). **Bioactive microbial metabolites.** *J. Antibiot. (Tokyo).* 58(1): 1-26 doi:10.1038/ja.2005.1. PMID:15813176.

Bernard, F. y Andre, B. (2001). Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 41(2): 489-502. PMID:11489133.

Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J. (2001). **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature*. 409(6818): 363-366 doi:10.1038/35053110. PMID:11201747.

Böhm, J.; Hoff, B.; O'Gorman, C.M.; Wolfers, S.; Klix, V.; Binger, D.; Zadra, I.; Kürnsteiner, H.; Pöggeler, S.; Dyer, P.S.; Kück, U. (2013). Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(4): 1476-1481 doi:10.1073/pnas.1217943110; 10.1073/pnas.1217943110. PMID:23307807.

Bosch, F. y Rosich, L. (2008). The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology.* 82(3): 171-179 doi:10.1159/000149583; 10.1159/000149583. PMID:18679046.

Boudker, O. y Verdon, G. (2010). Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* 31(9): 418-426 doi:10.1016/j.tips.2010.06.004 [doi]. PMID:20655602.

Brakhage, A.A. (1997). **Molecular regulation of penicillin biosynthesis in** *Aspergillus* (*Emericella*) *nidulans. FEMS Microbiol. Lett.* 148(1): 1-10 doi:S0378-1097(96)00529-0 [pii]. PMID:9066103.

Brakhage, A.A. (1998). Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 547-585. PMID:9729600.

Brotzu, G. (1948). Ricerche su di un nuovo antibiotico, Lavoratorio dell'Instituto di Igiene di Cagliari. : 1-11.

Brown, L.A. y Baker, A. (2008). Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (review). *Mol. Membr. Biol.* 25(5): 363-375 doi:10.1080/09687680802130583; 10.1080/09687680802130583. PMID:18651315.

Bueno, G.A.yNozal, R.R. (2012). La penicilina en la España franquista: importación, intervención e industrialización. *EIDON. Revista de la Fundación de Ciencias de la Salud.* 38.

Burzlaff, N.I.; Rutledge, P.J.; Clifton, I.J.; Hensgens, C.M.; Pickford, M.; Adlington, R.M.; Roach, P.L.; Baldwin, J.E. (1999). The reaction cycle of isopenicillin N synthase observed by X-ray diffraction. *Nature*. 401(6754): 721-724 doi:10.1038/44400. PMID:10537113.

Byford, M.F.; Baldwin, J.E.; Shiau, C.Y.; Schofield, C.J. (1997). The Mechanism of ACV Synthetase. *Chem. Rev.* 97(7): 2631-2650. PMID:11851475.

С

Cardoza, R.E.; Moralejo, F.J.; Gutiérrez, S.; Casqueiro, J.; Fierro, F.; Martín, J.F. (1998). Characterization and nitrogensource regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Curr. Genet.* 34(1): 50-59. PMID:9683675.

Carr, L.G.; Skatrud, P.L.; Scheetz, M.E.,2nd; Queener, S.W.; Ingolia, T.D. (1986). Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum. Gene.* 48(2-3): 257-266. PMID:3104145.

Casqueiro, J.; Gutierrez, S.; Bañuelos, O.; Hijarrubia, M.J.; Martín, J.F. (1999). Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *J. Bacteriol.* 181(4): 1181-1188. PMID:9973344.

Catalanotto, C.; Azzalin, G.; Macino, G.; Cogoni, C. (2002). **Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in** *Neurospora. Genes Dev.* 16(7): 790-795 doi:10.1101/gad.222402. PMID:11937487.

Cavalier-Smith, T. (2006). Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361(1470): 969-1006 doi:10.1098/rstb.2006.1842. PMID:16754610.

Cavalier-Smith, T. (2010). Origin of the cell nucleus, mitosis and sex: roles of intracellular coevolution. *Biol. Direct.* 5: 7-6150-5-7 doi:10.1186/1745-6150-5-7; 10.1186/1745-6150-5-7. PMID:20132544.

Cerutti, H. y Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet*. 50(2): 81-99 doi:10.1007/s00294-006-0078-x. PMID:16691418.

Chain, E.; Florey, H.W.; Adelaide, M.B.; Gardner, A.D.; Heatley, N.G.; Jennings, M.A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A.G. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet*. 239(295): 226-228. PMID:8403666.

Cheong, H. y Klionsky, D.J. (2008). Dual role of Atg1 in regulation of autophagy-specific PAS assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*. 4(5): 724-726 doi:6375 [pii]. PMID:18552550.

Chicas, A.; Forrest, E.C.; Sepich, S.; Cogoni, C.; Macino, G. (2005). Small interfering RNAs that trigger posttranscriptional gene silencing are not required for the histone H3 Lys9 methylation necessary for transgenic tandem repeat stabilization in *Neurospora crassa. Mol. Cell. Biol.* 25(9): 3793-3801 doi:10.1128/MCB.25.9.3793-3801.2005. PMID:15831483.

Chu, Y.W.; Renno, D.; Saunders, G. (1997). Extracellular pH affects regulation of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 47(3): 250-254. PMID:9114516.

Coates, A.R. y Hu, Y. (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Br. J. Pharmacol.* 152(8): 1147-1154 doi:10.1038/sj.bjp.0707432. PMID:17704820.

Cogoni, C. y Macino, G. (1997). Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgeneinduced gene silencing in *Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(19): 10233-10238. PMID:9294193.

Cogoni, C. y Macino, G. (1999a). Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2(6): 657-662. PMID:10607623.

Cogoni, C. y Macino, G. (1999b). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science*. 286(5448): 2342-2344. PMID:10600745.

Cogoni, C. y Macino, G. (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10(6): 638-643. PMID:11088014.

Cohen, G.; Shiffman, D.; Mevarech, M.; Aharonowitz, Y. (1990). Microbial isopenicillin N synthase genes: structure, function, diversity and evolution. *Trends Biotechnol.* 8(4): 105-111. PMID:1366527.

Conti, E.; Stachelhaus, T.; Marahiel, M.A.; Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* 16(14): 4174-4183. PMID:9250661.

Coque, J.J.; Liras, P.; Laiz, L.; Martín, J.F. (1991). A gene encoding lysine 6-aminotransferase, which forms the beta-lactam precursor alpha-aminoadipic acid, is located in the cluster of cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans. J. Bacteriol.* 173(19): 6258-6264. PMID:1917857.

Coque, J.J.; Liras, P.; Martin, J.F. (1993). Genes for a beta-lactamase, a penicillin-binding protein and a transmembrane protein are clustered with the cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans. EMBO J.* 12(2): 631-639. PMID:8440253.

Coque, J.J.; de la Fuente, J.L.; Liras, P.; Martín, J.F. (1996). Overexpression of the *Nocardia lactamdurans* alphaaminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase in *Streptomyces lividans*. The purified multienzyme uses cystathionine and 6oxopiperidine 2-carboxylate as substrates for synthesis of the tripeptide. *Eur. J. Biochem.* 242(2): 264-270. PMID:8973642.

Cornelius, G. y Nakashima, H. (1987). Vacuoles play a decisive role in calcium homeostasis in *Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol.* 133: 2341-2347.

Corpas, F.J.; Barroso, J.B.; del Río, L.A. (2001). **Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal** molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6(4): 145-150 doi:S1360-1385(01)01898-2 [pii]. PMID:11286918.

Cramer, C.L.; Vaughn, L.E.; Davis, R.H. (1980). Basic amino acids and inorganic polyphosphates in *Neurospora crassa*: independent regulation of vacuolar pools. *J. Bacteriol.* 142(3): 945-952. PMID:6445898.

Cramer, C.L. y Davis, R.H. (1984). Polyphosphate-cation interaction in the amino acid-containing vacuole of *Neurospora crassa. J. Biol. Chem.* 259(8): 5152-5157. PMID:6232273.

D

Dalmay, T.; Hamilton, A.; Rudd, S.; Angell, S.; Baulcombe, D.C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell.* 101(5): 543-553. PMID:10850496.

Dang, Y.; Yang, Q.; Xue, Z.; Liu, Y. (2011). **RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications.** *Eukaryot. Cell.* 10(9): 1148-1155 doi:10.1128/EC.05109-11; 10.1128/EC.05109-11. PMID:21724934.

Davis, R.H. (1972). Metabolite distribution in cells. Science. 178(4063): 835-840. PMID:5085981.

de Duve, C. (1969a). Evolution of the peroxisome. Ann. N. Y. Acad. Sci. 168(2): 369-381. PMID:5270945.

de Duve, C. (1969b). The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 173(30): 71-83. PMID:4389648.

de Duve, C. (2007). The origin of eukaryotes: a reappraisal. Nat. Rev. Genet. 8(5): 395-403 doi:10.1038/nrg2071. PMID:17429433.

del Río, L.A.; Sandalio, L.M.; Palma, J.M.; Bueno, P.; Corpas, F.J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic. Biol. Med.* 13(5): 557-580. PMID:1334030.

Demain, A.L. (1957). Inhibition of penicillin formation by lysine. Arch. Biochem. Biophys. 67(1): 244-246 doi:0003-9861(57)90265-5 [pii]. PMID:13412140.

Demain, A.L. y Masurekar, P.S. (1974). Lysine inhibition of in vivo homocitrate synthesis in *Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol.* 82(1): 143-151. PMID:4853060.

Demain, A.L. (1983). A new era of exploitation of microbial metabolites. *Biochem. Soc. Symp.* 48: 117-132. PMID:6400479.

Demain, A.L. y Elander, R.P. (1999). The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75(1-2): 5-19. PMID:10422578.

Demirev, A.V.; Lee, C.H.; Jaishy, B.P.; Nam, D.H.; Ryu, D.D. (2006). Substrate specificity of nonribosomal peptide synthetase modules responsible for the biosynthesis of the oligopeptide moiety of cephabacin in *Lysobacter lactamgenus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 255(1): 121-128 doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00067.x. PMID:16436071.

Depreter, M.; Espeel, M.; Roels, F. (2003). Human peroxisomal disorders. *Microsc. Res. Tech.* 61(2): 203-223 doi:10.1002/jemt.10330 [doi]. PMID:12740827.

Dias, P.J.; Seret, M.L.; Goffeau, A.; Correia, I.S.; Baret, P.V. (2010). **Evolution of the 12-spanner drug:H+ antiporter DHA1** family in hemiascomycetous yeasts. *OMICS*. 14(6): 701-710 doi:10.1089/omi.2010.0104 [doi]. PMID:21114408.

Dias, P.J. y Sá-Correia, I. (2013). The drug:H(+) antiporters of family 2 (DHA2), siderophore transporters (ARN) and glutathione:H(+) antiporters (GEX) have a common evolutionary origin in hemiascomycete yeasts. *BMC Genomics.* 14: 901-2164-14-901 doi:10.1186/1471-2164-14-901 [doi]. PMID:24345006.

Díez, B.; Gutierrez, S.; Barredo, J.L.; van Solingen, P.; van der Voort, L.H.; Martín, J.F. (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* 265(27): 16358-16365. PMID:2129535.

Dillon, D. y Stadler, D. (1994). Spontaneous mutation at the mtr locus in *Neurospora*: the molecular spectrum in wild-type and a mutator strain. *Genetics*. 138(1): 61-74. PMID:8001794.

Doolittle, R.F.; Feng, D.F.; Tsang, S.; Cho, G.; Little, E. (1996). **Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock.** *Science*. 271(5248): 470-477. PMID:8560259.

Dürr, M.; Urech, K.; Boller, T.; Wiemkemn, A.; Schwencke, J.; Nagy, M. (1979). Sequestration of arginine by polyphophate in vacuoles of yeas *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 121: 169-175.

Dyer, P.S. y O'Gorman, C.M. (2011). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(6): 649-654 doi:10.1016/j.mib.2011.10.001; 10.1016/j.mib.2011.10.001. PMID:22032932.

Ε

Elander, R.P., (1983). **Strain improvement and preservation of betalactam producing microorganisms**. *En* Antibiotics. Handbook of experimental pharmacology. *Editores* A.L. Demain y N.A. Solomon. , Butterworths, Stoneham, Massachusetts, USA. pp. 97-146.

Elander, R.P. (2003). Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(5-6): 385-392 doi:10.1007/s00253-003-1274-y. PMID:12679848.

Erdmann, R. y Kunau, W.H. (1992). A genetic approach to the biogenesis of peroxisomes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochem. Funct.* 10(3): 167-174 doi:10.1002/cbf.290100306. PMID:1423897.

Eriksen, S.H.; Soderblom, T.B.; Jensen, B.; Olsen, J. (1998). **Uptake of phenylacetic acid by two strains of** *Penicillium chrysogenum. Biotechnol. Bioeng.* 60(3): 310-316 doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<310::AID-BIT6>3.0.C0;2-K [pii]. PMID:10099433.

Esmahan, C.; Álvarez, E.; Montenegro, E.; Martín, J.F. (1994). Catabolism of lysine in *Penicillium chrysogenum* leads to formation of 2-aminoadipic acid, a precursor of penicillin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6): 1705-1710. PMID:8031073.

Etchegaray, A.; Dieckmann, R.; Kennedy, J.; Turner, G.; von Döhren, H. (1997). **ACV synthetase: expression of amino acid activating domains of the** *Penicillium chrysogenum* **enzyme in** *Aspergillus nidulans. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237(1): 166-169. PMID:9266851.

Evers, M.E.; Trip, H.; van den Berg, M.A.; Bovenberg, R.A.; Driessen, A.J. (2004). **Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotics biosynthesis.** *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88: 111-135. PMID:15719554.

F

Fernández, F.J.; Cardoza, R.E.; Montenegro, E.; Velasco, J.; Gutiérrez, S.; Martín, J.F. (2003). **The isopenicillin N** acyltransferases of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* differ in their ability to maintain the 40-kDa alphabeta heterodimer in an undissociated form. *Eur,J. Biochem.* 270: 1958-1968.

Fernández-Cañón, J.M.; Reglero, A.; Martínez-Blanco, H.; Ferrero, M.A.; Luengo, J.M. (1989). **Phenylacetic acid transport** system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255: molecular specificity of its induction. *J. Antibiot. (Tokyo).* 42(9): 1410-1415. PMID:2507494.

Fierro, F.; Barredo, J.L.; Diez, B.; Gutierrez, S.; Fernandez, F.J.; Martin, J.F. (1995). **The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(13): 6200-6204. PMID:7597101.

Fierro, F.; García-Estrada, C.; Castillo, N.I.; Rodriguez, R.; Velasco-Conde, T.; Martín, J.F. (2006). **Transcriptional and bioinformatic analysis of the 56.8 kb DNA region amplified in tandem repeats containing the penicillin gene cluster in** *Penicillium chrysogenum. Fungal Genet. Biol.* 43(9): 618-629 doi:10.1016/j.fgb.2006.03.001. PMID:16713314.

Filipowicz, W.; Jaskiewicz, L.; Kolb, F.A.; Pillai, R.S. (2005). **Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15(3): 331-341 doi:10.1016/j.sbi.2005.05.006. PMID:15925505.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. (1998). **Potent and specific genetic interference by** double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669): 806-811 doi:10.1038/35888. PMID:9486653.

Fischer, E., (1897). **Plectacineae**. *En* Die naturlichlichen Pflanzenfamilien. *Editores* A. Engler y K. Prantl. Engelmann, Leipzig.

Fitzgerald, A.; Van Kan, J.A.; Plummer, K.M. (2004). Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genet. Biol.* 41(10): 963-971 doi:10.1016/j.fgb.2004.06.006. PMID:15341918.

Fleming, A. (1922). On a remakable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 93: 306-317.

Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* 10(8): 226-236. PMID:11545337.

Forsberg, H. y Ljungdahl, P.O. (2001). Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 40(2): 91-109. PMID:11680826.

Francisco, F.E. y Ruiz-Vázquez, R.M. (2013). Functional diversity of RNAi-associated sRNAs in fungi. Int. J. Mol. Sci. 14: 15348-15360.

Freire-Moran, L.; Aronsson, B.; Manz, C.; Gyssens, I.C.; So, A.D.; Monnet, D.L.; Cars, O.; ECDC-EMA Working Group. (2011). **Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria-Time to react is now.** *Drug Resist Updat*. 14(2): 118-124 doi:10.1016/j.drup.2011.02.003; 10.1016/j.drup.2011.02.003. PMID:21435939.

G

Gabaldón, T.; Snel, B.; van Zimmeren, F.; Hemrika, W.; Tabak, H.; Huynen, M.A. (2006). Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biol. Direct.* 1:8 doi:10.1186/1745-6150-1-8. PMID:16556314.

Gabaldón, T. (2010). **Peroxisome diversity and evolution**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365(1541): 765-773 doi:10.1098/rstb.2009.0240; 10.1098/rstb.2009.0240. PMID:20124343.

Galland, F.; le Goff, L.; Conrath, J.; Ridings, B. (2004). *Penicillium chrysogenum* endophthalmitis: a case report. J. Fr. Ophtalmol. 27(3): 264-266. PMID:15039628.

García-Estrada, C.; Vaca, I.; Lamas-Maceiras, M.; Martin, J.F. (2007). *In vivo* transport of the intermediates of the penicillin biosynthetic pathway in tailored strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76(1): 169-182 doi:10.1007/s00253-007-0999-4. PMID:17516062.

García-Estrada, C.; Vaca, I.; Fierro, F.; Sjollema, K.; Veenhuis, M.; Martín, J.F. (2008a). The unprocessed preprotein form IATC103S of the isopenicillin N acyltransferase is transported inside peroxisomes and regulates its self-processing. *Fungal Genet. Biol.* 45(6): 1043-1052 doi:10.1016/j.fgb.2008.03.005. PMID:18439860.

García-Estrada, C.; Ullán, R.V.; Velasco-Conde, T.; Godio, R.P.; Teijeira, F.; Vaca, I.; Feltrer, R.; Kosalková, K.; Mauriz, E.; Martín, J.F. (2008b). **Post-translational enzyme modification by the phosphopantetheinyl transferase is required for lysine and penicillin biosynthesis but not for roquefortine or fatty acid formation in** *Penicillium chrysogenum. Biochem. J.* 415(2): 317-324 doi:10.1042/BJ20080369; 10.1042/BJ20080369. PMID:18558918.

García-Estrada, C.; Vaca, I.; Ullán, R.V.; van den Berg, M.A.; Bovenberg, R.A.; Martín, J.F. (2009). **Molecular** characterization of a fungal gene paralogue of the penicillin *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum*. *BMC Microbiol*. 9: 104-2180-9-104 doi:10.1186/1471-2180-9-104; 10.1186/1471-2180-9-104. PMID:19470155.

García-Estrada, C.; Fierro, F.; Martín, J.F. (2010). **Evolution of funga betalactam biosynthesis gene cluster**. *En* Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. *Editores* A. Méndez-Villas. Formatex Research Center pp. 577-588.

Geiser, D.M.; Klich, M.A.; Frisvad, J.C.; Peterson, S.W.; Varga, J.; Samson, R.A. (2007). **The current status of species recognition** and **identification** in *Aspergillus. Stud. Mycol.* 59: 1-10 doi:10.3114/sim.2007.59.01; 10.3114/sim.2007.59.01. PMID:18490947.

Gidijala, L.; Kiel, J.A.; Douma, R.D.; Seifar, R.M.; van Gulik, W.M.; Bovenberg, R.A.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. (2009). **An engineered yeast efficiently secreting penicillin**. *PLoS One*. 4(12): e8317 doi:10.1371/journal.pone.0008317 [doi]. PMID:20016817.

Gidijala, L.; Kiel, J.A.; Bovenberg, R.A.; van der Klei, I.J.; van den Berg, M.A. (2010). **Biosynthesis of activ pharmaceuticals:** betalactam biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 27: 1-32.

Gilstring, C.F. y Ljungdahl, P.O. (2000). A method for determining the in vivo topology of yeast polytopic membrane proteins demonstrates that Gap1p fully integrates into the membrane independently of Shr3p. *J. Biol. Chem.* 275(40): 31488-31495 doi:10.1074/jbc.M005047200 [doi]. PMID:10903320.

Girzalsky, W.; Platta, H.W.; Erdmann, R. (2009). **Protein transport across the peroxisomal membrane**. *Biol. Chem.* 390(8): 745-751 doi:10.1515/BC.2009.104; 10.1515/BC.2009.104. PMID:19558328.

Gomord, V. y Faye, L. (1996). Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 165-181.

Gooday, G.W., (1995). **Cell membrane**. *En* The growing fungus. *Editores* N.A.R. Gow y G.M. Gadd. Chapman & Hall, Lodon. pp. 63-74.

Gouka, R.J.; van Hartingsveldt, W.; Bovenberg, R.A.; van den Hondel, C.A.; van Gorcom, R.F. (1991). **Cloning of the nitrate**nitrite reductase gene cluster of *Penicillium chrysogenum* and use of the *niaD* gene as a homologous selection marker. *J. Biotechnol.* 20(2): 189-199. PMID:1367546.

Griffith, J.K.; Baker, M.E.; Rouch, D.A.; Page, M.G.; Skurray, R.A.; Paulsen, I.T.; Chater, K.F.; Baldwin, S.A.; Henderson, P.J. (1992). **Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 4(4): 684-695. PMID:1419050.

Guarro, J.; Gené, J.; Stchigel, A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. 12: 454-500.

Guo, S. y Bhattacharjee, J.K. (2004). Posttranslational activation, site-directed mutation and phylogenetic analyses of the lysine biosynthesis enzymes alpha-aminoadipate reductase Lys1p (AAR) and the phosphopantetheinyl transferase Lys7p (PPTase) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 21(15): 1279-1288 doi:10.1002/yea.1179. PMID:15546125.

Gutiérrez, S.; Díez, B.; Álvarez, E.; Barredo, J.L.; Martín, J.F. (1991). Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol. Gen. Genet*. 225(1): 56-64. PMID:1900348.

Gutiérrez, S.; Velasco, J.; Marcos, A.T.; Fernández, F.J.; Fierro, F.; Barredo, J.L.; Díez, B.; Martín, J.F. (1997). **Expression of the** *cef***G gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in** *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48(5): 606-614. PMID:9421924.

Gutiérrez, S.; Fierro, F.; Casqueiro, J.; Martín, J.F. (1999). Gene organization and plasticity of the beta-lactam genes in different filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75(1-2): 81-94. PMID:10422582.

Н

Hall, J.A.; Fann, M.C.; Maloney, P.C. (1999). Altered substrate selectivity in a mutant of an intrahelical salt bridge in UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 274(10): 6148-6153. PMID:10037698.

Hall, J.A. y Maloney, P.C. (2001). Transmembrane segment 11 of UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*, is an alpha-helix that carries determinants of substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 276(27): 25107-25113 doi:10.1074/jbc.M102017200 [doi]. PMID:11349129.

Hamed, R.B.; Gómez-Castellanos, J.R.; Henry, L.; Ducho, C.; McDonough, M.A.; Schofield, C.J. (2013). **The enzymes of beta**lactam biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 30(1): 21-107 doi:10.1039/c2np20065a; 10.1039/c2np20065a. PMID:23135477.

Hammond, S.M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404(6775): 293-296 doi:10.1038/35005107. PMID:10749213.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. Nature. 418(6894): 244-251 doi:10.1038/418244a. PMID:12110901.

Harborth, J.; Elbashir, S.M.; Bechert, K.; Tuschl, T.; Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell. Sci.* 114(Pt 24): 4557-4565. PMID:11792820.

Harter, C. y Wieland, F. (1996). The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1286(2): 75-93. PMID:8652612.

Hashimoto, M.; Komori, T.; Kamiya, T. (1976). Nocardicin A and B, monocyclic beta-lactam antibiotics from Nocardia species. J. Am. Chem. Soc. 98: 3023-3025.

Hassan, K.A.; Brzoska, A.J.; Wilson, N.L.; Eijkelkamp, B.A.; Brown, M.H.; Paulsen, I.T. (2011). **Roles of DHA2 family** transporters in drug resistance and iron homeostasis in *Acinetobacter spp. J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20(2): 116-124 doi:10.1159/000325367 [doi]. PMID:21430390.

Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.* 95: 641-655.

Hawksworth, D.L. y Rossman, A.Y. (1997). Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology.* 87(9): 888-891 doi:10.1094/PHYTO.1997.87.9.888; 10.1094/PHYTO.1997.87.9.888. PMID:18945058.

Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432.

Henk, D.A.; Eagle, C.E.; Brown, K.; Van Den Berg, M.A.; Dyer, P.S.; Peterson, S.W.; Fisher, M.C. (2011). Speciation despite globally overlapping distributions in *Penicillium chrysogenum*: the population genetics of Alexander Fleming's lucky fungus. *Mol. Ecol.* 20(20): 4288-4301 doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05244.x; 10.1111/j.1365-294X.2011.05244.x. PMID:21951491.

Henriksen, C.M.; Christensen, L.H.; Nielsen, J.; Villadsen, J. (1996). Growth energetics and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* 45(2): 149-164. PMID:9147448.

Hibbett, D.S.; Ohman, A.; Kirk, P.M. (2009). **Fungal ecology catches fire**. *New Phytol.* 184(2): 279-282 doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03042.x; 10.1111/j.1469-8137.2009.03042.x. PMID:19796334.

Hildebrand, P.W.; Rother, K.; Goede, A.; Preissner, R.; Frömmel, C. (2005). **Molecular packing and packing defects in** helical membrane proteins. *Biophys. J.* 88(3): 1970-1977 doi:S0006-3495(05)73259-8 [pii]. PMID:15556989.

Hillenga, D.J.; Versantvoort, H.J.; Driessen, A.J.; Konings, W.N. (1994). **Structural and functional properties of plasma** membranes from the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum. Eur. J. Biochem.* 224(2): 581-587. PMID:7925375.

Hillenga, D.J.; Versantvoort, H.; van der Molen, S.; Driessen, A.; Konings, W.N. (1995). *Penicillium chrysogenum* takes up the penicillin G precursor phenylacetic acid by passive diffusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7): 2589-2595. PMID:7925375.

Hillenga, D.J. (1999). Transport processes in penicillin biosynthesis (PhD). Univesity of Groningen.

Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 407-450 doi:10.1146/annurev.micro.59.031805.133833. PMID:16153175.

Hirai, T.; Heymann, J.A.; Maloney, P.C.; Subramaniam, S. (2003). Structural model for 12-helix transporters belonging to the major facilitator superfamily. *J. Bacteriol.* 185(5): 1712-1718. PMID:12591890.

Hodking, D.C. (1949). The X-ray analysis of the structure of penicillin. Adv. Sci. 6(22): 85-89. PMID:18134678.

Hoff, B.; Pöggeler, S.; Kück, U. (2008). **Eighty years after its discovery, Fleming's** *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. *Eukaryot. Cell.* 7(3): 465-470 doi:10.1128/EC.00430-07; 10.1128/EC.00430-07. PMID:18223118.

Hong, H.; Szabo, G.; Tamm, L.K. (2006). Electrostatic couplings in OmpA ion-channel gating suggest a mechanism for pore opening. *Nat. Chem. Biol.* 2(11): 627-635 doi:nchembio827 [pii]. PMID:17041590.

Horak, J. (1986). Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 864(3-4): 223-256. PMID:2947629.

Houbraken, J.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens. IMA Fungus.* 2(1): 87-95 doi:10.5598/imafungus.2011.02.01.12; 10.5598/imafungus.2011.02.01.12. PMID:22679592.

Houbraken, J. y Samson, R.A. (2011). **Phylogeny of** *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.* 70(1): 1-51 doi:10.3114/sim.2011.70.01; 10.3114/sim.2011.70.01. PMID:22308045.

Houbraken, J.; Frisvad, J.C.; Seifert, K.A.; Overy, D.P.; Tuthill, D.M.; Valdez, J.G.; Samson, R.A. (2012). New penicillinproducing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia*. 29: 78-100 doi:10.3767/003158512X660571; 10.3767/003158512X660571. PMID:23606767.

Howarth, T.T.; Brown, A.G.; King, T.J. (1976). Clavulanic acid, a novel β-lactam isolated form *Streptomyces clavuligerus*. X-ray crystal structure analysis. J. Chem. Soc. , Chem. Commun. 7: 266-267.

Hunter, D.R. y Segel, I.H. (1971). Acidic and basic amino acid transport systems of *Penicillium chrysogenum*. Arch. Biochem. Biophys. 144(1): 168-183. PMID:5117525.

Hvorup, R.N. y Saier, M.H.,Jr. (2002). Sequence similarity between the channel-forming domains of voltage-gated ion channel proteins and the C-terminal domains of secondary carriers of the major facilitator superfamily. *Microbiology*. 148(Pt 12): 3760-3762. PMID:12480878.

Ι

Imazaki, A.; Tanaka, A.; Harimoto, Y.; Yamamoto, M.; Akimitsu, K.; Park, P.; Tsuge, T. (2010). **Contribution of peroxisomes to secondary metabolism and pathogenicity in the fungal plant pathogen** *Alternaria alternata. Eukaryot. Cell.* 9(5): 682-694 doi:10.1128/EC.00369-09 [doi]. PMID:20348386.

Indge, K.J. (1968). Polyphosphates of the yeast cell vacuole. J. Gen. Microbiol. 51(3): 447-455. PMID:5657265.

Ishida, K.; Hung, T.V.; Liou, K.; Lee, H.C.; Shin, C.H.; Sohng, J.K. (2006). Characterization of *pbpA* and *pbp2* encoding penicillin-binding proteins located on the downstream of clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Lett.* 28(6): 409-417 doi:10.1007/s10529-005-6071-5. PMID:16614907.

I

Jack, D.L.; Paulsen, I.T.; Saier, M.H. (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology*. 146 (Pt 8)(Pt 8): 1797-1814. PMID:10931886.

Jami, M.S.; Barreiro, C.; García-Estrada, C.; Martín, J.F. (2010a). **Proteome analysis of the penicillin producer** *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol. Cell. Proteomics.* 9(6): 1182-1198 doi:10.1074/mcp.M900327-MCP200. PMID:20154335.

Jami, M.S.; García-Estrada, C.; Barreiro, C.; Cuadrado, A.A.; Salehi-Najafabadi, Z.; Martín, J.F. (2010b). **The** *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. *Mol. Cell. Proteomics*. 9(12): 2729-2744 doi:10.1074/mcp.M110.001412. PMID:20823121.

Jedd, G. (2011). Fungal evo-devo: organelles and multicellular complexity. *Trends Cell Biol.* 21(1): 12-19 doi:10.1016/j.tcb.2010.09.001 [doi]. PMID:20888233.

Jüsten, P.; Paul, G.C.; Nienow, A.W.; Thomas, C.R. (1998). **Dependence of** *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.* 59(6): 762-775 doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980920)59:6<762::AID-BIT13>3.0.CO;2-7 [pii]. PMID:10099397.

К

Kadotani, N.; Nakayashiki, H.; Tosa, Y.; Mayama, S. (2003). **RNA silencing in the phytopathogenic fungus** *Magnaporthe oryzae. Mol. Plant Microbe Interact.* 16(9): 769-776 doi:10.1094/MPMI.2003.16.9.769. PMID:12971600.

Kakinuma, Y.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. (1981). **Properties of H+-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of** *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 256(21): 10859-10863. PMID:6116710.

Kallow, W.; Kennedy, J.; Arezi, B.; Turner, G.; von Döhren, H. (2000). **Thioesterase domain of delta-(l-alpha-Aminoadipyl)-l-cysteinyl-d-valine synthetase: alteration of stereospecificity by site-directed mutagenesis.** *J. Mol. Biol.* 297(2): 395-408 doi:10.1006/jmbi.2000.3566. PMID:10715209.

Kamada, Y.; Sekito, T.; Ohsumi, Y. (2004). Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279: 73-84. PMID:14560952.

Kane, P.M. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H+-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(1): 177-191 doi:10.1128/MMBR.70.1.177-191.2006. PMID:16524922.

Katz, D.; Goldstein, D.; Rosenberger, R.F. (1972). Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *J. Bacteriol.* 109(3): 1097-1100. PMID:4551743.

Keating, T.A.; Marshall, C.G.; Walsh, C.T.; Keating, A.E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* 9(7): 522-526 doi:10.1038/nsb810. PMID:12055621.

Kern, B.A.; Hendlin, D.; Inamine, E. (1980). L-lysine epsilon-aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans. Antimicrob. Agents Chemother.* 17(4): 679-685. PMID:6772093.

Kiel, J.A.; van der Klei, I.J.; van den Berg, M.A.; Bovenberg, R.A.; Veenhuis, M. (2005). **Overproduction of a single protein**, **Pc-Pex11p**, **results in 2-fold enhanced penicillin production by** *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* 42(2): 154-164 doi:10.1016/j.fgb.2004.10.010. PMID:15670713.

Kiel, J.A.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. (2006). **PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant.** *Traffic*. 7(10): 1291-1303 doi:TRA479 [pii]. PMID:16978390.

Kiel, J.A.; van den Berg, M.A.; Fusetti, F.; Poolman, B.; Bovenberg, R.A.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. (2009). **Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing** *Penicillium chrysogenum* **cells**. *Funct. Integr. Genomics.* 9(2): 167-184 doi:10.1007/s10142-009-0110-6; 10.1007/s10142-009-0110-6. PMID:19156454.

Kitamoto, K.; Yoshizawa, K.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 170(6): 2683-2686. PMID:3131304.

Kleijn, R.J.; Liu, F.; van Winden, W.A.; van Gulik, W.M.; Ras, C.; Heijnen, J.J. (2007). **Cytosolic NADPH metabolism in penicillin-G producing and non-producing chemostat cultures of** *Penicillium chrysogenum. Metab. Eng.* 9(1): 112-123 doi:S1096-7176(06)00082-6 [pii]. PMID:17008114.

Kleinkauf, H. y von Dohren, H. (1990). Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* 192(1): 1-15. PMID:2205497.

Kleinkauf, H. y Von Döhren, H. (1996). **A nonribosomal system of peptide biosynthesis.** *Eur. J. Biochem.* 236(2): 335-351. PMID:8612601.

Klionsky, D.J.; Herman, P.K.; Emr, S.D. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54(3): 266-292. PMID:2215422.

Koetsier, M.J.; Jekel, P.A.; van den Berg, M.A.; Bovenberg, R.A.; Janssen, D.B. (2009). **Characterization of a phenylacetate-CoA ligase from** *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* 417(2): 467-476 doi:10.1042/BJ20081257. PMID:18834333.

Koetsier, M.J.; Gombert, A.K.; Fekken, S.; Bovenberg, R.A.; van den Berg, M.A.; Kiel, J.A.; Jekel, P.A.; Janssen, D.B.; Pronk, J.T.; van der Klei, I.J.; Daran, J.M. (2010). **The** *Penicillium chrysogenum aclA* gene encodes a broad-substrate-specificity **acyl-coenzyme A ligase involved in activation of adipic acid, a side-chain precursor for cephem antibiotics.** *Fungal Genet. Biol.* 47(1): 33-42 doi:10.1016/j.fgb.2009.10.003; 10.1016/j.fgb.2009.10.003. PMID:19833221.

Kosalková, K.; Rodríguez-Sáiz, M.; Barredo, J.L.; Martín, J.F. (2007). Binding of the PTA1 transcriptional activator to the divergent promoter region of the first two genes of the penicillin pathway in different *Penicillium* species. *Curr. Genet.* 52(5-6): 229-237 doi:10.1007/s00294-007-0157-7 [doi]. PMID:17924108.

Kosalková, K.; García-Estrada, C.; Ullán, R.V.; Godio, R.P.; Feltrer, R.; Teijeira, F.; Mauriz, E.; Martín, J.F. (2009). **The global** regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum. Biochimie.* 91(2): 214-225 doi:10.1016/j.biochi.2008.09.004; 10.1016/j.biochi.2008.09.004. PMID:18952140.

Krämer, R. (1996). Analysis and modeling of substrate uptake and product release by prokaryotic and eukaryotic cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 54: 31-74. PMID:8623614.

Kubicek-Pranz, E.M. y Kubicek, C.P. (1991). **Production and biosynthesis of aminoacids by fungy.** *En* Handbook of applied mycology, fungal biotechnology. *Editores* D. Arora K.; R.P. Elander; K.G. Mukerji., New York. pp. 313-356.

Kuhn, P.J.; Trinci, A.P.J.; Jung, M.J.; Goosey, M.W.; Copping, L.G. (1990). Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Springer Berlin Verlag, Heidelberg.

L

Lai, H.Y.; Tam, M.F.; Chou, H.; Lee, S.S.; Tai, H.Y.; Shen, H.D. (2004). Molecular and structural analysis of immunoglobulin E-binding epitopes of Pen ch 13, an alkaline serine protease major allergen from *Penicillium chrysogenum*. *Clin. Exp. Allergy*. 34(12): 1926-1933 doi:10.1111/j.1365-2222.2004.02115.x. PMID:15663570.

Lamas-Maceiras, M.; Vaca, I.; Rodríguez, E.; Casqueiro, J.; Martín, J.F. (2006). Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an aryl-capping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. *Biochem. J.* 395(1): 147-155 doi:10.1042/BJ20051599. PMID:16321143.

Landan, G.; Cohen, G.; Aharonowitz, Y.; Shuali, Y.; Graur, D.; Shiffman, D. (1990). Evolution of isopenicillin N synthase genes may have involved horizontal gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 7: 399-406.

Law, C.J.; Yang, Q.; Soudant, C.; Maloney, P.C.; Wang, D.N. (2007). Kinetic evidence is consistent with the rocker-switch mechanism of membrane transport by GlpT. *Biochemistry*. 46(43): 12190-12197 doi:10.1021/bi701383g [doi]. PMID:17915951.

Law, C.J.; Maloney, P.C.; Wang, D.N. (2008a). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 289-305 doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093329 [doi]. PMID:18537473.

Law, C.J.; Almqvist, J.; Bernstein, A.; Goetz, R.M.; Huang, Y.; Soudant, C.; Laaksonen, A.; Hovmöller, S.; Wang, D.N. (2008b). Salt-bridge dynamics control substrate-induced conformational change in the membrane transporter GlpT. *J. Mol. Biol.* 378(4): 828-839 doi:10.1016/j.jmb.2008.03.029 [doi]. PMID:18395745.

Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.; Wertheim, H.F.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A.D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A.Q.; Qamar, F.N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z.A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G.D.; Brown, E.D.; Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 13(12): 1057-1098 doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9; 10.1016/S1473-3099(13)70318-9. PMID:24252483.

Lazarow, P.B. y Fujiki, Y. (1985). **Biogenesis of peroxisomes.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 489-530 doi:10.1146/annurev.cb.01.110185.002421. PMID:3916321.

Ledingham, J.G.G. y Warrell, D.A. (2000). Concise Oxford Textbook of Medicine. Oxford University press, Oxford.

Lee, D.W.; Millimaki, R.; Aramayo, R. (2010). **QIP, a component of the vegetative RNA silencing pathway, is essential for meiosis and suppresses meiotic silencing in** *Neurospora crassa. Genetics.* 186(1): 127-133 doi:10.1534/genetics.110.118422; 10.1534/genetics.110.118422. PMID:20592262.

Lein, J., (1986). **The Panlabs Penicillium strain improvement program**. *En* Overproduction of microbial metabolites. *Editores* Z. Vanek y Z. Hostalek., Butterworths, Stoneham, Massachusetts, USA. pp. 105-140.

Leitao, A.L.; Enguita, F.J.; Martĺn, J.F.; Santos Oliveira, J.F. (2001). Effect of exogenous lysine on the expression of early cephamycin C biosynthetic genes and antibiotic production in *Nocardia lactamdurans* MA4213. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(5-6): 670-675. PMID:11601612.

Lendenfeld, T.; Ghali, D.; Wolschek, M.; Kubicek-Pranz, E.M.; Kubicek, C.P. (1993). Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. The amino acid precursors are derived from the vacuole. *J. Biol. Chem.* 268(1): 665-671. PMID:8416970.

Leskiw, B.K.; Aharonowitz, Y.; Mevarech, M.; Wolfe, S.; Vining, L.C.; Westlake, D.W.; Jensen, S.E. (1988). Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene*. 62(2): 187-196. PMID:3130293.

Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12(5): 371-387 doi:10.1038/nrd3975; 10.1038/nrd3975. PMID:23629505.

Liras, P. (1999). Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. Cephamycins produced by actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75(1-2): 109-124. PMID:10422584.

Liras, P. y Martín, J.F. (2006). Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int. Microbiol.* 9(1): 9-19. PMID:16636985.

Liu, H.; Cottrell, T.R.; Pierini, L.M.; Goldman, W.E.; Doering, T.L. (2002). **RNA interference in the pathogenic fungus** *Cryptococcus neoformans. Genetics.* 160(2): 463-470. PMID:11861553.

Liu, X.H.; Lu, J.P.; Lin, F.C. (2007). Autophagy during conidiation, conidial germination and turgor generation in *Magnaporthe grisea*. *Autophagy*. 3(5): 472-473 doi:4339 [pii]. PMID:17495517.

Lolkema, J.S. y Slotboom, D.J. (2003). **Classification of 29 families of secondary transport proteins into a single structural class using hydropathy profile analysis.** *J. Mol. Biol.* 327(5): 901-909 doi:S0022283603002146 [pii]. PMID:12662917.

Lolkema, J.S. y Slotboom, D.J. (2008). The major amino acid transporter superfamily has a similar core structure as Na+galactose and Na+-leucine transporters. *Mol. Membr. Biol.* 25(6-7): 567-570 doi:10.1080/09687680802541177 [doi]. PMID:19031293.

López-Nieto, M.J.; Ramos, F.R.; Luengo, J.M.; Martín, J.F. (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of aaminoadipyl-cysteinyl-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 343-351.

López-Brea, M. y Alarcón-Cavero, T. (2001). **Penicilinas.** *En* Anitibióticos. Criterios de uso racional y guía práctica terapéutica. *Editores* Doyma. pp. 163.

Luengo, J.M.; Revilla, G.; López, M.J.; Villanueva, J.R.; Martín, J.F. (1980). Inhibition and repression of homocitrate synthase by lysine in *Penicillium chrysogenum. J. Bacteriol.* 144(3): 869-876. PMID:6777369.

Luengo, J.M. (1995). Enzymatic synthesis of hydrophobic penicillins. J. Antibiot. (Tokyo). 48(11): 1195-1212. PMID:8557558.

М

Ma, C. y Subramani, S. (2009). **Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis.** *IUBMB Life.* 61(7): 713-722 doi:10.1002/iub.196 [doi]. PMID:19455563.

Ma, J.B.; Yuan, Y.R.; Meister, G.; Pei, Y.; Tuschl, T.; Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. 434(7033): 666-670 doi:nature03514 [pii]. PMID:15800629.

MacCabe, A.P.; van Liempt, H.; Palissa, H.; Unkles, S.E.; Riach, M.B.; Pfeifer, E.; von Dohren, H.; Kinghorn, J.R. (1991). Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of the *acvA* gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 266(19): 12646-12654. PMID:2061333.

Madduri, K.; Stuttard, C.; Vining, L.C. (1991). Cloning and location of a gene governing lysine epsilon-aminotransferase, an enzyme initiating beta-lactam biosynthesis in *Streptomyces spp. J. Bacteriol.* 173(3): 985-988. PMID:1991735.

Magasanik, B. y Kaiser, C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 290(1-2): 1-18. PMID:12062797.

Maggio-Hall, L.A.; Wilson, R.A.; Keller, N.P. (2005). Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in planta. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18(8): 783-793 doi:10.1094/MPMI-18-0783 [doi]. PMID:16134890.

Maiti, M.; Lee, H.C.; Liu, Y. (2007). QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes Dev.* 21(5): 590-600 doi:gad.1497607 [pii]. PMID:17311884.

Managadze, D.; Würtz, C.; Wiese, S.; Meyer, H.E.; Niehaus, G.; Erdmann, R.; Warscheid, B.; Rottensteiner, H. (2010). **A** proteomic approach towards the identification of the matrix protein content of the two types of microbodies in *Neurospora crassa*. *Proteomics*. 10(18): 3222-3234 doi:10.1002/pmic.201000095 [doi]. PMID:20707002.

Marahiel, M.A.; Stachelhaus, T.; Mootz, H.D. (1997). **Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis.** *Chem. Rev.* 97(7): 2651-2674 doi:cr960029e [pii]. PMID:11851476.

Martín, J.F. y Liras, P. (1989). Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 39: 153-187. PMID:2510473.

Martín, J.F. y Gutiérrez, S. (1995). Genes for beta-lactam antibiotic biosynthesis. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 67(2): 181-200. PMID:7771766.

Martín, J.F. (2000). Alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetases in beta-lactam producing organisms. From Abraham's discoveries to novel concepts of non-ribosomal peptide synthesis. J. Antibiot. (Tokyo). 53(10): 1008-1021. PMID:11132945.

Martín, J.F.; Gutiérrez, S.; Aparicio, J.F. (2000). **Secondary metabolites.** *En* Encyclopedia of Microbiology, 2nd edition. *Editores* J. Lederberg. Academic Press, San Diego, California. pp. 213-236.

Martín, J.F.; Ullán, R.V.; García-Estrada, C. (2010). **Regulation and compartmentalization of beta-lactam biosynthesis.** *Microb. Biotechnol.* 3(3): 285-299 doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00123.x; 10.1111/j.1751-7915.2009.00123.x. PMID:21255328.

Martín, J.F.; Ullán, R.V.; García-Estrada, C. (2012). Role of peroxisomes in the biosynthesis and secretion of beta-lactams and other secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39(3): 367-382 doi:10.1007/s10295-011-1063-z; 10.1007/s10295-011-1063-z. PMID:22160272.

Martin, W. (2010). **Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365(1541): 847-855 doi:10.1098/rstb.2009.0252 [doi]. PMID:20124349.

Martín-Valmaseda, E.; Campoy, S.; Naranjo, L.; Casqueiro, J.; Martín, J.F. (2005). Lysine is catabolized to 2-aminoadipic acid in *Penicillium chrysogenum* by an omega-aminotransferase and to saccharopine by a lysine 2-ketoglutarate reductase. Characterization of the omega-aminotransferase. *Mol. Genet. Genomics.* 274(3): 272-282 doi:10.1007/s00438-005-0018-3 [doi]. PMID:16049680.

McNew, J.A. y Goodman, J.M. (1994). An oligomeric protein is imported in peroxisomes *in vivo*. J. Cell. Biol. 127: 1245-1257.

Meijer, W.H.; van der Klei, I.J.; Veenhuis, M.; Kiel, J.A. (2007). **ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes.** *Autophagy*. 3(2): 106-116 doi:3595 [pii]. PMID:17204848.

Meijer, W.H.; Gidijala, L.; Fekken, S.; Kiel, J.A.; van den Berg, M.A.; Lascaris, R.; Bovenberg, R.A.; van der Klei, I.J. (2010). **Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in** *Penicillium chrysogenum. Appl. Environ. Microbiol.* 76(17): 5702-5709 doi:10.1128/AEM.02327-09. PMID:20601503.

Minuth, W.; Tudzynski, P.; Esser, K. (1982). Extrachromosomal genestics of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*. 25: 4-40.

Monti, D.; Carrea, G.; Riva, S.; Baldaro, E.; Frare, G. (2000). Characterization of an industrial biocatalyst: immobilized glutaryl-7-ACA acylase. *Biotechnol. Bioeng.* 70(2): 239-244. PMID:10972935.

Mouyna, I.; Henry, C.; Doering, T.L.; Latge, J.P. (2004). Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237(2): 317-324 doi:10.1016/j.femsle.2004.06.048. PMID:15321679.

Müller, W.H.; van der Krift, T.P.; Krouwer, A.J.; Wosten, H.A.; van der Voort, L.H.; Smaal, E.B.; Verkleij, A.J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10(2): 489-495. PMID:1899377.

Müller, W.H.; Bovenberg, R.A.; Groothuis, M.H.; Kattevilder, F.; Smaal, E.B.; Van der Voort, L.H.; Verkleij, A.J. (1992). **Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1116(2): 210-213. PMID:1581347.

Ν

Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(7): 458-467 doi:10.1038/nrm2708 [doi]. PMID:19491929.

Nakayashiki, H. (2005). RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett.* 579(26): 5950-5957 doi:10.1016/j.febslet.2005.08.016. PMID:16137680.

Naranjo, L.; Lamas-Maceiras, M.; Ullán, R.V.; Campoy, S.; Teijeira, F.; Casqueiro, J.; Martín, J.F. (2005). **Characterization of** the *oat1* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an omega-aminotransferase: induction by L-lysine, L-ornithine and L-arginine and repression by ammonium. *Mol. Genet. Genomics.* 274(3): 283-294 doi:10.1007/s00438-005-0019-2 [doi]. PMID:16163487.

Nasution, U.; van Gulik, W.M.; Ras, C.; Proell, A.; Heijnen, J.J. (2008). A metabolome study of the steady-state relation between central metabolism, amino acid biosynthesis and penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Metab. Eng.* 10(1): 10-23 doi:S1096-7176(07)00043-2 [pii]. PMID:17905623.

Newbert, R.W.; Barton, B.; Greaves, P.; Harper, J.; Turner, G. (1997). Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19(1): 18-27. PMID:9281849.

Neyfakh, A.A. (2002). Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol. Microbiol.* 44(5): 1123-1130. PMID:12068801.

Nijland, J.G.; Ebbendorf, B.; Woszczynska, M.; Boer, R.; Bovenberg, R.A.; Driessen, A.J. (2010). Nonlinear biosynthetic gene cluster dose effect on penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(21): 7109-7115 doi:10.1128/AEM.01702-10; 10.1128/AEM.01702-10. PMID:20851974.

Novikoff, A.B. y Shin, W.Y. (1964). The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. J. Microsc. 3: 187-206.

Novina, C.D. y Sharp, P.A. (2004). The RNAi revolution. Nature. 430(6996): 161-164 doi:10.1038/430161a [doi]. PMID:15241403.

Nuesch, J.; Heim, J.; Treichler, H.J. (1987). The biosynthesis of sulfur-containing beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 51-75 doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.000411 [doi]. PMID:3120640.

0

Oaks, A. y Bidwell, R.G. (1970). Compartmentation of intermediary metabolites. Annu. Rev. Plant. Physiol. 21: 43-66.

O'Brien, H.E.; Parrent, J.L.; Jackson, J.A.; Moncalvo, J.M.; Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9): 5544-5550 doi:10.1128/AEM.71.9.5544-5550.2005. PMID:16151147.

Ohsumi, Y. y Anraku, Y. (1981). Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 256(5): 2079-2082. PMID:6450764.

Opalinski, L.; Kiel, J.A.; Homan, T.G.; Veenhuis, M.; van der Klei, I.J. (2010). *Penicillium chrysogenum* Pex14/17p--a novel component of the peroxisomal membrane that is important for penicillin production. *FEBS J.* 277(15): 3203-3218 doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07726.x [doi]. PMID:20597979.

Opalinski, L.; Bartoszewska, M.; Fekken, S.; Liu, H.; de Boer, R.; van der Klei, I.; Veenhuis, M.; Kiel, J.A. (2012). **De novo peroxisome biogenesis in** *Penicillium chrysogenum* **is not dependent on the Pex11 family members or Pex16.** *PLoS One.* 7(4): e35490 doi:10.1371/journal.pone.0035490 [doi]. PMID:22536392.

Ozcengiz, G. y Demain, A.L. (2013). Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnol. Adv.* 31(2): 287-311 doi:10.1016/j.biotechadv.2012.12.001; 10.1016/j.biotechadv.2012.12.001. PMID:23228980.

Р

Palmieri, L.; Rottensteiner, H.; Girzalsky, W.; Scarcia, P.; Palmieri, F.; Erdmann, R. (2001). **Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter.** *EMBO J.* 20(18): 5049-5059 doi:10.1093/emboj/20.18.5049 [doi]. PMID:11566870.

Pao, S.S.; Paulsen, I.T.; Saier, M.H.,Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(1): 1-34. PMID:9529885.

Paul, G.C.; Kent, C.A.; Thomas, C.R. (1993). Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 42(1): 11-23 doi:10.1002/bit.260420103. PMID:18609642.

Paul, G.C. y Thomas, C.R. (1996). A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum. Biotechnol. Bioeng.* 51(5): 558-572 doi:2-B. PMID:18629820.

Paulsen, I.T.; Brown, M.H.; Skurray, R.A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60(4): 575-608. PMID:8987357.

Paulsen, I.T.; Sliwinski, M.K.; Saier, M.H.Jr. (1998). Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.* 277(3): 573-592 doi:S0022-2836(98)91609-6 [pii]. PMID:9533881.

Paulsen, I.T.; Chen, J.; Nelson, K.E.; Saier, M.H.,Jr. (2001). Comparative genomics of microbial drug efflux systems. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3(2): 145-150. PMID:11321566.

Paulsen, I.T. y Lewis, K. (2001). Microbial multidrug efflux: introduction. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3(2): 143-144. PMID:11321565.

Paulsen, I.T. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(5): 446-451. PMID:14572535.

Peberdy, J.F. (1987). *Penicillium* and *Acremonium*. Biotechnology Handbooks. Springer, New York.

Pelham, H.R. (1996). The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct. Funct.* 21(5): 413-419. PMID:9118249.

Peñalva, M.A.; Moya, A.; Dopazo, J.; Ramón, D. (1990). Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *Proc. Biol. Sci.* 241(1302): 164-169 doi:10.1098/rspb.1990.0081 [doi]. PMID:1979440.

Pérez-Llarena, F.J.; Rodríguez-García, A.; Enguita, F.J.; Martín, J.F.; Liras, P. (1998). **The** *pcd* gene encoding piperideine-6carboxylate dehydrogenase involved in biosynthesis of alpha-aminoadipic acid is located in the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus. J. Bacteriol.* 180(17): 4753-4756. PMID:9721323.

Pitt, J.I. (1980). The genus *Penicillium* and its telomporhic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London Academic Press.

Pitt, J.I.; Samson, S.M.; Frisvad, J.C. (2000). List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. *En* Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. *Editores* R.A. Samson y J.L. Pitt. Harwood Academic Publishers, New York, USA. pp. 9-49.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage. Springer.

Pöggeler, S.; O'Gorman, C.M.; Hoff, B.; Kück, U. (2011). Molecular organization of the mating-type loci in the homothallic Ascomycete *Eupenicillium crustaceum*. *Fungal Biol.* 115(7): 615-624 doi:10.1016/j.funbio.2011.03.003; 10.1016/j.funbio.2011.03.003. PMID:21724167.

Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (1999). Microbiología. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.

Punt, P.J.; Kramer, C.; Kuyvenhoven, A.; Pouwels, P.H.; van den Hondel, C.A. (1992). An upstream activating sequence from the *Aspergillus nidulans gpdA* gene. *Gene.* 120(1): 67-73. PMID:1398125.

Putman, M.; van Veen, H.W.; Konings, W.N. (2000a). **Molecular properties of bacterial multidrug transporters.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 672-693. PMID:11104814.

Putman, M.; Van Veen, H.W.; Degener, J.E.; Konings, W.N. (2000b). Antibiotic resistance: era of the multidrug pump. *Mol. Microbiol.* 36(3): 772-773 doi:mmi1871 [pii]. PMID:10844664.

R

Raguzzi, F.; Lesuisse, E.; Crichton, R.R. (1988). Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 231(1): 253-258 doi:0014-5793(88)80742-7 [pii]. PMID:3282922.

Ramón, D.; Carramolino, L.; Patino, C.; Sanchez, F.; Peñalva, M.A. (1987). **Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the beta-lactam ring in** *Aspergillus nidulans. Gene.* 57(2-3): 171-181. PMID:3319778.

Ramos, F.R.; López-Nieto, M.J.; Martín, J.F. (1985). Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob. Agents Chemother*. 27(3): 380-387. PMID:3922296.

Raper, K.B.; Alexander, D.F.; Coghill, R.D. (1944). Penicillin: II. Natural variation and penicillin Production in *Penicillium notatum* and allied species. *J. Bacteriol.* 48(6): 639-659. PMID:16560880.

Raper, K.B. y Thom, C. (1949). A manual of the Penicillia., Baltimore.

Reddy, V.S.; Shlykov, M.A.; Castillo, R.; Sun, E.I.; Saier, M.H.,Jr. (2012). **The major facilitator superfamily (MFS) revisited.** *FEBS J.* 279(11): 2022-2035 doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08588.x; 10.1111/j.1742-4658.2012.08588.x. PMID:22458847.

Righelato, R.C.; Trinci, A.P.; Pirt, S.J.; Peat, A. (1968). The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. J. Gen. Microbiol. 50(3): 399-412. PMID:5652074.

Roach, P.L.; Clifton, I.J.; Fulop, V.; Harlos, K.; Barton, G.J.; Hajdu, J.; Andersson, I.; Schofield, C.J.; Baldwin, J.E. (1995). **Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes.** *Nature*. 375(6533): 700-704 doi:10.1038/375700a0. PMID:7791906.

Roach, P.L.; Clifton, I.J.; Hensgens, C.M.; Shibata, N.; Schofield, C.J.; Hajdu, J.; Baldwin, J.E. (1997). Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature*. 387(6635): 827-830 doi:10.1038/42990. PMID:9194566.

Rodríguez-Saiz, M.; Barredo, J.L.; Moreno, M.A.; Fernández-Cañón, J.M.; Peñalva, M.A.; Díez, B. (2001). **Reduced function** of a phenylacetate-oxidizing cytochrome p450 caused strong genetic improvement in early phylogeny of penicillinproducing strains. *J. Bacteriol.* 183(19): 5465-5471 doi:10.1128/JB.183.19.5465-5471.2001. PMID:11544206.

Rodríguez-Saiz, M.; Diez, B.; Barredo, J.L. (2005). Why did the Fleming strain fail in penicillin industry? *Fungal Genet. Biol.* 42(5): 464-470 doi:10.1016/j.fgb.2005.01.014. PMID:15809010.

Rokem, J.S.; Lantz, A.E.; Nielsen, J. (2007). Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 24(6): 1262-1287 doi:10.1039/b617765b. PMID:18033579.

Romano, N. y Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6(22): 3343-3353. PMID:1484489.

Romero, J.; Martín, J.F.; Liras, P.; Demain, A.L.; Rius, N. (1997). Partial purification, characterization and nitrogen regulation of the lysine epsilon-aminotransferase of *Streptomyces clavuligerus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18(4): 241-246. PMID:9172431.

Russnak, R.; Konczal, D.; McIntire, S.L. (2001). A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 276(26): 23849-23857 doi:10.1074/jbc.M008028200 [doi]. PMID:11274162.

Russo, P.; Li, W.Z.; Hampsey, D.M.; Zaret, K.S.; Sherman, F. (1991). Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of cyc1 mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 10(3): 563-571. PMID:1848175.

S

Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. J. Theor. Biol. 14(3): 255-274. PMID:11541392.

Saier, M.H.,Jr; Beatty, J.T.; Goffeau, A.; Harley, K.T.; Heijne, W.H.; Huang, S.C.; Jack, D.L.; Jahn, P.S.; Lew, K.; Liu, J.; Pao, S.S.; Paulsen, I.T.; Tseng, T.T.; Virk, P.S. (1999). The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2): 257-279. PMID:10943556.

Saier, M.H.Jr. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(2): 354-411. PMID:10839820.

Saier, M.H.Jr; Tran, C.V.; Barabote, R.D. (2006). **TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information**. *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue): D181-6 doi:34/suppl_1/D181 [pii]. PMID:16381841.

Saikia, S. y Scott, B. (2009). Functional analysis and subcellular localization of two geranylgeranyl diphosphate synthases from *Penicillium paxilli*. *Mol. Genet. Genomics.* 282(3): 257-271 doi:10.1007/s00438-009-0463-5 [doi]. PMID:19529962.

Samson, R.A.; Hadlok, R.; Stolk, A.C. (1977). A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 43(2): 169-175. PMID:413477.

Samson, R.A.; Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J.C.; Andersen, B. (2010). Laboratory manual series 2: Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrech, The Netherlands.

Samson, S.M.; Belagaje, R.; Blankenship, D.T.; Chapman, J.L.; Perry, D.; Skatrud, P.L.; VanFrank, R.M.; Abraham, E.P.; Baldwin, J.E.; Queener, S.W. (1985). Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature*. 318(6042): 191-194. PMID:3903520.

Santesmases, M.J., (2010). **Distributing penicillin: the clinic, the hero and industrial production in Spain, 1943-1952.** *En* Perspectives on Twentieth-century pharmaceuticals. *Editores* V. Quirke y J. Slinn. Peter Lang, Oxford. pp. 91-118.

Sato, T.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. (1984). Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolarmembrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. *J. Biol. Chem.* 259(18): 11505-11508. PMID:6088546.

Schlumbohm, W.; Stein, T.; Ullrich, C.; Vater, J.; Krause, M.; Marahiel, M.A.; Kruft, V.; Wittmann-Liebold, B. (1991). **An** active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. *J. Biol. Chem.* 266(34): 23135-23141. PMID:1744112.

Schlüter, A.; Fourcade, S.; Ripp, R.; Mandel, J.L.; Poch, O.; Pujol, A. (2006). **The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection.** *Mol. Biol. Evol.* 23(4): 838-845 doi:msj103 [pii]. PMID:16452116.

Schofield, C.J.; Baldwin, J.E.; Byford, M.F.; Clifton, I.; Hajdu, J.; Hensgens, C.; Roach, P. (1997). Proteins of the penicillin biosynthesis pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7(6): 857-864. PMID:9434907.

Scott, J.; Untereiner, W.A.; Wong, B.; Straus, N.A.; Malloch, D. (2004). Genotypic variation in *Penicillium chysogenum* from indoor environments. *Mycologia*. 96(5): 1095-1105. PMID:21148929.

Seaston, A.; Inkson, C.; Eddy, A.A. (1973). The absorption of protons with specific amino acids and carbohydrates by yeast. *Biochem. J.* 134(4): 1031-1043. PMID:4587071.

Sekito, T.; Fujiki, Y.; Ohsumi, Y.; Kakinuma, Y. (2008). Novel families of vacuolar amino acid transporters. *IUBMB Life*. 60(8): 519-525 doi:10.1002/iub.92. PMID:18459165.

Shabalina, S.A. y Koonin, E.V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* 23(10): 578-587 doi:10.1016/j.tree.2008.06.005 [doi]. PMID:18715673.

Shen, H.D.; Chou, H.; Tam, M.F.; Chang, C.Y.; Lai, H.Y.; Wang, S.R. (2003). Molecular and immunological characterization of **Pen ch 18, the vacuolar serine protease major allergen of** *Penicillium chrysogenum. Allergy.* 58(10): 993-1002. PMID:14510716.

Shimazu, M.; Sekito, T.; Akiyama, K.; Ohsumi, Y.; Kakinuma, Y. (2005). A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 280(6): 4851-4857 doi:M412617200 [pii]. PMID:15572352.

Shoji, J.Y.; Arioka, M.; Kitamoto, K. (2006a). Possible involvement of pleiomorphic vacuolar networks in nutrient recycling in filamentous fungi. *Autophagy*. 2(3): 226-227. PMID:16874107.

Shoji, J.Y.; Arioka, M.; Kitamoto, K. (2006b). Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell.* 5(2): 411-421 doi:10.1128/EC.5.2.411-421.2006. PMID:16467481.

Siewers, V.; Chen, X.; Huang, L.; Zhang, J.; Nielsen, J. (2009). Heterologous production of non-ribosomal peptide LLD-ACV in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 11(6): 391-397 doi:10.1016/j.ymben.2009.08.002 [doi]. PMID:19686863.

Sigl, C.; Haas, H.; Specht, T.; Pfaller, K.; Kurnsteiner, H.; Zadra, I. (2011). Among developmental regulators, StuA but not BrlA is essential for penicillin V production in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(3): 972-982 doi:10.1128/AEM.01557-10; 10.1128/AEM.01557-10. PMID:21148688.

Skye, G.E. y Segel, I.H. (1970). Independent regulation of cysteine and cystine transport in *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 138(1): 306-318. PMID:5446343.

Smidak, R.; Jopcik, M.; Kralovicová, M.; Gajdosikova, J.; Kormanec, J.; Timko, J.; Turna, J. (2010). **Core promoters of the penicillin biosynthesis genes and quantitative RT-PCR analysis of these genes in high and low production strain of** *Penicillium chrysogenum. Folia Microbiol. (Praha).* 55(2): 126-132 doi:10.1007/s12223-010-0019-4; 10.1007/s12223-010-0019-4. PMID:20490754.

Smith, D.J.; Bull, J.H.; Edwards, J.; Turner, G. (1989). Amplification of the isopenicillin N synthetase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol. Gen. Genet*. 216(2-3): 492-497. PMID:2501652.

Smith, D.J.; Burnham, M.K.; Edwards, J.; Earl, A.J.; Turner, G. (1990a). **Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from** *Penicillum chrysogenum. Biotechnology (N. Y).* 8(1): 39-41. PMID:1368505.

Smith, D.J.; Burnham, M.K.; Bull, J.H.; Hodgson, J.E.; Ward, J.M.; Browne, P.; Brown, J.; Barton, B.; Earl, A.J.; Turner, G. (1990b). **Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes**. *EMBO J.* 9(3): 741-747. PMID:2107074.

Sohn, Y.S.; Nam, D.H.; Ryu, D.D. (2001). Biosynthetic pathway of cephabacins in *Lysobacter lactangenus*: molecular and biochemical characterization of the upstream region of the gene clusters for engineering of novel antibiotics. *Metab. Eng.* 3(4): 380-392 doi:10.1006/mben.2001.0200 [doi]. PMID:11676571.

Sophianopoulou, V. y Diallinas, G. (1995). Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 16(1): 53-75 doi:0168-6445(94)00091-C [pii]. PMID:7888172.

Spellberg, B.; Powers, J.H.; Brass, E.P.; Miller, L.G.; Edwards, J.E., Jr. (2004). Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.* 38(9): 1279-1286 doi:10.1086/420937 [doi]. PMID:15127341.

Spröte, P. y Brakhage, A.A. (2007). **The light-dependent regulator velvet A of** *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 188(1): 69-79 doi:10.1007/s00203-007-0224-y [doi]. PMID:17375284.

Stadler, D.R. (1966). Genetic control of the uptake of amino acids in *Neurospora*. *Genetics*. 54(2): 677-685. PMID:5968647.

Stanier, R.Y.; Villanueva, J.R.; Guerrero, R. (1996). The microbial world. Reverté, Barcelona.

Stebbing, N. (1974). Precursor pools and endogenous control of enzyme synthesis and activity in biosynthetic pathways. *Bacteriol. Rev.* 38(1): 1-28. PMID:4596576.

Stein, T.; Vater, J.; Kruft, V.; Otto, A.; Wittmann-Liebold, B.; Franke, P.; Panico, M.; McDowell, R.; Morris, H.R. (1996). **The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates.** *J. Biol. Chem.* 271(26): 15428-15435. PMID:8663196.

Suárez, C. y Guidol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. Enferm. Infec. Microbiol. Clín. 27: 116-129.

Subramani, S. (1993). **Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 445-478 doi:10.1146/annurev.cb.09.110193.002305 [doi]. PMID:8280468.

Т

Tabak, H.F.; Murk, J.L.; Braakman, I.; Geuze, H.J. (2003). **Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum**. *Traffic*. 4(8): 512-518 doi:110 [pii]. PMID:12839494.

Tai, H.Y.; Tam, M.F.; Chou, H.; Peng, H.J.; Su, S.N.; Perng, D.W.; Shen, H.D. (2006). Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy.* 61(3): 382-388 doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00958.x. PMID:16436150.

Teijeira, F.; Ullán, R.V.; Guerra, S.M.; García-Estrada, C.; Vaca, I.; Martín, J.F. (2009). **The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production**. *Biochem. J.* 418(1): 113-124 doi:10.1042/BJ20081180. PMID:18840096.

Teijeira, F.; Ullan, R.V.; Fernandez-Aguado, M.; Martin, J.F. (2011). **CefR modulates transporters of beta-lactam intermediates preventing the loss of penicillins to the broth and increases cephalosporin production in** *Acremonium chrysogenum. Metab. Eng.* 13(5): 532-543 doi:10.1016/j.ymben.2011.06.004; 10.1016/j.ymben.2011.06.004. PMID:21704721.

Thaker, M.N. y Wright, G.D. (2012). **Opportunities for Synthetic Biology in Antibiotics: Expanding Glycopeptide Chemical Diversity.** *ACS Synth. Biol.* doi:10.1021/sb300092n [doi]. PMID:23654249.

Theilgaard, H.B.; Kristiansen, K.N.; Henriksen, C.M.; Nielsen, J. (1997). Purification and characterization of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from Penicillium chrysogenum. *Biochem. J.* 327 (Pt 1)(Pt 1): 185-191[accessed 7/30/2012 5:39:58 AM]. PMID:9355751.

Thom, C. (1945). Mycology presents penicillin. Mycologia. 37: 460-475.

Thoms, S.; Gronborg, S.; Gärtner, J. (2009). **Organelle interplay in peroxisomal disorders.** *Trends Mol. Med.* 15(7): 293-302 doi:10.1016/j.molmed.2009.05.002 [doi]. PMID:19560974.

Thykaer, J. y Nielsen, J. (2003). **Metabolic engineering of beta-lactam production**. *Metab. Eng.* 5(1): 56-69 doi:S109671760300003X [pii]. PMID:12749845.

Tobin, M.B.; Fleming, M.D.; Skatrud, P.L.; Miller, J.R. (1990). Molecular characterization of the acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase gene (*penDE*) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* 172(10): 5908-5914. PMID:2120195.

Trinci, A.P. (1973a). The hyphal growth unit of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. Arch. *Mikrobiol*. 91(2): 127-136. PMID:4268673.

Trinci, A.P. (1973b). Growth of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa* in batch culture and on agar medium. *Arch. Mikrobiol.* 91(2): 113-126. PMID:4268672.

Trinci, A.P. y Collinge, A.J. (1973). Structure and plugging of septa of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa. Arch. Mikrobiol.* 91(4): 355-364. PMID:4354924.

Trip, H.; Evers, M.E.; Konings, W.N.; Driessen, A.J. (2002). Cloning and characterization of an aromatic amino acid and leucine permease of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1565(1): 73-80. PMID:12225854.

Trip, H.; Evers, M.E.; Kiel, J.A.; Driessen, A.J. (2004). **Uptake of the beta-lactam precursor alpha-aminoadipic acid in** *Penicillium chrysogenum* is mediated by the acidic and the general amino acid permease. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8): 4775-4783 doi:10.1128/AEM.70.8.4775-4783.2004. PMID:15294814.

Trip, H. (2005). Amino acid transport in *Penicillium chrysogenum* in relation to precursor supply for beta-lactam production. (PhD). Univesity of Groningen.

U

Uchida, E.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. (1985). Purification and properties of H+-translocating, Mg²⁺-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 260(2): 1090-1095. PMID:2857169.

Ullán, R.V.; Liu, G.; Casqueiro, J.; Gutierrez, S.; Bañuelos, O.; Martín, J.F. (2002). The *ceft* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. *Mol. Genet. Genomics.* 267(5): 673-683 doi:10.1007/s00438-002-0702-5. PMID:12172807.

Ullán, R.V.; Campoy, S.; Casqueiro, J.; Fernández, F.J.; Martín, J.F. (2007). **Deacetylcephalosporin C production in** *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. *Chem. Biol.* 14(3): 329-339 doi:10.1016/j.chembiol.2007.01.012. PMID:17379148.

Ullán, R.V.; Teijeira, F.; Martin, J.F. (2008a). Expression of the *Acremonium chrysogenum cef*T gene in *Penicillum chrysogenum* indicates that it encodes an hydrophilic beta-lactam transporter. *Curr. Genet.* 54(3): 153-161 doi:10.1007/s00294-008-0207-9. PMID:18668246.

Ullán, R.V.; Godio, R.P.; Teijeira, F.; Vaca, I.; García-Estrada, C.; Feltrer, R.; Kosalkova, K.; Martín, J.F. (2008b). **RNA**silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression. *J. Microbiol. Methods*. 75(2): 209-218 doi:10.1016/j.mimet.2008.06.001. PMID:18590779.

Ullán, R.V.; Teijeira, F.; Guerra, S.M.; Vaca, I.; Martín, J.F. (2010). Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C. *Biochem. J.* 432(2): 227-236 doi:10.1042/BJ20100827. PMID:20819073.

Urech, K.; Dürr, M.; Boller, T.; Wiemken, A.; Schwencke, J. (1978). Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 116(3): 275-278. PMID:348146.

V

van de Kamp, M.; Driessen, A.J.; Konings, W.N. (1999a). **Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi.** *Antonie Van Leeuwenhoek.* 75(1-2): 41-78. PMID:10422581.

van de Kamp, M.; Pizzinini, E.; Vos, A.; van der Lende, T.R.; Schuurs, T.A.; Newbert, R.W.; Turner, G.; Konings, W.N.; Driessen, A.J. (1999b). **Sulfate transport in** *Penicillium chrysogenum*: cloning and characterization of the *sutA* and *sutB* genes. *J. Bacteriol.* 181(23): 7228-7234. PMID:10572125.

van de Kamp, M.; Schuurs, T.A.; Vos, A.; van der Lende, T.R.; Konings, W.N.; Driessen, A.J. (2000). **Sulfur regulation of the** sulfate transporter genes *sutA* and *sutB* in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10): 4536-4538. PMID:11010912.

van den Berg, M.A.; Westerlaken, I.; Leeflang, C.; Kerkman, R.; Bovenberg, R.A. (2007). Functional characterization of the penicillin biosynthetic gene cluster of *Penicillium chrysogenum* Wisconsin54-1255. *Fungal Genet. Biol.* 44(9): 830-844 doi:10.1016/j.fgb.2007.03.008. PMID:17548217.

van den Berg, M.A.; Albang, R.; Albermann, K.; Badger, J.H.; Daran, J.M.; Driessen, A.J.; García-Estrada, C.; Fedorova, N.D.; Harris, D.M.; Heijne, W.H.; Joardar, V.; Kiel, J.A.; Kovalchuk, A.; Martin, J.F.; Nierman, W.C.; Nijland, J.G.; Pronk, J.T.; Roubos, J.A.; van der Klei, I.J.; van Peij, N.N.; Veenhuis, M.; von Dohren, H.; Wagner, C.; Wortman, J.; Bovenberg, R.A. (2008). **Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus** *Penicillium chrysogenum. Nat. Biotechnol.* 26(10): 1161-1168 doi:10.1038/nbt.1498. PMID:18820685.

van der Lende, T.R.; Breeuwer, P.; Abee, T.; Konings, W.N.; Driessen, A.J. (2002a). Assessment of the microbody luminal pH in the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1589(2): 104-111 doi:S0167488902001623 [pii]. PMID:12007786.

van der Lende, T.R.; van de Kamp, M.; Berg, M.; Sjollema, K.; Bovenberg, R.A.; Veenhuis, M.; Konings, W.N.; Driessen, A.J. (2002b). **Delta-(L-alpha-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme.** *Fungal Genet. Biol.* 37(1): 49-55. PMID:12223189.

van der Rest, M.E.; de Vries, Y.; Poolman, B.; Konings, W.N. (1995a). **Overexpression of Mal61p in Saccharomyces** cerevisiae and characterization of maltose transport in artificial membraes. *J. Bacteriol.* 177: 5440-5446.

van der Rest, M.E.; Kamminga, A.H.; Nakano, A.; Anraku, Y.; Poolman, B.; Konings, W.N. (1995b). **The plasma membrane** of Saccharomyces cerevisiae: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59: 304-322.

van Roermund, C.W.; Elgersma, Y.; Singh, N.; Wanders, R.J.; Tabak, H.F. (1995). The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* 14(14): 3480-3486. PMID:7628449.

van West, P.; Kamoun, S.; van 't Klooster, J.W.; Govers, F. (1999). Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans. Mol. Cell*, 3(3): 339-348. PMID:10198636.

Veses, V.; Richards, A.; Gow, N.A. (2008). Vacuoles and fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 11(6): 503-510 doi:10.1016/j.mib.2008.09.017. PMID:18935977.

Vining, L.C. (1992). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review. *Gene.* 115(1-2): 135-140. PMID:1612428.

w

Wadskog, I.; Forsmark, A.; Rossi, G.; Konopka, C.; Oyen, M.; Goksor, M.; Ronne, H.; Brennwald, P.; Adler, L. (2006). **The** yeast tumor suppressor homologue Sro7p is required for targeting of the sodium pumping ATPase to the cell surface. *Mol. Biol. Cell*. 17(12): 4988-5003 doi:E05-08-0798 [pii]. PMID:17005914.

Waksman, S.A. y Woodruff, H.B. (1941). Actinomyces antibioticus, a New Soil Organism Antagonistic to Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria. J. Bacteriol. 42(2): 231-249. PMID:16560451.

Walsh, C.T. y Wright, G. (2005). Chem. Rev. 105: 391-394.

Walton, P.A.; Hill, P.E.; Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Biol. Cell.* 6(6): 675-683. PMID:7579687.

Wang, F.Q.; Liu, J.; Dai, M.; Ren, Z.H.; Su, C.Y.; He, J.G. (2007). Molecular cloning and functional identification of a novel phenylacetyl-CoA ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360(2): 453-458 doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.074. PMID:17612506.

Waterham, H.R. y Cregg, J.M. (1996). Peroxisome biogenesis. Bio. Essays. 19: 57-66.

Weber, S.S.; Bovenberg, R.A.; Driessen, A.J. (2012a). **Biosynthetic concepts for the production of beta-lactam antibiotics in** *Penicillium chrysogenum. Biotechnol. J.* 7(2): 225-236 doi:10.1002/biot.201100065; 10.1002/biot.201100065. PMID:22057844.

Weber, S.S.; Kovalchuk, A.; Bovenberg, R.A.; Driessen, A.J. (2012b). **The ABC transporter ABC40 encodes a phenylacetic acid export system in** *Penicillium chrysogenum. Fungal Genet. Biol.* 49(11): 915-921 doi:10.1016/j.fgb.2012.09.003; 10.1016/j.fgb.2012.09.003. PMID:23010151.

Weigel, B.J.; Burgett, S.G.; Chen, V.J.; Skatrud, P.L.; Frolik, C.A.; Queener, S.W.; Ingolia, T.D. (1988). **Cloning and expression** in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans. J. Bacteriol.* 170(9): 3817-3826. PMID:3045077.

White, C. y Gadd, G.M. (1986). Uptake and cellular distribution of copper, cobalt and cadmium in strains of *Saccharomyces cerevisiae* cultured on elevated levels of these metals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 277-283.

Whiteman, P.A.; Abraham, E.P.; Baldwin, J.E.; Fleming, M.D.; Schofield, C.J.; Sutherland, J.D.; Willis, A.C. (1990). **Acyl** coenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett.* 262(2): 342-344 doi:0014-5793(90)80224-7 [pii]. PMID:2110531.

Whittaker, R.H. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*. 163(3863): 150-160. PMID:5762760.

Wiemken, A. y Durr, M. (1974). Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol*. 101(1): 45-57. PMID:4374149.

Woo, P.C.; Chong, K.T.; Tse, H.; Cai, J.J.; Lau, C.C.; Zhou, A.C.; Lau, S.K.; Yuen, K.Y. (2006). Genomic and experimental evidence for a potential sexual cycle in the pathogenic thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. *FEBS Lett.* 580(14): 3409-3416 doi:10.1016/j.febslet.2006.05.014. PMID:16714021.

Wright, G.D. (2014). Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can. J. Microbiol.* 60(3): 147-154 doi:10.1139/cjm-2014-0063 [doi]. PMID:24588388.

Y

Yan, N. (2013). **Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters.** *Trends Biochem. Sci.* 38(3): 151-159 doi:10.1016/j.tibs.2013.01.003; 10.1016/j.tibs.2013.01.003. PMID:23403214.

Yang, J.; Xu, X.; Liu, G. (2012). Amplification of an MFS transporter encoding gene *penT* significantly stimulates penicillin production and enhances the sensitivity of *Penicillium chrysogenum* to phenylacetic acid. *J. Genet. Genomics.* 39(11): 593-602 doi:10.1016/j.jgg.2012.08.004 [doi]. PMID:23177147.

Yorimitsu, T. y Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 12 Suppl 2: 1542-1552 doi:4401765 [pii]. PMID:16247502.

Young, G.B.; Jack, D.L.; Smith, D.W.; Saier, M.H.Jr. (1999). The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1415(2): 306-322. PMID:9889387.

Yu, Z.L.; Liu, J.; Wang, F.Q.; Dai, M.; Zhao, B.H.; He, J.G.; Zhang, H. (2011). Cloning and characterization of a novel CoAligase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Folia Microbiol. (Praha).* 56(3): 246-252 doi:10.1007/s12223-011-0044-y. PMID:21625874.

Z

Zabriskie, T.M. y Jackson, M.D. (2000). Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. Nat. Prod. Rep. 17(1): 85-97. PMID:10714900.

Zakeri, B. y Lu, T.K. (2013). Synthetic biology of antimicrobial discovery. ACS Synth. Biol. 2(7): 358-372 doi:10.1021/sb300101g [doi]. PMID:23654251.

Zalokar, M. (1959a). Growth and differentiation of Neurospora hyphae. Am. J. Bot. 46: 602-610.

Zalokar, M. (1959b). Enzymatic activity and cell differentiation in Neurospora. Am. J. Bot. 46: 555-559.

Zhang, J. y Demain, A.L. (1992). **ACV synthetase.** *Crit. Rev. Biotechnol.* 12(3): 245-260 doi:10.3109/07388559209069194 [doi]. PMID:1633622.

Zhang, J.; Wolfe, S.; Demain, A.L. (1992). Biochemical studies on the activity of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem. J.* 283 (Pt 3) (Pt 3): 691-698. PMID:1590759.

Zhao, G.; Yeh, W.K.; Carnahan, R.H.; Flokowitsch, J.; Meier, T.I.; Alborn, W.E.,Jr; Becker, G.W.; Jaskunas, S.R. (1997). Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *J. Bacteriol.* 179(15): 4901-4908. PMID:9244281.

Referencias bibliográficas sin autor expreso

Antibióticos S.A. (1974) Editores F. Mellizo, Madrid.

 The discovery and development of penicillin: 1928-1945 (1999). Editores American Chemical Society. International

 Historic
 Chemical
 Landmark
 Program.

 http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html.
 Program.