



Universidad de León  
Dpto. de Biología Molecular  
Área de Microbiología



Instituto de Biotecnología de León  
INBIOTEC

## **TESIS DOCTORAL**

# **Caracterización Bioquímica y Molecular de la Biosíntesis del Antitumoral Andrastina y de la Toxina PR en *Penicillium roqueforti*.**

Pedro Iván Hidalgo Yanes

León 2013



## **INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS<sup>1</sup>**

**(R.D. 99/2011, de 28 de enero y Normativa de la ULE)**

El Dr. D. Juan Francisco Martín Martín, el Dr. D. Ricardo Vicente Ullán y la Dra. Dña. Silvia Albillos García como Directores<sup>2</sup> de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización Bioquímica y Molecular de la Biosíntesis del Antitumoral Andrastina y de la Toxina PR en *Penicillium roqueforti*” realizada por D. Pedro Iván Hidalgo Yanes en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

León a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

D. Juan Francisco Martín Martín

D. Ricardo Vicente Ullán

Dña. Silvia Albillos García

---

<sup>1</sup> Este impreso solamente se cumplimentará para los casos de tesis depositadas en papel.

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



**ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL**<sup>3</sup>  
(R.D. 99/2011, de 28 de enero y Normativa de la ULE)

El órgano responsable del programa de doctorado \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

en su reunión celebrada el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización Bioquímica y Molecular de la Biosíntesis del Antitumoral Andrastina y de la Toxina PR en *Penicillium roqueforti*”, dirigida por el Dr. D. Juan Francisco Martín Martín, el Dr. D. Ricardo Vicente Ullán y la Dra. Dña. Silvia Albillos García, elaborada por D. Pedro Iván Hidalgo Yanes.y cuyo título en inglés es el siguiente “Biochemical and Molecular Characterization of the Antitumoral Andratine and PR-toxin in *Penicillium roqueforti*”.

Lo que firmo, en León a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

El Secretario del Departamento/  
Secretario de la Comisión Académica,

Fdo.: \_\_\_\_\_

CONFORMIDAD  
El Director del Departamento/  
Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
<sup>3</sup> Este impreso solamente se cumplimentará para los casos de tesis depositadas en papel.



***A mis padres Teresa y Pedro Pablo  
y a mi hermana Idania***





## Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y personas sin las cuales hubiera sido imposible el desarrollo de esta memoria de Tesis Doctoral.

Al Dr. Juan Francisco Martín, director de esta Tesis, por ofrecerme la oportunidad de trabajar bajo su tutela y por el apoyo brindado para lograr la culminación de este trabajo.

A la Agencia Española de Colaboración Internacional para el Desarrollo (AECID) por la financiación de los dos primeros años de mi estancia de investigación.

Al Dr. Ricardo Vicente Ullán y la Dra. Silvia M. Abillos García, co-directores de esta Tesis, por haberme guiado en las distintas fases de la realización de este trabajo y por el aliento para continuar en los momentos más difíciles.

Al Dr. Carlos Barreiro Méndez por su colaboración y asesoría brindada en los trabajos de proteómica.

Al Dr. Olimpio Montero Domínguez por colaborar en la realización de las determinaciones por espectrometría de masas.

Al Dr. Carlos García Estrada por brindarme su apoyo y asesoramiento.

A Marta y Fernando, compañeros de cuarto, por compartir los momentos de alegría y de frustración propios del proceso de investigación.

A Mafe, Rebeca, Raquel, Vanesa, Miriam, Carlos y Lorena por haberme acogido y hacerme sentir en INBIOTEC como en casa.

A todos los compañeros con los que he coincidido durante toda o parte de mi estancia en INBIOTEC por haber creado un ambiente de trabajo propicio para el desarrollo de la investigación científica.

Y finalmente deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.



**La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.**

***Voltaire***



# Índice General

<b>Introducción</b> .....	3
1. Características generales del género <i>Penicillium</i> .....	3
2. Características generales de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	5
2.1 Características taxonómicas.....	6
3. Papel de <i>P. roqueforti</i> en la elaboración del queso azul. Producción de enzimas extracelulares.....	9
4. Micotoxinas producidas por <i>P. roqueforti</i> .....	11
5. Metabolismo secundario de <i>P. roqueforti</i> .....	13
5.1 Metabolismo de la toxina PR.....	14
5.1.1 Aislamiento y caracterización de la toxina PR y compuestos afines.....	14
5.1.2 Biosíntesis de la toxina PR.....	16
5.1.3 Aristoloqueno, posible molécula precursora para la biosíntesis de la toxina PR.....	18
5.1.4 Características generales de la aristoloqueno sintasa Ari1, enzima responsable de la biosíntesis de aristoloqueno.....	20
5.1.5 Metabolitos secundarios resultantes del proceso de transformación de la toxina PR.....	22
5.1.6 Perfil quimiotaxonómico de las cepas productoras de toxina PR.....	24
5.2 Metabolismo de las andrastinas.....	26
5.2.1 Aislamiento y estructura química.....	26
5.2.2 Actividad biológica y mecanismo de acción.....	27
5.2.3 Ruta biosintética de la andrastina A.....	29
5.3 Metabolismo del ácido micofenólico.....	29
5.3.1 Aislamiento e identificación del ácido micofenólico.....	29
5.3.2 Propiedades biológicas y mecanismo de acción del ácido micofenólico...	30
5.3.3 Biosíntesis del ácido micofenólico.....	31
6. Diseño de Experimentos en estudios de fermentación.....	33
6.1 Diseño factorial.....	33
6.2 Diseño de superficies de respuesta.....	34
<b>Objetivos</b> .....	39
<b>Materiales y Métodos</b> .....	43
1. Microorganismos.....	43
1.1 Cepas bacterianas.....	43

1.2 Cepas fúngicas.....	43
2. Vectores.....	43
3. Reactivos químicos.....	44
3.1 Antibióticos.....	44
3.2 Enzimas.....	44
3.3 Oligonucleótidos.....	45
3.4 Conjuntos de kits comerciales.....	46
4. Medios de Cultivo.....	46
4.1 Medios de cultivo para bacterias.....	46
4.2 Medios de cultivo para hongos filamentosos.....	47
5. Crecimiento y mantenimiento de microorganismos.....	54
5.1 Cultivos bacterianos.....	54
5.2 Cultivos fúngicos.....	55
6. Producción de metabolitos secundarios en <i>P. roqueforti</i> .....	56
6.1 Extracción de andrastinas a partir de cultivos en medio sólido.....	56
6.2 Extracción de andrastinas a partir de cultivos en medio líquido.....	56
6.3 Extracción de toxina PR a partir de cultivos en medio líquido.....	57
6.4 Extracción de toxina PR a partir del cultivo de <i>P. roqueforti</i> en arroz.....	57
6.5 Cuantificación volumétrica de andrastinas mediante HPLC.....	58
6.6 Cuantificación volumétrica de ácido micofenólico.....	58
6.7 Identificación cromatográfica de toxina PR.....	59
6.8 Cuantificación relativa de toxina PR.....	59
7. Obtención de ADN total de <i>P. roqueforti</i> a partir de micelio.....	60
8. Manipulación de ADN.....	61
8.1 Eliminación selectiva de ácidos nucleicos.....	61
8.2 Limpieza y precipitación de ADN.....	61
8.3 Reacciones con endonucleasas de restricción.....	62
8.4 Ligación de fragmentos de ADN.....	63
8.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	64
8.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	66
8.7 Extracción de ADN de geles de agarosa.....	68
8.8 Cuantificación y análisis de pureza de los ácidos nucleicos.....	68
9. Transformación de <i>E. coli</i> y obtención de ADN plasmídico.....	69
9.1 Obtención de células de <i>E. coli</i> competentes.....	69
9.2 Transformación de <i>E. coli</i> .....	70
9.3 Minipreparación de ADN plasmídico.....	70
9.4 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a gran escala.....	71

10. Transferencia de ADN de geles de agarosa a filtros de nailon (Southern blotting).....	71
10.1 Transferencia de ADN mediante sistema de vacío.....	72
11. Hibridación no radioactiva de ADN.....	73
11.1 Marcaje de sondas de ADN.....	73
11.2 Prehibridación.....	73
11.3 Hibridación.....	74
11.4 Lavado de los filtros.....	74
11.5 Detección Inmunológica.....	75
12. Obtención de mutantes por luz ultravioleta.....	76
13. Transformación de <i>P. roqueforti</i> .....	76
13.1 Obtención de protoplastos de <i>P. roqueforti</i> .....	77
13.2 Transformación de protoplastos.....	78
14. Caracterización fenotípica.....	79
14.1 Extensión radial (apical).....	79
14.2 Peso seco en medio líquido.....	79
15. Métodos para análisis de ARN.....	80
15.1 Obtención de ARN total a gran escala.....	80
15.2 Tratamientos con ADNasas de las muestras de ARN.....	81
15.3 Transcripción reversa de ARN (RT-PCR).....	82
16. Métodos para el análisis de proteínas.....	84
16.1 Extracción de proteínas de <i>P. roqueforti</i> .....	84
16.2 Determinación de la concentración de proteínas.....	85
16.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes.....	86
16.4 Análisis bidimensional de proteínas de <i>P. roqueforti</i> .....	87
16.4.1 Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF).....	87
16.4.2 Segunda dimensión (SDS-PAGE).....	88
16.5 Detección de proteínas.....	90
16.5.1 Tinción por el método de Coomassie Coloidal.....	91
16.5.2 Tinción por DIGE.....	91
16.6 Digestión triptica de proteínas separadas mediante electroforesis 2D-PAGE.....	92
17. Aplicación de diseño de experimento.....	93

<b>Capítulo I. Estudio de la producción de andrastina A en <i>Penicillium roqueforti</i></b> .....	95
<b>Objetivos del Capítulo I</b> .....	99
<b>Resultados del Capítulo I</b> .....	103
1. Optimización de la producción de andrastinas en <i>P. roqueforti</i> CECT 2905.....	103
1.1 Experimentos previos.....	103
1.2 Primer diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	106
1.3 Segundo diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	111
2. Obtención de mutantes de <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 con la producción de andrastina A afectada.....	117
3. Evaluación fenotípica de los mutantes.....	119
3.1 Evaluación fenotípica de los mutantes en medio sólido.....	119
3.2 Evaluación fenotípica de los mutantes en medio líquido.....	121
4. Estudio proteómico comparativo entre los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental <i>P. roqueforti</i> CECT 2905.....	123
<b>Discusión del Capítulo I</b> .....	135
1. Optimización de la producción de andrastinas en <i>P. roqueforti</i> CECT 2905.....	135
2. Obtención de mutantes de <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 afectados en la producción de andrastina A.....	137
3. Estudio proteómico comparativo entre los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental <i>P. roqueforti</i> CECT 2905.....	139
<b>Capítulo II. Estudios moleculares de la biosíntesis de toxina PR en <i>Penicillium roqueforti</i></b> .....	141
<b>Objetivos del Capítulo II</b> .....	145
<b>Resultados del Capítulo II</b> .....	149
1. Producción e identificación cromatográfica de la toxina PR.....	149
2. Estudio de la ruta biosintética de la toxina PR.....	153
2.1 Rectificación de secuencia del ORF4 y establecimiento de los intrones de los ORFs del cluster biosintético de la toxina PR.....	154
2.2 Estrategia de silenciamiento del <i>cluster</i> de biosíntesis de la toxina PR en <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936.....	157
2.2.1 Comprobación de la integración de los plásmidos de silenciamiento en los transformantes obtenidos para cada ORF de la región $\lambda$ Ari1.....	160
2.3 Estudio de expresión de los ORFs del <i>cluster</i> de biosíntesis de la toxina PR en los transformantes silenciados.....	165
2.4 Evaluación de la producción de toxina PR y ácido micofenólico de la cepa parental <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y los transformantes silenciados en el ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4.....	168



3. Estudio comparativo del metaboloma de <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y los transformantes tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08 y tSORF4-03.....	173
4. Comparación fenotípica de las cepas referencias <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936.....	183
5. Estudio fenotípico de los transformantes silenciados en los ORFs del <i>cluster</i> de biosíntesis de la toxina PR y la cepa parental <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936.....	184
<b>Discusión del Capítulo II</b> .....	189
1. Producción e identificación cromatográfica de la toxina PR.....	189
2. Estudio de la ruta biosintética de la toxina PR.....	192
<b>Conclusiones</b> .....	201
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	205



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Clasificación del género <i>Penicillium</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura de reproducción asexual del género <i>Penicillium</i> .....	4
<b>Figura 3.</b> Morfología de <i>P. roqueforti</i> .....	7
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético de los aislamientos pertenecientes al grupo Roqueforti del género <i>Penicillium</i> .....	8
<b>Figura 5.</b> Fotografías que muestran el aspecto de quesos azules con oquedades colonizadas por <i>P. roqueforti</i> .....	10
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la toxina PR (C17H20O6).....	15
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la eremofortina A (EA) y eremofortina B (EB).....	15
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la eremofortina C (EC) y eremofortina D (ED).....	16
<b>Figura 9.</b> Ruta biosintética de la toxina PR propuesta por Moreau <i>et al.</i> , (1980).....	17
<b>Figura 10.</b> Estructura química del Aristoloqueno y del esqueleto carbonado del grupo de los eremofilanos.....	19
<b>Figura 11.</b> Rutas biosintéticas propuestas para diferentes sesquiterpenos.....	21
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la PR-amida y de la PR-imina.....	22
<b>Figura 13.</b> Estructura química de PR ácido.....	23
<b>Figura 14.</b> Esquema propuesto para la biosíntesis y degradación de toxina PR en <i>P. roqueforti</i> .....	24
<b>Figura 15.</b> Marcadores químicos de la ruta biosintética de toxina PR.....	26
<b>Figura 16.</b> Estructura química de la Andrastina A, B, C y D.....	27
<b>Figura 17.</b> Modificaciones post-traduccionales de las proteínas Ras y mecanismo de acción de los inhibidores de la FPTasa.....	28
<b>Figura 18.</b> Ruta biosintética de andrastina A propuesta por Uchida <i>et al.</i> , (1996a).....	29
<b>Figura 19.</b> Estructura química del ácido micofenólico.....	30
<b>Figura 20.</b> Ruta biosintética del ácido micofenólico en <i>P. brevicompactum</i> a partir de acetyl-CoA y malonil-CoA propuesta por Regueira <i>et al.</i> , (2011).....	32
<b>Figura 21.</b> Plásmido pJL43RNAi.....	44
<b>Figura 22.</b> Marcadores de peso molecular utilizados para ADN.....	67
<b>Figura 23.</b> Cuantificación de andrastinas A y B presentes en los lavados de las esporas con agua milli-Q.....	104
<b>Figura 24.</b> Producción volumétrica de andrastina A por <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 tras su crecimiento en diferentes medios de cultivos y a distintos tiempos de fermentación.....	105
<b>Figura 25.</b> Diagrama de Pareto estandarizado para el primer diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	108
<b>Figura 26.</b> Diagrama de efectos principales para el primer diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	108
<b>Figura 27.</b> Diagramas de superficie de respuesta estimada para la producción volumétrica de andrastina A en el primer diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	110

<b>Figura 28.</b> Diagrama estandarizado de Pareto para el segundo diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	112
<b>Figura 29.</b> Diagrama de efectos principales para el segundo diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	114
<b>Figura 30.</b> Diagrama de superficie de respuesta estimada para la producción volumétrica de andrastina A.....	115
<b>Figura 31.</b> Estimación de la producción volumétrica de andrastina A en <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 a los 12 días de incubación, pH (3,5-5,5) y temperatura de incubación (17-23°C).....	116
<b>Figura 32.</b> Curva de mortalidad de <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 a diferentes tiempos de exposición con luz ultravioleta.....	117
<b>Figura 33.</b> Producción específica de andrastina A por <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta crecidos en medio CYA durante 7 días de incubación.....	118
<b>Figura 34.</b> Peso seco del micelio producido por cada uno de los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental ( <i>P. roqueforti</i> CECT 2905).....	119
<b>Figura 35.</b> Tasa de crecimiento apical de los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental ( <i>P. roqueforti</i> CECT 2905) en diferentes medios de cultivo sólido.....	120
<b>Figura 36.</b> Fenotipo de las colonias de los mutantes obtenidos con luz ultravioleta y la cepa parental ( <i>P. roqueforti</i> CECT 2905) en los diferentes medios de cultivo sólido analizados.....	121
<b>Figura 37.</b> Curva de crecimiento en medio líquido de <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta.....	122
<b>Figura 38.</b> Producción de andrastina A en <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta.....	122
<b>Figura 39.</b> Esporulación de <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta en medio MAp líquido (A). Correlación de la producción de andrastina A y la esporulación en <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 (B).....	123
<b>Figura 40.</b> Producción de andrastina A por superficie de medio de cultivo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en la cepa parental <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y los mutantes obtenidos por irradiación de luz ultravioleta.....	124
<b>Figura 41.</b> Imagen correspondiente a la superposición de las señales de fluorescencia que generan los fluorocromos empleados en el 2D-DIGE (A). Esquema del análisis de componentes principales (B).....	126
<b>Figura 42.</b> Proteoma intracelular de <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 marcado con Cy3.....	128
<b>Figura 43.</b> Proteoma intracelular del mutante MT5-209 marcado con Cy5.....	128
<b>Figura 44.</b> Proteoma intracelular del mutante MT5-245, marcado con Cy3.....	129
<b>Figura 45.</b> Proteoma intracelular del mutante MT5-257, marcado con Cy5.....	129
<b>Figura 46.</b> Perfiles de expresión atendiendo a los patrones presentados por las proteínas en la cepa parental <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y los mutantes MT5-209, MT5-245 y MT5-257.....	130
<b>Figura 47.</b> Cromatograma de los extractos crudos de <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 cultivados en medio arroz.....	150
<b>Figura 48.</b> Cromatogramas en UPLC del extracto crudo de <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y las fracciones colectadas.....	151
<b>Figura 49.</b> Espectros de masas.....	153

<b>Figura 50.</b> ORFs identificados como resultado del análisis de la secuencia correspondiente al inserto de 11307 pb del fago $\lambda$ Ari1 y su comparación con las bases de datos informáticas..	154
<b>Figura 51.</b> Comparación entre las regiones génicas de <i>P. chrysogenum</i> y <i>P. roqueforti</i> que contienen el gen <i>ari1</i> .....	155
<b>Figura 52.</b> Esquemas de los plásmidos usados en el silenciamiento de los ORFs de la región $\lambda$ Ari1.....	159
<b>Figura 53.</b> Análisis mediante hibridación de <i>Southern</i> de los transformantes positivos silenciados en el ORF1.....	161
<b>Figura 54.</b> Análisis mediante hibridación de <i>Southern</i> de los transformantes positivos silenciados en el ORF2.....	162
<b>Figura 55.</b> Análisis mediante hibridación de <i>Southern</i> de los transformantes positivos silenciados en el ORF3.....	163
<b>Figura 56.</b> Análisis mediante hibridación de <i>Southern</i> de los transformantes positivos silenciados en el ORF4.....	164
<b>Figura 57.</b> RT-PCR semicuantitativa de la expresión del ORF1 en los transformantes tSORF1-02, tSORF1-03 y la cepa parental <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz.....	166
<b>Figura 58.</b> Estudio de la expresión del ORF2 mediante RT-PCR semicuantitativa en los transformantes tSORF2-01, tSORF2-04 y la cepa parental <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz.....	167
<b>Figura 59.</b> Estudio de la expresión del ORF3 mediante RT-PCR semicuantitativa en los transformantes tSORF3-08, tSORF3-19 y la cepa parental <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz.....	167
<b>Figura 60.</b> Estudio de la expresión del ORF4 mediante RT-PCR semicuantitativa en los transformantes tSORF4-03, tSORF4-06 y la cepa parental <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz.....	168
<b>Figura 61.</b> Producción relativa de toxina PR de los transformantes silenciados en el ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4 con respecto a la cepa <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936.....	169
<b>Figura 62.</b> Producción específica de ácido micofenólico en la cepa parental <i>P. roqueforti</i> CECT ATCC 48936 y en los transformantes silenciados en el ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4...	170
<b>Figura 63.</b> Cromatograma de los extractos crudos de <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y los transformantes tSORF1-02 y tSORF1-03 cultivados en medio arroz.....	171
<b>Figura 64.</b> Cromatograma de los extractos crudos de <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y los transformantes tSORF2-01 y tSORF2-04 cultivados en medio arroz.....	171
<b>Figura 65.</b> Cromatograma de los extractos crudos de <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y los transformantes tSORF3-08 y tSORF3-19 cultivados en medio arroz.....	172
<b>Figura 66.</b> Cromatograma de los extractos crudos de <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y los transformantes tSORF4-03 y tSORF4-06 cultivados en medio arroz.....	172
<b>Figura 67.</b> Cromatogramas tipo para cada muestra analizada con ionización en positivo. De abajo hacia arriba: <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08, tSORF4-03.....	174
<b>Figura 68.</b> Cromatogramas tipo para cada muestra analizada con ionización en negativo. De abajo hacia arriba: <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08, tSORF4-03.....	175
<b>Figura 69.</b> Análisis discriminante basado en mínimos cuadrados parciales (PSL-DA).....	176

<b>Figura 70.</b> Cromatogramas extraídos de cada una de los diferentes muestras para el valor m/z 323,1495, el cual corresponde con el de la Eremofortina C.....	178
<b>Figura 71.</b> Espectro de masas.....	179
<b>Figura 72.</b> Cromatogramas extraídos de cada una de las muestras para el valor m/z 307,1545, el cual corresponde con el de la Eremofortina A.....	181
<b>Figura 73.</b> Cromatogramas extraídos de cada una de las muestras para el valor m/z 265,1440, el cual se corresponde con el de la DAC-Eremofortina A.....	182
<b>Figura 74.</b> Morfología de las colonias de <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 en los medios de cultivo Czapek Yeast Extract (CYA) y Czapek (Cz) a los 4 días de incubación.....	183
<b>Figura 75.</b> Tasa de crecimiento apical de las cepas de referencia <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 en los medios de cultivo sólido Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek Yeast Extract (CYA), Power 2 (PW2) y Czapek (Cz)..	183
<b>Figura 76.</b> Producción de los metabolitos secundarios toxina PR y ácido micofenólico en las cepas de referencia <i>P. roqueforti</i> ATCC 48936 y CECT 2905.....	184
<b>Figura 77.</b> Tasa de extensión radial de los transformantes silenciados en los cuatro ORFs en los medios de cultivo sólido.....	185
<b>Figura 78.</b> Morfología de las colonias de los transformantes silenciados a los 7 días de crecimiento en los medios de cultivo ensayados: Czapek (Cz), Malt Extract Agar (MEA), Czapek Yeast Extract (CYA) y Power 2 (PW2).....	186
<b>Figura 79.</b> Esquema de la ruta biosintética propuesta para la toxina PR. Se indican algunas de las proteínas resultantes de los ORFs del <i>cluster</i> de biosíntesis de la toxina PR en el paso correspondiente.....	193

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Micotoxinas producidas por las especies del grupo de <i>P. roqueforti</i> .....	12
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos empleados en el trabajo experimental.....	45
<b>Tabla 3.</b> Componentes necesarios para realizar una PCR (50 µl de reacción).....	66
<b>Tabla 4.</b> Componentes necesarios para realizar una RT-PCR y cantidades para una reacción de 50 µl.....	83
<b>Tabla 5.</b> Programa de RT-PCR aplicado.....	83
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones de BSA para elaborar la curva patrón.....	85
<b>Tabla 7.</b> Composición de los geles desnaturizantes de proteínas. Parte concentradora.....	86
<b>Tabla 8.</b> Composición de los geles desnaturizantes de proteínas. Parte separadora.....	86
<b>Tabla 9.</b> Composición de geles desnaturizantes de proteínas. Segunda dimensión.....	89
<b>Tabla 10.</b> Factores, “variable-respuesta”, factores y niveles evaluados en el primer diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	106
<b>Tabla 11.</b> Valores de la “variable-respuesta” en el primer diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	107
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza en la producción volumétrica de andrastina A (µg/ml) en el primer diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	109
<b>Tabla 13.</b> Predicción de la producción volumétrica de andrastina A al variar los diferentes factores: pH (A), temperatura de incubación (B) y tiempo de incubación (C).....	111
<b>Tabla 14.</b> Factores, “variable-respuesta” y niveles evaluados en el segundo diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	112
<b>Tabla 15.</b> Valores de la “variable-respuesta” en el segundo diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	113
<b>Tabla 16.</b> Análisis de varianza en la producción volumétrica de andrastina A (µg/ml) en el segundo diseño “factorial 3 <sup>3</sup> ”.....	114
<b>Tabla 17.</b> Electroforesis diferencial en gel (DIGE). Fluorocromos con los que se marcaron cada muestra y el gel en el que fueron analizadas.....	126
<b>Tabla 18.</b> Proteínas identificadas pertenecientes a cada perfil de expresión.....	127
<b>Tabla 19.</b> Proteínas identificadas con diferencias en la expresión entre la cepa parental <i>P. roqueforti</i> CECT 2905 y los mutantes MT5-209, MT5-245 y MT-257.....	131
<b>Tabla 20.</b> Oligonucleótidos diseñados para realizar las RT-PCR para definir la posición de los intrones del ORF1, ORF2 y ORF3.....	156
<b>Tabla 21.</b> Secuencias nucleotídicas de las parejas de oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos exónicos de los ORFs del <i>cluster</i> de biosíntesis de la toxina PR.....	158
<b>Tabla 22.</b> Resultados de las PCRs de comprobación, indicándose el tamaño esperado para las PCR de comprobación de cada ORF del <i>cluster</i> de biosíntesis de la toxina PR.....	160
<b>Tabla 23.</b> Oligonucleótidos empleados en el análisis mediante RT-PCR de los ORFs del <i>cluster</i> de biosíntesis de toxina PR en los transformantes silenciados. Se muestra el tamaño de la banda tras la amplificación del ADN y del ADNc por PCR.....	166
<b>Tabla 24.</b> Gradiente de elución utilizado en el análisis de las muestras por UPLC.....	173
<b>Tabla 25.</b> Datos de los compuestos intermediarios de la biosíntesis de la toxina PR.....	177





## Abreviaturas

<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>h:</b> hora (s)
<b>ADNc:</b> ADN complementario	<b>HPLC:</b> cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
<b>ADNasa:</b> desoxirribonucleasa	<b>Kb:</b> kilo pares de base (s)
<b>ADP:</b> adenosida difosfato	<b>KDa:</b> Kilodalton (s)
<b>AMP:</b> adenosín 5' monofosfato	<b>l:</b> litro (s)
<b>Ap:</b> ampicilina	<b>IPG:</b> gradiente inmovilizado de pH
<b>Ari1:</b> aristoloqueno sintasa	<b>M:</b> molar
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>mg:</b> miligramo (s)
<b>ARNasa:</b> ribonucleasa con función ARN hidrolasa	<b>min:</b> minuto (s)
<b>ARNdc:</b> ARN de doble cadena	<b>ml:</b> mililitro (s)
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>mm:</b> milímetro (s)
<b>ATA:</b> ácido auríntrico	<b>mM:</b> milimolar
<b>ATCC:</b> colección americana de cultivos tipo ( <i>American Type Culture Collection</i> )	<b>MOPS:</b> ácido morfolinopropano sulfónico
<b>ATP:</b> adenosín 5' trifosfato	<b>MS:</b> espectroscopía de masas
<b>ATPasa:</b> ATP hidrolasa	<b>m/z:</b> relación entre masa y carga
<b>BSA:</b> seroalbúmina bovina	<b>MW:</b> Peso molecular ( <i>Molecular Weight</i> )
<b>°C:</b> grado centígrado	<b>NADP+:</b> Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
<b>CECT:</b> Colección Española de Cultivos Tipos	<b>NADPH:</b> Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
<b>CIA:</b> cloroformo-alcohol isoamílico	<b>ng:</b> nanogramo
<b>cm:</b> centímetros	<b>nm:</b> nanómetro
<b>CoA:</b> coenzima A	<b>nM:</b> nanomolar
<b>Da:</b> dalton	<b>ORF:</b> marco de lectura abierto ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>DIG:</b> digoxigenina	<b>PAGE:</b> <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>DO:</b> densidad óptica	<b>pb:</b> pares de bases
<b>Dicer:</b> (del inglés <i>dice</i> que significa trocear en dados, hace referencia a la función de la enzima que provoca cortes a una distancia más o menos constante generando moléculas de siRNA de un tamaño parecido)	<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa
<b>DMSO:</b> dimetilsulfóxido	<b>PEG:</b> polietilenglicol
<b>dNTPs:</b> desoxinucleótidos trifosfato	<b>pg:</b> picogramos
<b>DTT:</b> ditioneitol	<b>p/v:</b> relación peso/volumen
<b>EA:</b> Eremofortina A	<b>rpm:</b> revoluciones por minuto
<b>EB:</b> Eremofortina B	<b>RT:</b> tiempo de retención
<b>EC:</b> Eremofortina C	<b>RT-PCR:</b> retrotranscripción y PCR
<b>ED:</b> Eremofortina D	<b>TAE:</b> Tris-acetato-EDT
<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetracético	
<b>EtBr:</b> bromuro de etidio	
<b>g:</b> gramo(s)	

**TCA:** ácido tricloroacético

**TE:** tampón Tris-EDTA

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

**Tris:** tris-hidroximetil-aminometano

**U:** unidades

**UDP:** uridina difosfato

**UTP:** uridina trifosfato

**uv:** ultravioleta

**V:** Voltio

**v/v:** relación volumen/volumen

**W:** Watio

**µg:** microgramo

**µl:** microlitro

**µm:** micrómetro

# **Introducción**



## 1. Características generales del género *Penicillium*.

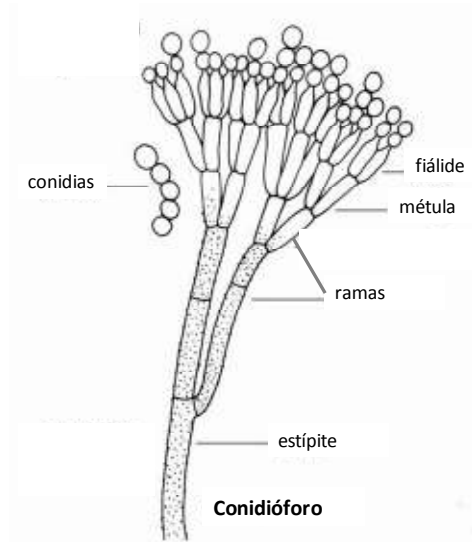
En taxonomía los hongos se encuentran agrupados en el reino Fungi y como eucariotas poseen células cuyo núcleo está delimitado por una membrana nuclear que alberga el material genético en los cromosomas. Además presentan un citoplasma con orgánulos tales como mitocondrias, ribosomas y vacuolas envueltos en una membrana plasmática formada por una doble bicapa lipídica con proteínas y esteroides. Externamente poseen una pared celular que cubre la membrana plasmática, estando formada por proteínas y polisacáridos, de los cuales los más importantes son la quitina (polímero de N-acetilglucosamina), el manano (polímero de manosa) y el glucano (polímero de glucosa). Las células eucariotas fúngicas se diferencian de las células eucariotas de los animales por presentar pared celular y tener ergosterol como componente de su membrana plasmática. La diferencia con las células vegetales se sitúa en la composición de la pared celular y en la ausencia de cloroplastos y clorofila (Carlile *et al.*, 2001; Stephenson, 2010).

Durante mucho tiempo el género *Penicillium* fue clasificado dentro del filo *Deuteromycota* u hongos imperfectos por no conocerse su forma sexual. Actualmente, como resultado de estudios filogenéticos, la clasificación del género *Penicillium* (Figura 1) se incluye dentro de la familia *Trichocomonaceae* (Berbee *et al.*, 1995; Schoch *et al.*, 2009; Bisby *et al.*, 2012).

<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Filo</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Clase</b>	<i>Eurotiomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Eurotiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Trichocomaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Penicillium</i>

Figura 1. Clasificación del género *Penicillium*.

El nombre del género, *Penicillium* deriva del latín *penicillus* (pincel) debido a que producen sus esporas asexuales (conidias) en una estructura llamada conidióforo (Figura 2), semejando un pincel. Los conidióforos pueden ser simples o ramificados y terminan en racimos de fiálides en forma de botella. Las fiálides son las encargadas de producir los conidios que se distribuyen formando cadenas hasta que son completamente liberados.



**Figura 2.** Estructura de reproducción asexual del género *Penicillium*.

El género *Penicillium* se clasifica dentro del filo Ascomycota, representando uno de los géneros más extensos del reino Fungi con más de 250 especies descritas. Se encuentra ampliamente distribuido en las diferentes regiones del planeta. Sus especies son mayoritariamente saprófitas, con una elevada actividad anabólica y catabólica. Los miembros de este género son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios beneficiosos y perjudiciales para la especie humana, así como ácidos orgánicos y enzimas que degradan una amplia variedad de biomoléculas complejas (Pitt y Hocking, 2009; Samson *et al.*, 2010).

Al género *Penicillium* pertenecen especies de gran importancia económica. Algunas de ellas son utilizadas en la industria alimentaria como en la maduración de quesos, productos cárnicos y en la producción de aditivos para alimentos (Grazia *et al.*, 1986). También son utilizadas industrialmente tanto para la producción de enzimas como poliamina oxidasa, fosfogluconato deshidrogenasa y glucosa oxidasa (Leiter *et*

al., 2004) así como fuente de antibióticos como penicilina, xantocilina X y griseofulvina (Fleming, 1929; de Carli and Larizza, 1988).

Algunas especies de este género también están vinculadas a procesos perjudiciales para las personas, animales de granjas y cultivos ya que son capaces de descomponer los alimentos almacenados produciendo micotoxinas. Estos compuestos pueden encontrarse contaminando tanto los piensos como las materias primas utilizadas para su elaboración, lo cual origina un grupo de enfermedades y trastornos denominados *micotoxicosis*, que resultan dañinos para los animales que los consumen (Soriano del Castillo, 2007).

El consumo de piensos con alto contenido de micotoxinas se ha vinculado con la aparición de síntomas agudos (disminución del apetito, daños pulmonares, hepáticos, renales, abortos, malformaciones fetales y en algunos casos la muerte) (Scudamore y Livesey, 1998). Sin embargo las exposiciones durante un tiempo prolongado a bajas concentraciones de micotoxinas pueden provocar síntomas inespecíficos vinculados a la depresión del sistema inmune y a desbalances metabólicos y hormonales (Morgavi y Riley, 2007; Fink-Gremmels, 2008a, 2008b).

Los hongos filamentosos del género *Penicillium* también pueden afectar directamente a la salud humana como agentes etiológicos de infecciones en pacientes inmunocomprometidos. Por ejemplo, la penicilliosis producida por *Penicillium marneffe* afecta a pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Devi *et al.*, 2009; Yanamandra *et al.*, 2011).

## **2. Características generales de *Penicillium roqueforti*.**

*Penicillium roqueforti* (*P. roqueforti*), objeto de estudio en este trabajo, es una de las especies más conocidas del género *Penicillium* debido a su amplia utilización en la fabricación de quesos azules, en especial del queso francés *Roquefort* que le da nombre. Es un hongo saprófito muy extendido en la naturaleza, encontrándose con frecuencia en el suelo, plantas y residuos orgánicos en putrefacción. Su crecimiento se ve favorecido en ambientes con humedad y temperaturas moderadas. Es el principal microorganismo que interviene en la maduración de quesos azules, cuyo consumo fue descrito ya en el año 23 d.c. por Plinio El Viejo en "Historia Natural" (Healy, 1999). En la actualidad está presente en el proceso de maduración de diferentes quesos azules

como los quesos franceses Roquefort y Bleu d'Auvergne, el alemán Cambozola, el italiano Gorgonzola, el danés Danablu y los quesos españoles Cabrales, Picón Bejes-Tresviso y Valdeón (Fernández-Bodega et al., 2009; Jenkins, 1996).

*P. roqueforti* es aislado con frecuencia a partir de cereales, ensilajes y otras materias primas vegetales almacenadas en condiciones microaerófilas por largas temporadas (Frisvad et al., 2004). En dichas condiciones es capaz de producir gran variedad de toxinas que dañan estos productos que son usados en la alimentación animal.

Al igual que la mayoría de las especies pertenecientes al género *Penicillium*, *P. roqueforti* es un hongo aerobio, pero crece bien a bajas concentraciones de oxígeno (4,2%), no es capaz de esporular a 0 y 100% de oxígeno y se ve estimulado con bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Golding, 1945; Pitt y Hocking, 2009). Tiene un crecimiento óptimo a temperaturas que oscilan entre los 25 y 35°C, si bien resiste temperaturas bajas de hasta 5°C, lo que le permite alterar alimentos en refrigeración (Moreau, 1980).

Este hongo es capaz de metabolizar una gran cantidad de sustratos orgánicos e inorgánicos. Pequeñas cantidades de cloruro sódico estimulan el crecimiento del micelio y la germinación de las esporas. Tiene un mejor desarrollo a pH cercano a 4; pero tolera un amplio rango de pH (3-10), pudiendo crecer en presencia de un 5% de ácido láctico (Moreau, 1980). Precisamente esta capacidad para metabolizar el ácido láctico, provocando un aumento del pH del medio, interviene de forma decisiva en el proceso de elaboración del queso azul.

## 2.1 Características taxonómicas.

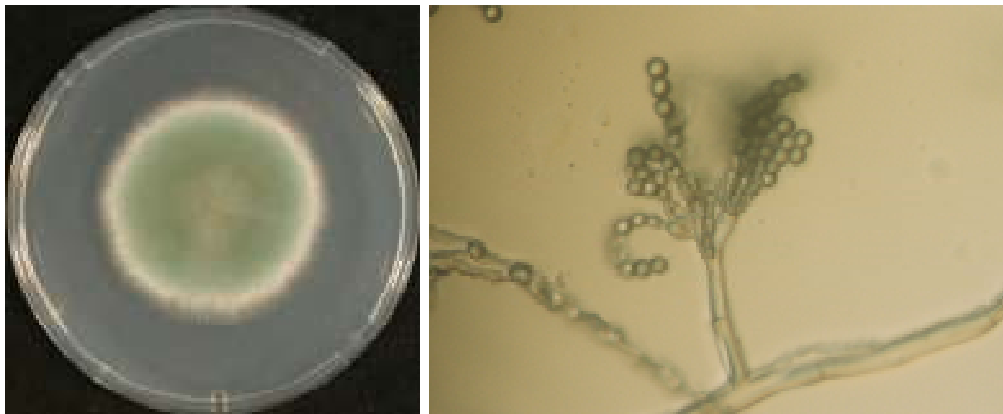
Tradicionalmente *P. roqueforti* ha sido identificado atendiendo a sus características morfológicas, así como por la morfología de las colonias que forma al crecer en determinados medios de cultivo. Los taxones, género y especie, quedaron definidos en base a características referidas al micelio, órganos de fructificación y al tamaño, número y forma de sus conidias, entre otras. La primera descripción de *P. roqueforti* como especie fue la realizada por Samson et al., (1977), la cual estuvo basada en las características anteriormente descritas.

Las descripciones morfológicas macroscópicas y microscópicas de *P. roqueforti* (Figura 3) están basadas fundamentalmente en colonias crecidas en diferentes medios



de cultivo estándares. En los medios agar CYA (*Czapek yeast autolysate*) y agar YES (*yeast-extract sucrose*), las colonias son de aproximadamente 40 mm de diámetro, color verde oliva marrón a verde opaco y al reverso de la placa de color verde oscuro a negro. Los órganos de fructificación se hallan todos a un mismo nivel, dando lugar al aspecto aterciopelado típico de las colonias. En medio MEA (*malt extract agar*) las colonias son de 50 mm de diámetro, color verde opaco y de color beige a verde grisáceo al reverso de la placa. Otra característica morfológica que distingue a esta especie es la producción de esporas asexuales en fiálides tomando la forma de cepillo (O'Brien et al., 2008).

Los estudios taxonómicos actuales integran el análisis morfológico tradicional con el uso de otra serie de técnicas tales como la hibridación de ácidos nucleicos, el análisis de los genes que codifican el ARN ribosomal y aspectos relativos a su fisiología y a la producción de metabolitos secundarios (Samson y Gams, 1984).



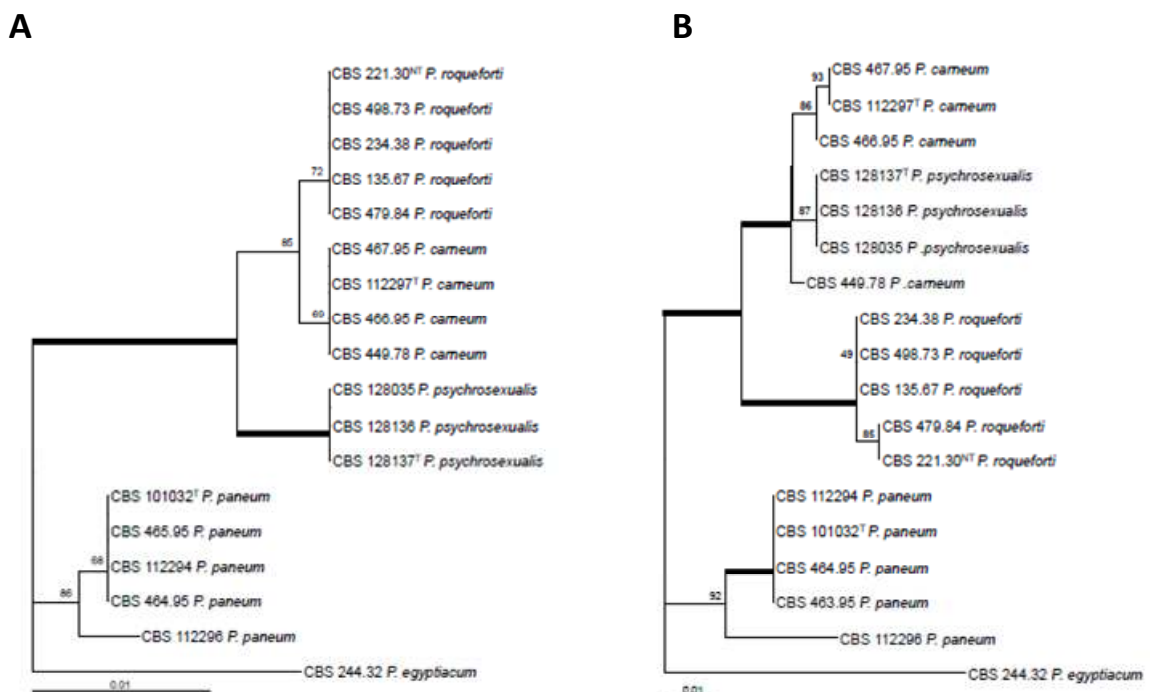
**Figura 3.** Morfología de *P. roqueforti*. (A) Morfología macroscópica. (B) Morfología microscópica (400 aumentos).

Basándose en criterios morfológicos (capacidad de difusión sobre medios de cultivo estandarizados y el análisis de sus perfiles bioquímicos) se consideró un grupo *P. roqueforti* que comprendía dos variedades: *P. roqueforti* var. *roqueforti*, usada en la fabricación del queso, y *P. roqueforti* var. *carneum* que es la cepa productora de patulina (Pitt, 1979; Frisvad, 1981; Blomquist et al., 1992; Lomascolo et al., 1994). Sin embargo, las modernas herramientas de genética molecular, combinadas con perfiles bioquímicos, pusieron de manifiesto la necesidad de reclasificar el grupo *Roqueforti* del género *Penicillium*, dividiéndolo en tres especies que fueron nombradas como: *P.*

*roqueforti*, *Penicillium carneum* y *Penicillium paneum* (Boysen *et al.*, 1996, 2000). Las tres especies presentaron similitudes morfológicas y fisiológicas. *P. roqueforti* aparece como la especie mayoritaria, seguida por *P. paneum* y en último lugar *P. carneum*, con una frecuencia de aislamiento menor al 6%.

Recientemente, Houbraken *et al.*, (2010) aislaron en Holanda a partir de manzanas una nueva especie de hongo la cual clasificaron dentro del grupo *Roqueforti* del género *Penicillium*, a la que nombraron como *Penicillium psychrosexualis*. La formación de cleistotecios a bajas temperaturas unido con una ubicación filogenética única, hicieron considerar a estos aislamientos como una nueva especie del grupo *Roqueforti*.

Así mismo, Houbraken *et al.*, (2010) realizaron estudios morfológicos y genéticos de aislamientos de la serie *Roqueforti*. Estos autores amplificaron y secuenciaron las regiones ITS y regiones parciales de los genes que codifican para la  $\beta$ -tubulina y calmodulina. Con estas secuencias se realizaron estudios filogenéticos (Figura 4) que unidos a las características morfológicas permitieron la clasificación de estos nuevos aislamientos.



**Figura 4.** Árbol filogenético de los aislamientos pertenecientes al grupo *Roqueforti* del género *Penicillium*. **(A)** Análisis de las secuencias génicas parciales de las regiones ITS. **(B)** Análisis de secuencias génicas parciales del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina.

### 3. Papel de *P. roqueforti* en la elaboración del queso azul. Producción de enzimas extracelulares.

*P. roqueforti* juega un papel fundamental en el proceso de elaboración del queso azul, cumpliendo dos funciones fundamentales:

1. Desacidificación de la pasta del queso, mediante la degradación del ácido láctico producido por la fermentación bacteriana.
2. Secreción de enzimas proteolíticas y lipolíticas cuya acción, junto con la de las bacterias lácticas, determina la textura, el sabor y el aroma final del queso.

*P. roqueforti* utiliza como fuente de carbono al ácido láctico resultante de la fermentación bacteriana de los carbohidratos presentes en la pasta del queso. La degradación rápida y casi total del ácido láctico por parte de *P. roqueforti* asegura la neutralización de la pasta. Además, aprovecha para su implantación y posterior desarrollo, las cavidades formadas por la producción de dióxido de carbono como consecuencia del metabolismo heterofermentativo de las bacterias lácticas (Figura 5).

Las enzimas extracelulares producidas por *P. roqueforti* juegan un papel muy importante en la elaboración de los quesos azules. De ellas se destacan dos endopeptidasas y tres exopeptidasas.

Entre las endopeptidasas encontramos la aspartilproteasa (Asp-A), proteasa ácida mayoritaria en numerosas especies de hongos y principal responsable de la acción proteolítica ejercida por *P. roqueforti* sobre la pasta de queso. La otra endopeptidasa es una metaloproteasa ácida. Las tres exopeptidasas incluyen dos carboxipeptidasas ácidas y una aminopeptidasa alcalina. *P. roqueforti* produce además dos lipasas, una lipasa ácida y otra alcalina (Fernández-Bodega et al., 2009; Larsen et al., 1998) de interés para la maduración del queso.

La acción proteolítica llevada a cabo por *P. roqueforti* sobre el queso recién cuajado es intensa y libera tanto péptidos de alto y bajo peso molecular, como aminoácidos. La aspartilproteasa es la enzima predominante en este proceso. Esta endopeptidasa junto con la metaloproteasa, son las encargadas de degradar las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$ .

La metaloproteasa actúa sobre las caseínas  $\beta$  al inicio del afinado de la masa. Su acción es menor que la llevada a cabo por la aspartilproteasa, la cual ataca las caseínas  $\beta$  en la parte final de dicho proceso. Los péptidos liberados por ambas enzimas sirven como sustrato para las tres exopeptidasas secretadas por *P. roqueforti*.

Estas enzimas son las responsables de las elevadas cantidades de aminoácidos presentes en la pasta de queso, parte de los cuales sufrirán desaminación enzimática para liberar amoníaco.



**Figura 5.** Fotografías que muestran el aspecto de quesos azules con oquedades colonizadas por *P. roqueforti*.

La presencia de ambos tipos de enzimas en la pasta de queso constituye un componente muy importante tanto para el aroma como para el sabor final del queso. Sin embargo, la principal propiedad organoléptica asociada a la acción proteolítica de *P. roqueforti* es, sin duda, la textura. Este hecho se explica por ser las proteínas la única fase sólida continua durante el proceso de elaboración del queso. Como resultado final de todo el proceso de degradación proteica, la masa de queso presentará una textura menos dura y a la vez menos elástica.

La actividad lipolítica debida a *P. roqueforti* sobre la masa de queso es predominante en comparación con la del resto de microorganismos presentes en dicho producto. Las dos lipasas fúngicas hidrolizan los triglicéridos dando lugar a diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

En los quesos azules la lipólisis llevada a cabo por este hongo origina más del 95% de los ácidos grasos libres. Paradójicamente, el exceso de estos ácidos grasos libres, en especial los de cadena media corta, inhiben la fermentación láctica. Gracias a la acción de la enzima beta-cetoacil-descarboxilasa fúngica, los ácidos grasos libres en exceso se transforman en metilcetonas de cadena media, las cuales rápidamente sufren un proceso de reducción enzimática dando lugar a sus correspondientes alcoholes secundarios.

Las metilcetonas y los alcoholes son compuestos muy volátiles y los principales responsables del fuerte aroma y del sabor cercano al picante característico del queso azul.

#### 4. Micotoxinas producidas por *P. roqueforti*.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos, las cuales son tóxicas para los vertebrados y otros animales cuando son introducidas en pequeñas concentraciones en su organismo a través de una vía natural (Jard *et al.*, 2011). Estos compuestos tienen la función, en la naturaleza, de proporcionar ventaja competitiva a los hongos que los producen, sobre otras especies de hongos y bacterias con las que conviven en el medio. Las micotoxinas tienen efecto citotóxico, alterando diferentes estructuras celulares como las membranas o interfiriendo procesos celulares vitales, tales como la síntesis de proteínas, ARN y ADN. En la mayoría de los casos también son tóxicas para las células de las plantas.

Las micotoxinas constituyen el mayor riesgo de contaminación alimentaria por hongos filamentosos, siendo introducidas al organismo principalmente por vía oral, junto con los alimentos.

Se ha comprobado a nivel de laboratorio que muchas de las cepas de *P. roqueforti* aisladas de quesos azules, de cereales y de frutos secos “mohosos”, son capaces de producir micotoxinas (Wells y Payne, 1975; López-Díaz *et al.*, 1996; Lugauskas *et al.*, 2006). La producción de micotoxinas ocurre, fundamentalmente, cuando la fase de crecimiento exponencial llega a su fin y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociada con la diferenciación y esporulación (Goldblatt, 1972). Los compuestos y sus niveles de producción dependen, en gran medida, de la composición del medio que sirve como sustrato al hongo.

Entre las micotoxinas producidas por especies del grupo *Roqueforti* del género *Penicillium* (Tabla 1) se encuentran la toxina PR, la patulina, la roquefortina C y el ácido micofenólico. Las 4 especies del grupo de *P. roqueforti* producen roquefortina C, que es una micotoxina neurotóxica. *P. paneum*, *P. carneum* y *P. psychrosexualis* producen patulina, una micotoxina mutagénica, inmunotóxica y neurotóxica. El ácido micofenólico tiene actividad inmunosupresora y es sintetizado por *P. roqueforti*, *P. carneum* y *P. psychrosexualis*. Finalmente la toxina PR, con capacidad mutagénica, es

exclusivamente producida por *P. roqueforti* (Boysen *et al.*, 2000; Frisvad *et al.*, 2004; Houbraken *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Micotoxinas producidas por las especies del grupo de *P. roqueforti*.

Especie, grupo <i>Roqueforti</i>	Toxinas sintetizadas
<i>Penicillium roqueforti</i>	Roquefortina C, ácido micofenólico y toxina PR.
<i>Penicillium carneum</i>	Roquefortina C, ácido micofenólico y patulina.
<i>Penicillium paneum</i>	Roquefortina C y patulina.
<i>Penicillium psychrosexualis</i>	Roquefortina C, ácido micofenólico y patulina.

La toxina PR fue aislada por primera vez por Wei *et al.*, (1973) asociándola a abortos y retención placentaria en ganado bovino debido a la ingestión de cereales contaminados por *P. roqueforti*. Posteriormente se ha logrado realizar aislamientos de toxina PR directamente de ensilados de hierba (O'Brien *et al.*, 2006), ensilados de plantas de maíz (Rasmussen *et al.*, 2010, 2011) y desechos de alimentos domésticos (Rundberget *et al.*, 2004) contaminados con *P. roqueforti*.

Desde el inicio varios estudios estuvieron encaminados a determinar si la toxina PR también era producida en quesos azules madurados con *P. roqueforti*. Scott, (1981) y Schoch *et al.*, (1984) detectaron esta micotoxina en concentraciones muy bajas en quesos azules. Los trabajos llevados a cabo por Scott y Kanhere, (1979) y Chang *et al.*, (1993) pusieron de manifiesto que la toxina PR se degrada durante el proceso de elaboración del queso azul.

Siemens y Zawistowski, (1992, 1993) detectaron la presencia de iminas y aminas derivadas de esta micotoxina en diferentes quesos azules, hecho que confirmó la degradación o modificación que sufre la toxina PR durante el proceso de maduración de dichos quesos. Estudios posteriores aseguran que ni la toxina PR ni sus precursores se encuentran presentes en cantidades detectables en los quesos azules (Finoli *et al.*, 2001).

El ácido micofenólico es conocido por su uso terapéutico, pero su acción está basada en sus propiedades farmacológicas siendo empleado como inmunosupresor en pacientes con trasplantes de riñón, hígado y corazón (Bentley, 2000).

Lafont *et al.*, (1979) analizaron varios quesos comerciales encontrando que 38 de ellos estaban contaminados con ácido micofenólico de un total de 100 muestras analizadas de 10 tipos diferentes de quesos. Los niveles de ácido micofenólico encontrados fueron de 0,01 a 15 partes por millón. Las concentraciones más altas estaban en quesos del tipo *Roquefort*, lo cual fue asociado a la maduración con *P. roqueforti*, hongo productor de ácido micofenólico. También López-Díaz *et al.*, (1996) analizaron muestras de quesos, pero esta vez de quesos españoles, 10 quesos manchegos y 10 quesos azules madurados de forma natural. A diferencia de Lafont *et al.*, (1979) no encontraron contaminación por ácido micofenólico en los quesos azules. Esto podía deberse a los métodos de extracción y determinación empleados y a las cepas de *P. roqueforti* involucradas en el proceso de maduración. En 4 muestras de quesos manchegos encontraron niveles bajos de ácido micofenólico.

Lafont *et al.*, (1979) consideran que es poco probable que el consumo de queso contaminado con ácido micofenólico pudiera causar toxicidad aguda, debido a las concentraciones relativamente bajas encontradas. Sin embargo, dadas las propiedades bioquímicas y antibióticas de este compuesto, es deseable que los alimentos lácteos comerciales que se consumen en grandes cantidades no estén contaminados con los niveles encontrados en algunas muestras.

En este sentido cabe señalar que en Estados Unidos la FDA (*Food and Drug Administration*) incluye a *P. roqueforti* dentro de los microorganismos pertenecientes al llamado grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*), grupo formado por todos aquellos organismos y sustancias cuyo uso en la alimentación no implica ningún tipo de riesgo para la salud humana.

## **5. Metabolismo secundario de *P. roqueforti*.**

*Penicillium roqueforti* produce una gran variedad de metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos son beneficiosos y están vinculados a los procesos de la maduración de los quesos azules y otros, como se ha mencionado anteriormente, tienen acción tóxica.

A continuación haremos una revisión de los aspectos fundamentales relacionados con el metabolismo de la toxina PR, la andrastina A y el ácido micofenólico. Estos compuestos son producidos por *P. roqueforti* y son objeto de estudio en esta memoria.

## 5.1 Metabolismo de la toxina PR.

Los sesquiterpenos son un grupo de compuestos cíclicos con una amplia variedad estructural que se caracterizan por tener una estructura terpenoide de 15 átomos de carbono. Son derivados biosintéticos del farnesil difosfato, y son compuestos típicos del metabolismo secundario de plantas terrestres y marinas, hongos y actinobacterias (Zidorn, 2006; Amand *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2012; Duraipandiyar *et al.*, 2012). Los sesquiterpenos se clasifican en acíclicos, monocíclicos, dicíclicos y tricíclicos (Fraga, 2011). En la actualidad existen más de 10.000 sesquiterpenos descritos con una amplia variedad de efectos biológicos, destacándose sus propiedades citotóxicas. Se han descrito sesquiterpenos con actividad antibiótica, citostática, neurotóxica e inmunosupresora (Sladic y Gasic, 2006; de Souza *et al.*, 2011; Julianti *et al.*, 2011; Orofino-Kreuger *et al.*, 2012). Otros son toxinas, como es el caso de la toxina PR, sesquiterpeno bicíclico sintetizado por el hongo *P. roqueforti* (Wei *et al.*, 1973).

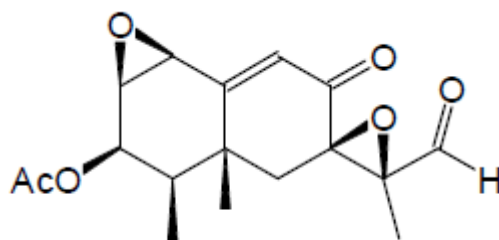
### 5.1.1 Aislamiento y caracterización de la toxina PR y compuestos afines.

Aunque *P. roqueforti* ha estado tradicionalmente asociado al proceso de maduración de quesos azules, también se puede encontrar comúnmente como contaminante de ensilados, granos, mezcla de granos o piensos para la alimentación animal cuyo almacenamiento tiene lugar en condiciones de microaerofilia.

En 1973 Wei *et al.* analizaron extractos tanto de cultivos puros de *P. roqueforti* NRRL 849, como de una cepa de la misma especie que fue aislada a partir de una mezcla de cereales y ensilados de planta de maíz contaminados y cuyo consumo se asoció a abortos y retención placentaria en vacas lecheras. Estos autores lograron purificar un compuesto puro que era letal en ratas. Usaron columnas de sílica gel y Sephadex para su separación y cromatografía de capa fina para la identificación. A este compuesto lo denominaron toxina PR, y su naturaleza química respondía a la fórmula molecular  $C_{17}H_{20}O_6$  con un peso molecular de 320,34. También se determinó la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) a dosis única en ratas por vía intraperitoneal y oral, obteniendo valores de 11 mg/kg y 115 mg/kg respectivamente.

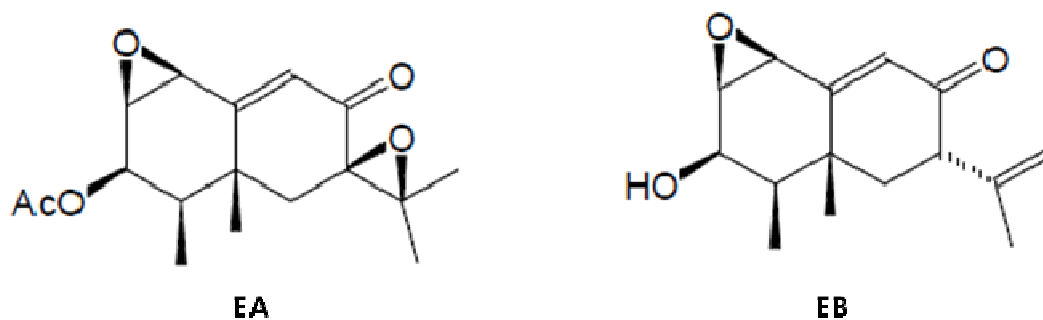
Dos años después Wei *et al.*, (1975) elucidan la fórmula estructural de la toxina PR mediante métodos químicos y espectrofotométricos (Figura 6). En la molécula de toxina PR se distinguen varios grupos funcionales: un radical aldehído, un radical acetoxilo, una  $\alpha, \beta$  cetona insaturada y dos radicales epóxido estables.





**Figura 6.** Estructura química de la toxina PR ( $C_{17}H_{20}O_6$ ).

En años posteriores fueron aislados un grupo de compuestos de estructura terpenoide producidos por *P. roqueforti* y relacionados directamente con la toxina PR. Estos compuestos recibieron el nombre genérico de eremofortinas. En 1976 Moreau *et al.* descubrieron la eremofortina A (EA) y eremofortina B (EB) (Figura 7).

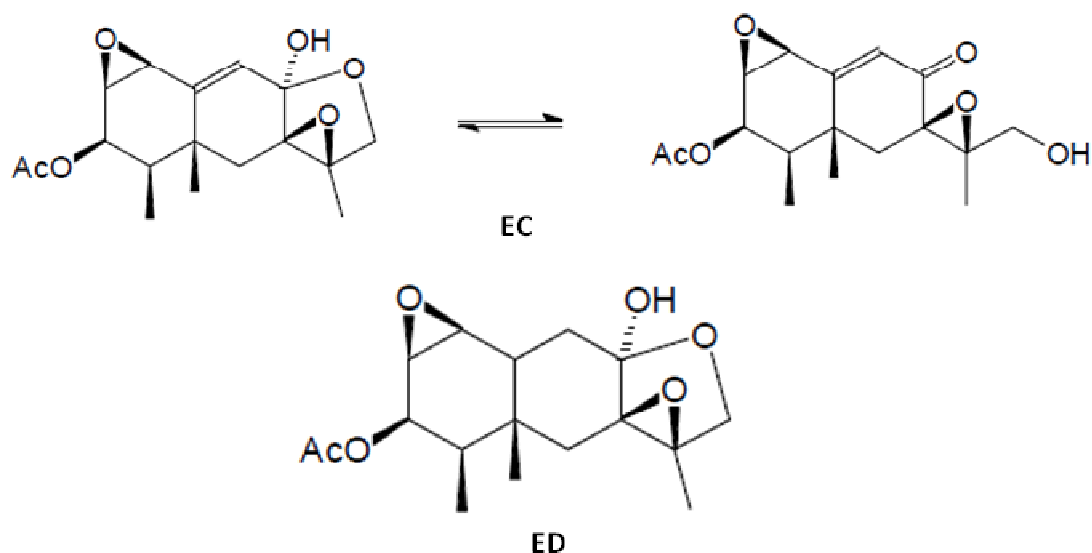


**Figura 7.** Estructura química de la eremofortina A (EA) y eremofortina B (EB).

Posteriormente, Moreau y Cacan, (1977) aportaron luz sobre las dos formas estructurales de la eremofortina C para que finalmente Arnoux *et al.*, (1977) completaran la descripción estructural de la eremofortina D (ED) (Figura 8).

Los trabajos de Moulé *et al.*, (1977) hacen un estudio comparativo entre la estructura química y la actividad biológica de la toxina PR y el grupo de las eremofortinas, con las que está biosintéticamente relacionada. Estos autores evaluaron la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de cada uno de estos compuestos, siendo la toxina PR el único que resultó tóxico. El estudio comparativo de las estructuras químicas les permitió concluir que la toxicidad de la toxina PR está vinculada al grupo aldehído, más reactivo, presente en el carbono doce de la molécula. Dado que la única

diferencia entre la toxina PR y la eremofortina C (que no tiene actividad tóxica) está situada en dicho radical aldehído.



**Figura 8.** Estructura química de la eremofortina C (EC) y eremofortina D (ED).

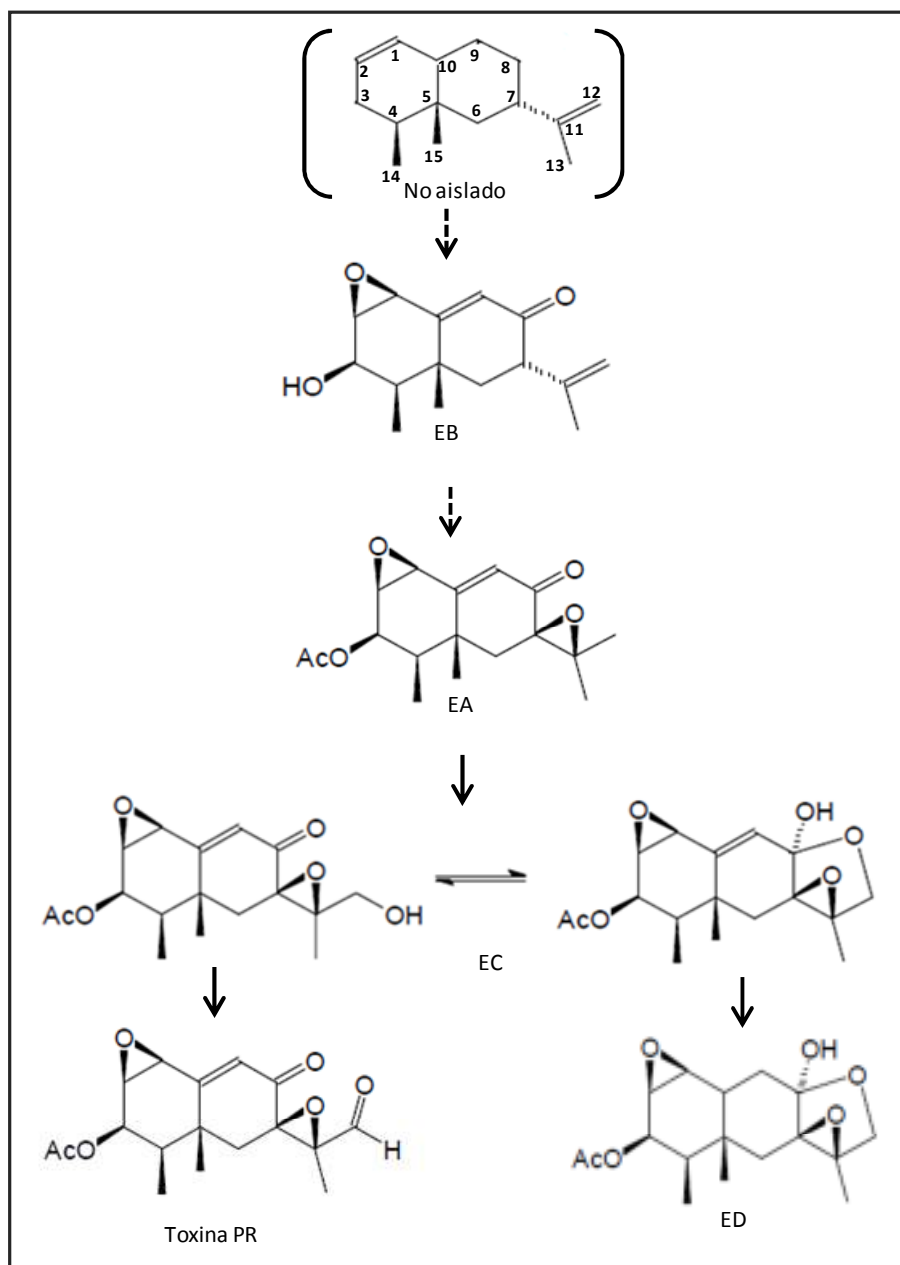
La toxina PR realiza su acción biológica inhibiendo la síntesis de proteínas y ARN (Moulé *et al.*, 1976, 1978). Concretamente, interfiere en la actividad de la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ADN polimerasa (Chen *et al.*, 1982), así como en la actividad de la  $\text{HCO}_3\text{-ATPasa}$  mitocondrial (Hsieh *et al.*, 1986). Además afecta a la respiración mitocondrial y a la fosforilación oxidativa en las células animales (Wei *et al.*, 1984).

### 5.1.2 Biosíntesis de la toxina PR.

Un grupo de trabajos realizados por diferentes autores permitió a Moreau *et al.*, (1980) establecer una hipotética ruta biosintética para la toxina PR en *P. roqueforti* (Figura 9).

Según estos autores, las diferencias estructurales de un grupo de compuestos estrechamente relacionados pueden servir como una base para crear hipotéticas vías biosintéticas. Para proponer la ruta biosintética de la toxina PR, Moreau *et al.*, (1980) se basaron en el hecho de que la EA, EB, EC, ED y la toxina PR son derivados de un

esqueleto carbonado común del tipo eremofilano. Este esqueleto surge de la ciclación del farnesil difosfato y aparece representado en la Figura 9 como no aislado.



**Figura 9.** Ruta biosintética de la toxina PR propuesta por Moreau *et al.*, (1980).

En la ruta propuesta (Figura 9) la EC es el precursor directo de dos compuestos, la toxina PR y ED. La oxidación del grupo OH del carbono de la posición doce (C12) de la EC da como resultado la toxina PR y mediante la reducción del doble enlace entre los carbonos nueve y diez se forma la ED.

La evidencia de que los valores máximos de producción de toxina PR estaban siempre precedidos de valores máximos de EC, permitió respaldar a este compuesto como su precursor directo. Además, el descenso de la cantidad de EC presente en el medio de cultivo se correspondió con un aumento de la cantidad de toxina PR detectada en dicho medio.

La EC y la toxina PR son compuestos con estructuras químicas muy relacionadas que sólo se diferencian en el cambio de un grupo alcohol por un grupo aldehído en el carbono de la posición doce. La enzima responsable de este paso fue aislada y caracterizada por Chang *et al.*, (1985). Esta proteína es una oxidasa de 40 KDa de peso molecular que fue purificada tanto del micelio como del caldo procedente de un cultivo de *P. roqueforti*. Se caracteriza porque en su mayoría es secretada al medio de cultivo donde alcanza los máximos niveles a los 13 días de incubación, momento en el que se detecta la máxima producción de toxina PR.

En esta línea, Li *et al.*, (1985) estudiaron la transformación química de EC en toxina PR, logrando los mejores resultados con un complejo anhídrido crómico-piridina como molécula intermediaria.

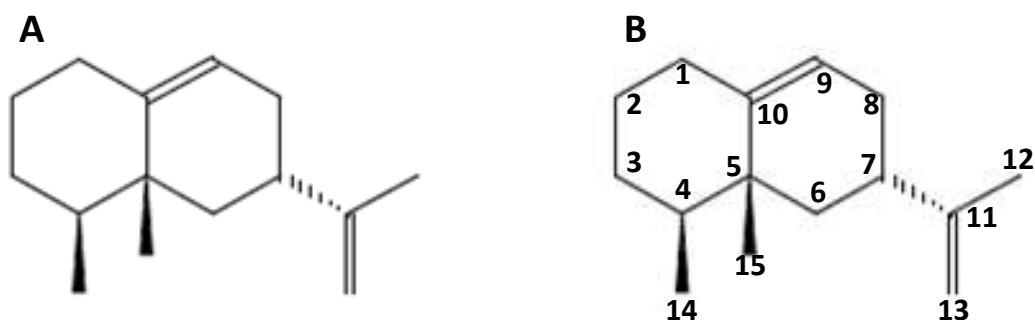
Siguiendo con el esquema propuesto en la Figura 9, la EA es probablemente un precursor directo de la EC por una reacción de hidroxilación simple en el carbono doce. Sin embargo, son necesarios varios pasos para la previa transformación de eremofortina B a eremofortina A. Al publicar su trabajo Moreau *et al.*, (1980) no conocían qué compuesto serviría de enlace entre las sustancias procedentes del metabolismo primario del hongo y las micotoxinas resultantes de su metabolismo secundario. Aun así sospechaban que al tratarse de una toxina de naturaleza terpenoide, el esqueleto carbonado de la toxina PR se formaría a partir de la ciclación de la molécula de farnesil difosfato.

### **5.1.3 Aristoloqueno, posible molécula precursora para la biosíntesis de la toxina PR.**

El aristoloqueno fue aislado por primera vez de las raíces de la planta *Aristolochia indica* (Govindachari *et al.*, 1970), a la cual debe su nombre. El aristoloqueno ha sido encontrado con frecuencia en otras fuentes del reino vegetal como en el aceite de las

hojas de *Bixa orellana* (Lawrence y Hogg, 1973), en *Nicotiana tabacum* (Vögeli *et al.*, 1990) y en *Hyoscyamus muticus* (Back y Chappell, 1995).

En 1987 se aisló la molécula de aristoloqueno del hongo *Aspergillus terreus* (Cane *et al.*, 1987). Años después los trabajos tanto de Zeringue *et al.*, (1993) como de Pasanen *et al.*, (1996) pusieron de manifiesto la correlación existente entre la biosíntesis de sesquiterpenos y la producción de micotoxinas. El aristoloqueno [(4*S*,4*aR*,6*S*)-6-Isopropenil-4,4*a*-dimetil-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1*H*-naftaleno] (Figura 10A) es un sesquiterpeno del grupo de los eremofilanos (Figura 10B) y es considerado el principal precursor de las micotoxinas sesquiterpenoides producidas por un gran número de hongos filamentosos.



**Figura 10.** Estructura química del Aristoloqueno (A) y del esqueleto carbonado del grupo de los eremofilanos (B).

La conformación espacial de la molécula de aristoloqueno depende en gran medida de la naturaleza de la fuente a partir de la cual ha sido aislado. De manera que, por ejemplo, su enantiómero (-) se encuentra presente en los extractos de las especies *Aristolochia indica* y *Duroia hirsuta*; mientras que el enantiómero (+) aparece en el aceite balsámico derivado del árbol *Dipterocarpus alatus* (Klein y Rojahn, 1970) y en los extractos de la especie vegetal *Porella arboris-vitae*. Fuera del reino vegetal, el enantiómero (-) del aristoloqueno ha sido aislado además a partir de la secreción de la glándula frontal de las termitas soldado del género *Syntermes* (Baker *et al.*, 1981).

En el caso de los hongos filamentosos, se cree que la formación del enantiómero (+) del aristoloqueno constituye el primer paso en la biosíntesis de un gran número de micotoxinas, entre las que destacan la toxina PR en *P. roqueforti* y el esporógeno AOI producido por *Aspergillus oryzae* (Proctor y Hohn, 1993).

#### 5.1.4 Características generales de la aristoloqueno sintasa Ari1, enzima responsable de la biosíntesis de aristoloqueno.

La aristoloqueno-sintasa (Ari1) es una terpenoide ciclasa aislada de *P. roqueforti* (Hohn and Plattner, 1989), la cual cataliza la ciclación de farnesil difosfato para formar aristoloqueno. Existen otras terpenociclasas como la pentaleneno sintasa de *Streptomyces* UC5319, que cataliza la síntesis de pentaleneno y la epi-aristoloqueno sintasa, que lleva a cabo la ciclación del farnesil difosfato para dar lugar a epi-aristoloqueno en la especie *N. tabacum* (Caruthers *et al.*, 2000).

El farnesil difosfato es el precursor universal de innumerables sesquiterpenoides cíclicos, por lo que cada sesquiterpeno ciclasa juega un papel fundamental en el resultado estructural y estereoquímico de la reacción de ciclación. Como consecuencia se conoce que las reacciones de las diferentes sesquiterpeno ciclasas dan lugar a una amplia variedad de compuestos partiendo de un único sustrato.

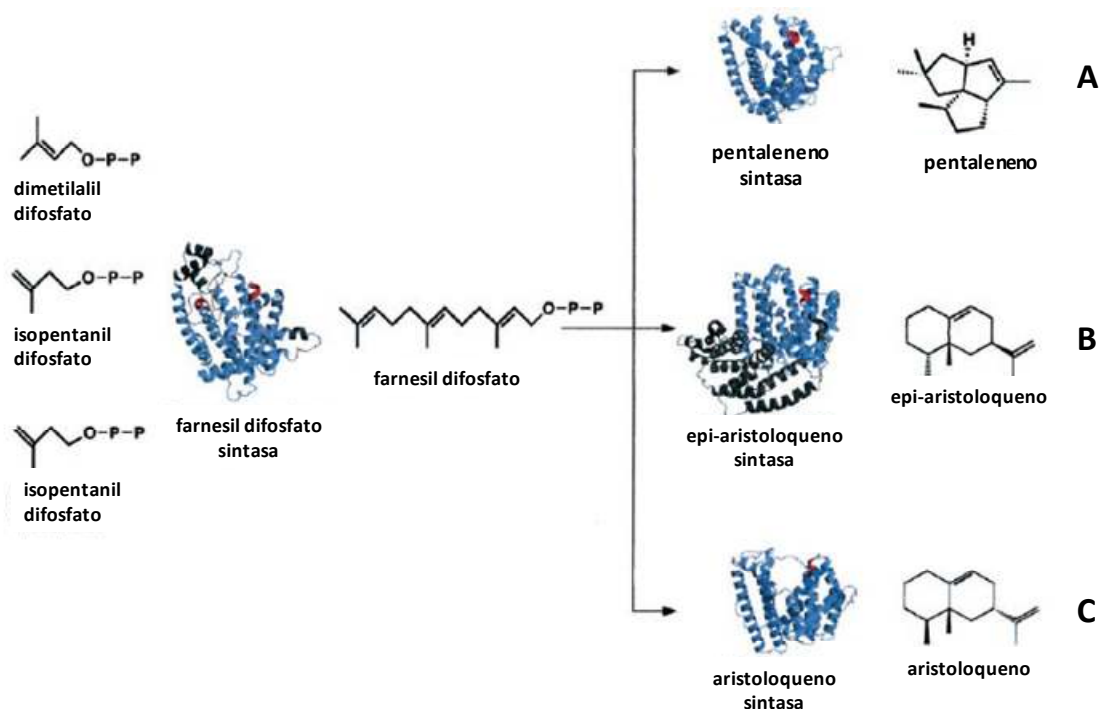
Ari1 es una proteína monomérica de 38 KDa de tamaño, carente tanto de motivos transmembranales como de motivos de unión a membrana. El gen que codifica esta enzima, *ari1*, en *P. roqueforti* fue clonado y sobreexpresado en *Escherichia coli* (Cane *et al.*, 1993; Proctor y Hohn, 1993). La estructura cristalina de la enzima Ari1 fue dilucidada por Caruthers *et al.*, (2000). Posteriormente, fue aislada y caracterizada una aristoloqueno-sintasa homóloga en el hongo *A. terreus* (Cane y Kang, 2000).

Cuando la secuencia completa de aminoácidos que constituye la proteína Ari1 se comparó con las secuencias de aminoácidos que aparecen en las bases de datos, se encontró que, únicamente una región rica en aspártico y compuesta por 7 aminoácidos, LIDDVLE, presentaba homología significativa con otras proteínas. Esta secuencia se corresponde con un motivo altamente conservado, (I, L, V) XDDX (D, E), que ha sido hallado en todas las enzimas de tipo monoterpeno, diterpeno y sesquiterpeno-sintasas. Además, el citado motivo está relacionado, estructural y funcionalmente, con otra clase de enzimas, las preniltransferasas, al estar implicado en la unión del ión divalente  $Mg^{2+}$ , cofactor necesario para las reacciones catalizadas por ambos tipos de enzimas.

El análisis de la estructura cristalina de Ari1 clasifica a esta enzima dentro de la clase I de las terpenoide-ciclasas  $\alpha$ -helicoidales. Todas estas proteínas se caracterizan

por presentar un total de 11  $\alpha$ -hélices, 6 de las cuales se encuentran rodeando una hendidura en cuyo interior se sitúa el centro activo de la enzima.

Al comparar la estructura tridimensional de la aristoloqueno sintasa de *P. roqueforti* con la estructura cristalina de otra serie de enzimas, se comprobó que Ari1 presenta un alto grado de homología con otras dos sesquiterpeno ciclasas: la pentaleneno sintasa de *Streptomyces* UC5319 y la epi-aristoloqueno sintasa de *N. tabacum* (Figura 10). Además de las dos sesquiterpeno ciclasas, Ari1 presenta homología con una farnesil difosfato sintasa aislada de hígado de ave. La similitud entre estas cuatro enzimas procedentes de organismos no próximos filogenéticamente refleja, presumiblemente, un modo de acción similar basado en el hecho de que todas ellas catalizan reacciones electrofílicas de ionización de moléculas de tipo alildifosfatoésteres. Así mismo, podría tratarse de una prueba concluyente que apoyaría la hipótesis de un posible origen evolutivo común para esta clase de enzimas (Caruthers *et al.*, 2000). El gen que codifica esta enzima puede haberse transferido de bacterias (*Streptomyces*) a hongos y plantas, o viceversa, por transferencia horizontal (HGT, horizontal gene transfer).

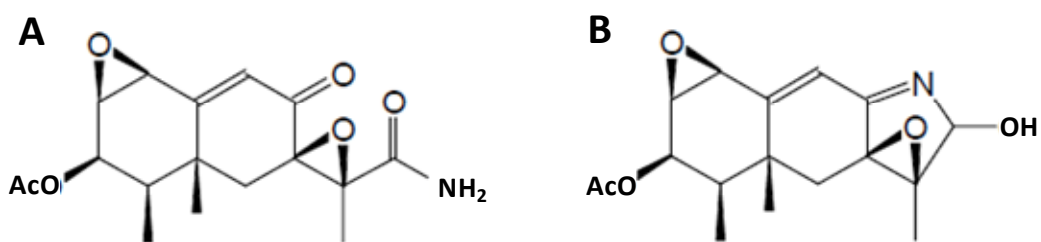


**Figura 11.** Rutas biosintéticas propuestas para diferentes sesquiterpenos: **(A)** pentaleneno sintasa de *Streptomyces* UC5319; **(B)** epi-aristoloqueno sintasa de *N. tabacum* y **(C)** Aristoloqueno sintasa de *P. roqueforti* (según datos de Caruthers *et al.*, (2000)).

### 5.1.5 Metabolitos secundarios resultantes del proceso de transformación de la toxina PR.

Scott y Kanhere, (1979) describieron la inestabilidad de la toxina PR en extractos de queso azul así como en el propio queso. Estos autores demostraron que la toxina PR reacciona con aminoácidos básicos y neutros formando PR-imina. Para explicar este hecho propusieron que los grupos amino de los compuestos nitrogenados podrían reaccionar con el radical aldehído de la toxina PR, convirtiéndola en una molécula inestable.

Posteriormente en 1993 Chang *et al.*, (1993) observaron que en cultivos de *P. roqueforti* los valores máximos de toxina PR se alcanzaban a los 15 días de fermentación no siendo detectada en los días 3-4 de cultivo. Por otro lado, a partir de estos cultivos lograron aislar y purificar dos compuestos asociados a la degradación de la toxina PR. Estos compuestos fueron identificados como PR-imina ( $C_{17}H_{21}O_5N$ ) y PR-amida ( $C_{17}H_{21}O_6N$ ), que, a diferencia de la toxina PR, presenta un radical tipo amida en su carbono 12 (Figura 12).



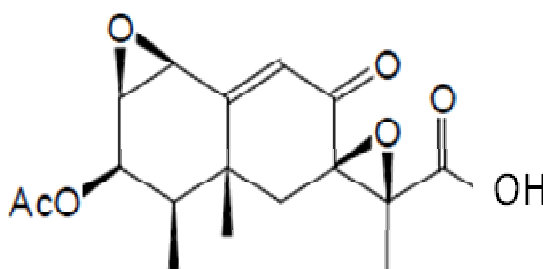
**Figura 12.** Estructura química de la PR-amida (A); y de la PR-imina (B).

La PR-imina es un metabolito inestable, cuya presencia en el medio de cultivo desciende desde su nivel máximo hasta cero en apenas 2 días. Sin embargo la PR-amida es una molécula estable que se mantiene en su máxima concentración durante varios días. Así mismo, estos autores comprobaron cómo la PR-imina era detectada una vez que la toxina PR había sido degradada, concluyendo, que la PR-imina sería



un producto final del proceso de degradación de esta micotoxina. En cuanto a la PR-amida, de acuerdo con su estructura química y su presencia en el medio de cultivo de forma simultánea a la degradación de la toxina PR, se podría considerar como un producto intermedio resultante del catabolismo de dicha toxina.

Tres años después Chang *et al.*, (1996) aislaron e identificaron el ácido PR, otro metabolito procedente de la ruta de degradación de la toxina PR. El ácido PR tiene como composición química  $C_{17}H_{21}O_7$  difiriendo de la de la toxina PR ( $C_{17}H_{21}O_6$ ) en que tiene en el carbono de la posición 12 un grupo carboxilo en lugar del grupo aldehído (Figura 13). Posteriormente este mismo grupo de autores purificaron la enzima PR-oxidasa, responsable de la conversión de toxina PR en ácido PR (Chang *et al.*, 1998). La PR-oxidasa es una enzima de aproximadamente 88 kDa, que alcanza su máxima actividad a los 22 días de incubación en medio YES con extracto de maíz. Esta enzima transforma de manera específica la toxina PR en ácido PR, ya que en este mismo trabajo se demostró su incapacidad para utilizar la eremofortina C como sustrato.

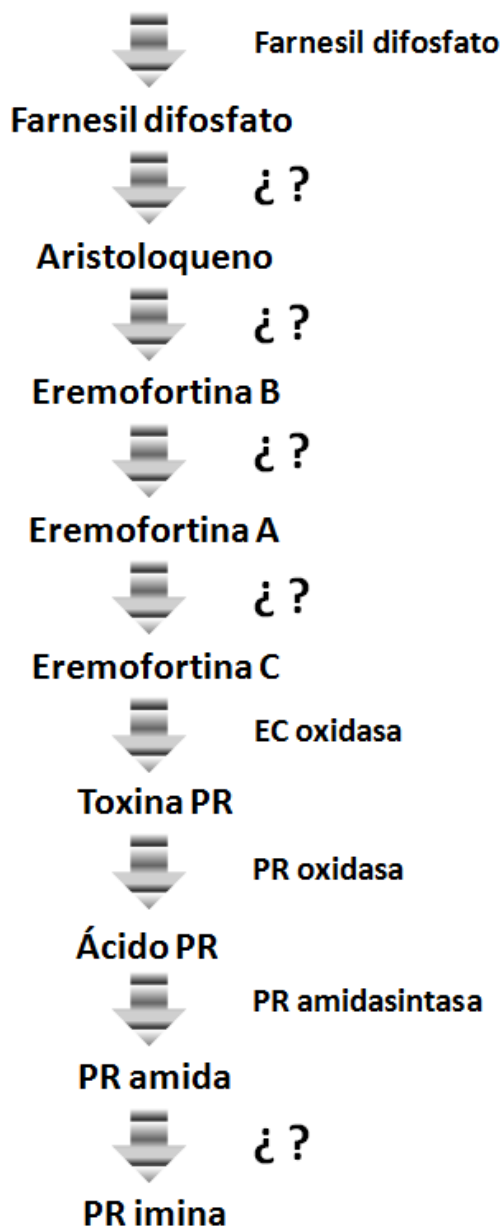


**Figura 13.** Estructura química de PR ácido.

Por último, gracias a estudios más recientes se ha avanzado un paso más en el conocimiento de la ruta de degradación de esta toxina al ser caracterizada la PR-amida sintetasa, enzima encargada de la conversión de ácido PR en PR-amida (Chang *et al.*, 2004).

Los conocimientos actuales sobre la ruta biosintética y la degradación de la toxina PR en *P. roqueforti* aparecen en un esquema recogido en la Figura 14. En dicho esquema se presentan los intermediarios y productos de degradación de la toxina PR así como las enzimas conocidas, señalando con interrogantes las desconocidas.

**(1) Dimetilalildifosfato + (2) Isopentenildifosfato**



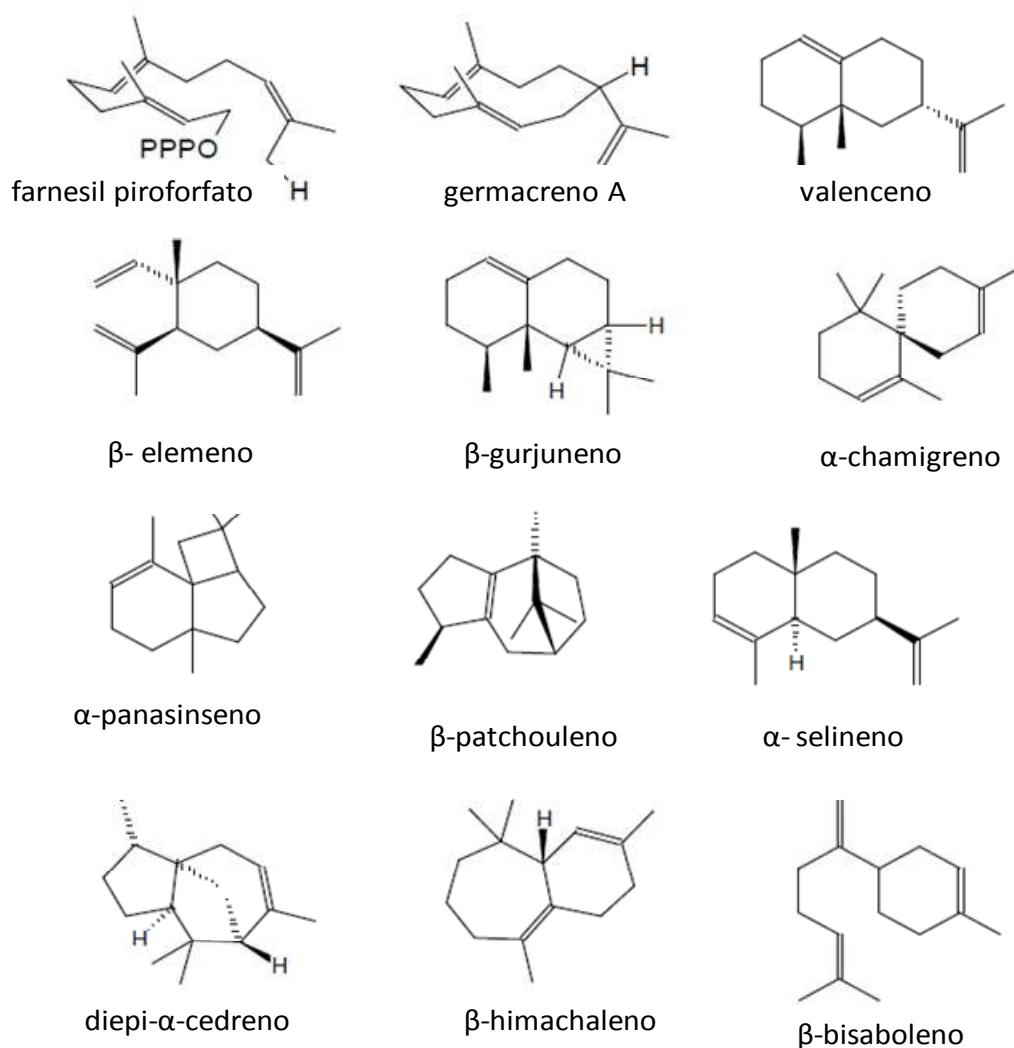
**Figura 14.** Esquema propuesto para la biosíntesis y degradación de toxina PR en *P. roqueforti*.

**5.1.6 Perfil quimiotaxonómico de las cepas productoras de toxina PR.**

Demyttenaere *et al.*, (2002) y (Jelen, 2002) trabajaron en la detección de los sesquiterpenos volátiles que actúan como intermediarios de las diferentes rutas metabólicas que tienen lugar en *P. roqueforti*. Para ello usaron técnicas de

microextracción en fase sólida, seguido del análisis por cromatografía de gases capilar con detector de masas (GC-MS). Estos estudios han permitido consolidar la idea de que, como se indicó anteriormente, la enzima aristolocheno-sintetasa (AS) es la responsable, en *P. roqueforti*, de ciclar el farnesil difosfato hasta aristoloqueno, el cual, a su vez, se considera el precursor biogénico de la toxina PR.

Estos autores unidos a Calvert *et al.*, (2002) propusieron el perfil de componentes volátiles que permite diferenciar quimiotaxonómicamente las cepas productoras de la toxina PR de aquellas que no la pueden biosintetizar. Junto al farnesil difosfato estos autores proponen al germacreno A, valenceno,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -gurjuneno,  $\alpha$ -chamigreno,  $\alpha$ -panasinseno,  $\beta$ -patchouleno,  $\alpha$ -selineno, diepi- $\alpha$ -cedreno,  $\beta$ -himachaleno y  $\beta$ -bisaboleno como compuestos volátiles de las cepas productoras de toxina PR (Figura 15). Los autores subrayaron que estos marcadores químicos, detectables por GC-MS, estaban ausentes tanto en las cepas de *Penicillium roqueforti* no toxigénicas como en las otras cepas de *Penicillium* sp. que fueron analizadas. La identificación de los metabolitos secundarios puede ayudar a la labor de diferenciación taxonómica, pero hay que tener en cuenta que las rutas biogénicas son dependientes de las condiciones de cultivo, por lo que estos resultados se deben tomar con la debida cautela (Scott *et al.*, 1977; Shimp y Kinsella, 1977; Maheva *et al.*, 1984; Gock *et al.*, 2003). Es por ello que Jelen (2002) estudió la influencia de las condiciones de cultivo (temperatura y contenido de agua en el medio) y concluyó que, si bien éstos influyen en la cantidad de sesquiterpenos producidos (análisis cuantitativo), no lo hacen en su perfil (análisis cualitativo), el cual resultó único y característico de las cepas tóxicas.



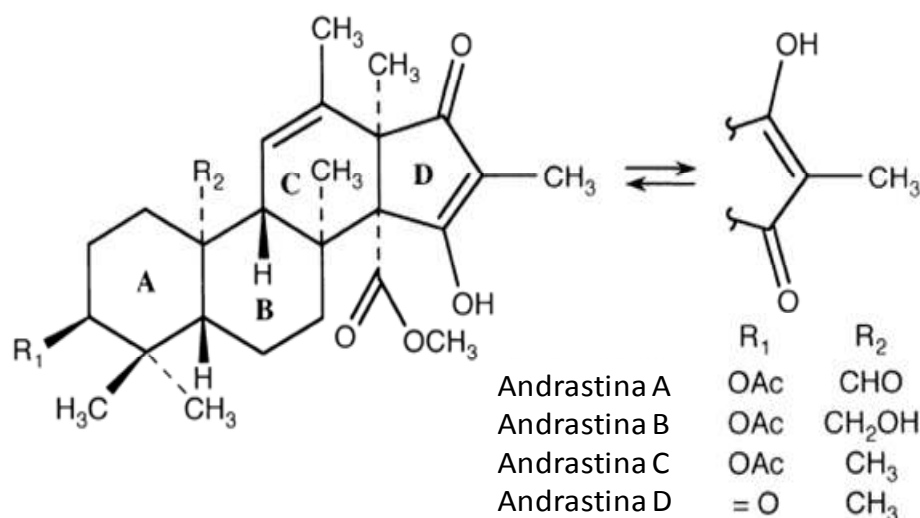
**Figura 15.** Marcadores químicos de la ruta biosintética de toxina PR.

## 5.2 Metabolismo de las andrastinas.

### 5.2.1 Aislamiento y estructura química.

Omura *et al.*, (1996) descubrieron un grupo de compuestos meroterpenoides a partir del hongo filamentoso *Penicillium sp.* FO-3929 aislado del suelo en Tokio, al que nombraron andrastinas. Estos compuestos fueron obtenidos a partir del caldo metabólico de cultivos de esta cepa en medio complejo tras extracciones con acetato de etilo.

Hasta la fecha se han descrito cuatro tipos distintos de andrastinas: andrastina A, andrastina B, andrastina C y andrastina D (Uchida *et al.*, 1996b) las cuales se caracterizan por tener un esqueleto común del tipo androsteno (Figura 16).



**Figura 16.** Estructura química de la Andrastina A, B, C y D.

La estructura química de estos compuestos fue elucidada mediante estudios de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (espectroscopia correlacionada) y HMBC (correlación heteronuclear a varios enlaces) que permitieron establecer los anillos A, B y C de la andrastina A (Figura 16). Sin embargo quedaban partes de la estructura que no se pudieron identificar. De tal forma que el tautomerismo ceto enólico del anillo D hizo difícil dilucidar dicha estructura, siendo posible únicamente por experimentos de desacoplamiento de spin  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  (*spin decoupling*) usando andrastina A con  $^{13}\text{C}$  marcado (Uchida *et al.*, 1996a).

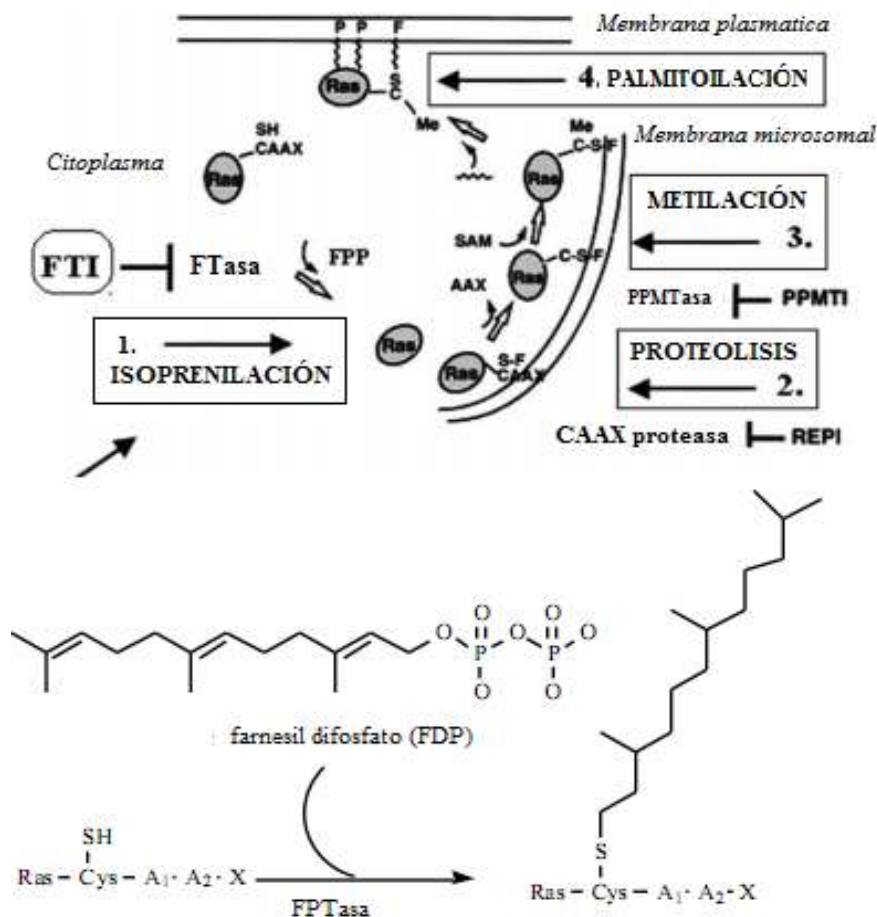
### 5.2.2 Actividad biológica y mecanismo de acción.

Este grupo de compuestos acaparó la atención debido a su actividad anticancerígena como inhibidores *in vitro* de la enzima farnesiltransferasa (FPTasa) de la proteína oncogénica Ras. Lo citado es recogido en el trabajo de Omura *et al.*, (1996), los cuales determinaron la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de la andrastina A, B y C frente a farnesiltransferasa parcialmente purificada de células humanas THP-1.

Las proteínas Ras (pequeñas GTPasas) son un conjunto de interruptores-reguladores moleculares muy importantes en una gran variedad de vías de transmisión de señales celulares. Dichas señales controlan los fenómenos de integridad del citoesqueleto, la apoptosis, la proliferación, la diferenciación, la adhesión y la migración celular (Graaf *et al.*, 2004). Aproximadamente un 30% de los tumores

malignos en humanos están relacionados con un funcionamiento anómalo de las proteínas RAS, provocando un aumento en la capacidad de invasión y metástasis, junto con una disminución de la apoptosis (Bos, 1989).

Una característica importante de la mayoría de estas proteínas es que son modificadas post-traduccionalmente por lípidos. Estas modificaciones son esenciales para favorecer su asociación con la membrana, determinar su localización subcelular y poder dar respuesta a las señales extracelulares (Margaritora *et al.*, 2005). El primer paso de las modificaciones post-traduccionales de la proteína Ras es la farnesilación, la cual es catalizada por la enzima farnesiltransferasa (Figura 17).



**Figura 17.** Modificaciones post-traduccionales de las proteínas Ras y mecanismo de acción de los inhibidores de la FPTasa.

La farnesiltransferasa es identificada como una de las dianas para el tratamiento de los tumores malignos debido a la importante acción que cumple esta enzima para la

modificación que permite el anclaje de las proteínas Ras en la membrana y así ejercer su acción favoreciendo la proliferación celular.

### 5.2.3 Ruta biosintética de la andrastina A.

Uchida *et al.*, (1996a) proponen que la andrastina A, al igual que el citreohibridonol (Kosemura *et al.*, 1992, 1994), es sintetizada a partir de un sesquiterpeno y un tetraquetido (Figura 18). Esta afirmación se basa en el hecho de que al incorporar acetatos marcados con  $^{13}\text{C}$  a andrastina A obtuvieron resultados coincidentes con los que obtuvieron con el citreohibridonol. Desde entonces no se ha profundizado en la investigación de esta vía biosintética.

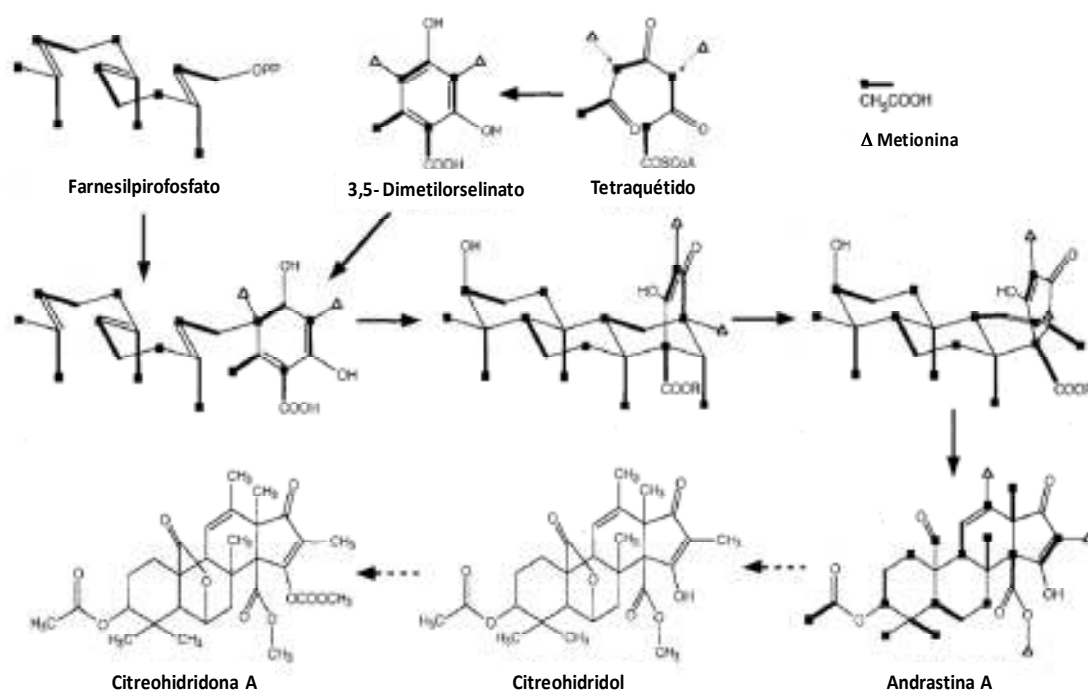


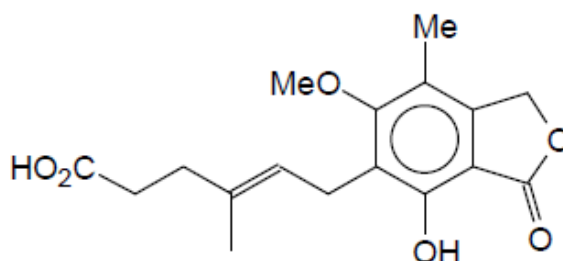
Figura 18. Ruta biosintética de andrastina A propuesta por Uchida *et al.*, (1996a).

## 5.3 Metabolismo del ácido micofenólico.

### 5.3.1 Asilamiento e identificación del ácido micofenólico.

Un médico italiano llamado Bartolomeo Gosio aisló a partir de maíz contaminado con hongos un compuesto cristalino el cual asoció con la aparición de la enfermedad

de pelagra. Dicho compuesto inhibía el crecimiento de *Bacillus anthracis*, siendo el primer antibiótico de origen fúngico cristalizado (Gosio, 1893, 1896). La producción de este metabolito fúngico se realizó tras el crecimiento de *Penicillium* en un medio de cultivo definido conocido como solución de Braulin. En 1913 investigadores del Departamento de Agricultura de Estados Unidos obtuvieron a partir de un cultivo de *Penicillium stoloniferum*, aislado de maíz, un metabolito secundario al que nombraron ácido micofenólico (Alsberg y Black, 1913). Años después se llegó a la conclusión de que el ácido aislado por Gosio y el ácido micofenólico de Alsberg y Black era el mismo compuesto (Clutterbuck *et al.*, 1932). Este criterio es aceptado en la actualidad, considerándose que el ácido micofenólico fue descubierto por el médico italiano Bartolomeo Gosio en 1893.



**Figura 19.** Estructura química del ácido micofenólico.

El ácido micofenólico (Figura 19) tiene como fórmula global ( $C_{17}H_{20}O_6$ ) y una masa molecular de 320,4 g/mol.

### 5.3.2 Propiedades biológicas y mecanismo de acción del ácido micofenólico.

Inicialmente Gosio, (1896) describió la actividad antibiótica del ácido micofenólico ya que inhibía el crecimiento del bacilo del ántrax, *B. anthracis*. Posteriormente se fueron estudiando otras acciones biológicas del ácido micofenólico, como su actividad antiviral (Diamond *et al.*, 2002; Borroto-Esoda *et al.*, 2004), antifúngica (Nicoletti *et al.*, 2004), antibacteriana (Torrenegra *et al.*, 2005), antitumoral (Tressler *et al.*, 1994) y antipsoriasis (Epinette *et al.*, 1987). Pero su actividad biológica más importante es su capacidad inmunosupresora, ya que se usa para evitar el rechazo de órganos en pacientes con trasplantes de riñón, corazón e hígado.

En la actualidad, se comercializa bajo la marca CellCept (micofenolato de mofetilo, Roche) y Myfortic (micofenolato sódico, Novartis). El micofenolato de mofetilo es un



profármaco que gracias a un proceso de desesterificación que ocurre en el estomago, intestino delgado y probablemente hígado, se convierte en ácido micofenólico en el organismo del paciente. El micofenolato de sodio es una sal que evita la degradación del ácido micofenólico en la parte superior del tracto gastrointestinal, permitiendo su liberación en el intestino.

El ácido micofenólico afecta a la proliferación celular de los linfocitos T y B interfiriendo en la síntesis de ácidos nucleicos. Actúa inhibiendo directamente la inosina-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima que cataliza la biosíntesis de guanosina-monofosfato (GMF). Esta reacción constituye un paso crítico en la vía de la síntesis de novo de los nucleótidos de purina (Smith *et al.*, 1974). La gran mayoría de las células del organismo humano son capaces de usar una vía alternativa cuando la vía de novo se ve afectada, mientras que los linfocitos T y B no presentan esta vía alternativa por lo que son IMPDH-dependientes. A esto se debe el carácter selectivo de la actividad del ácido micofenólico.

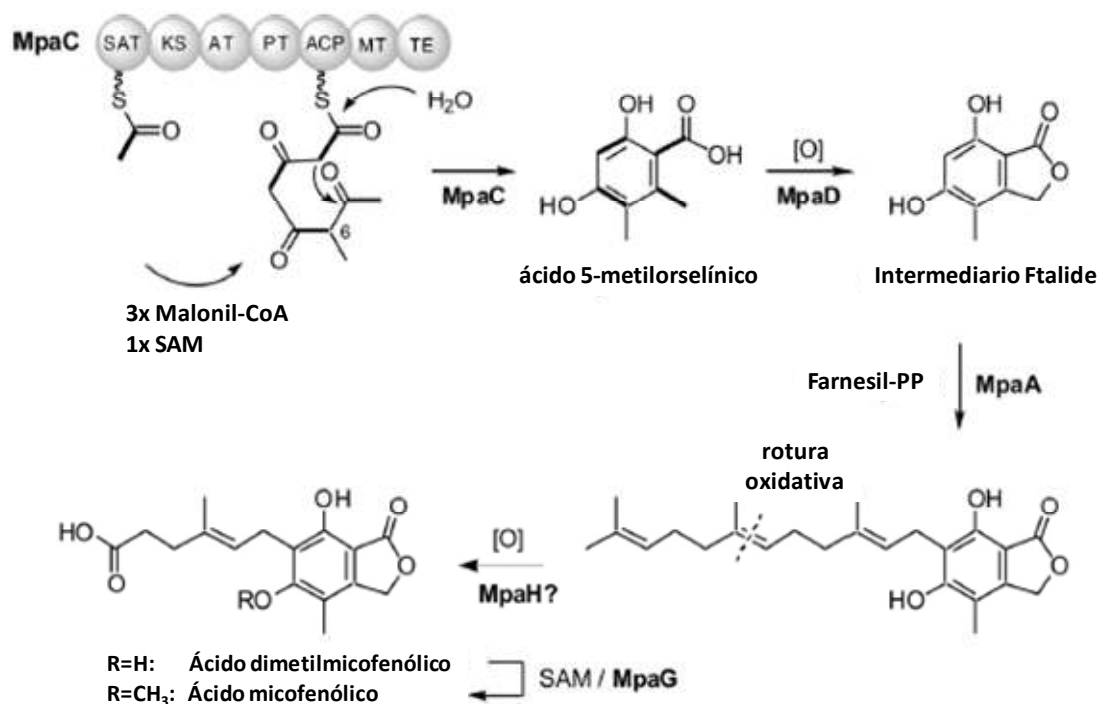
### 5.3.3 Biosíntesis del ácido micofenólico.

El ácido micofenólico es un meroterpenoide con un núcleo ftalida y una cadena lateral de naturaleza terpenoide. El origen a partir de acetato del núcleo ftalida permite identificar a esta parte de la molécula como un poliquétido. La síntesis de los poliquétidos está catalizada por las poliquétido sintasas (PKS), las cuales están estructural y mecánicamente relacionadas con las ácido graso sintasas (Crawford y Townsend, 2010).

Partiendo de la suposición de que un organismo es resistente al metabolito que produce, Regueira *et al.*, (2011) descubrieron una agrupación génica involucrada en la síntesis del ácido micofenólico en *P. brevicompactum*. Estos autores buscaron agrupaciones génicas que contenían el gen que codificara la IMPDH suponiendo que una mayor disponibilidad de la enzima le aportaría tolerancia al ácido micofenólico. Esta estrategia les permitió identificar la agrupación génica que contiene el gen *mpaC* que codifica para la poliquétido sintasa (MpaC) responsable de la síntesis del ácido micofenólico en *P. brevicompactum*. Los mutantes defectivos en el gen *mpaC* perdieron la capacidad de producir ácido micofenólico.

La ruta biosintética propuesta por Regueira *et al.*, (2011) se inicia con el montaje de un tetraquétido metilado no reducido (ácido 5-metilorselínico) (Figura 20). Por lo

tanto, la poliquétido sintasa del ácido micofenólico al menos contiene dominios para la unidad iniciadora de las proteínas transciclasas transportadoras de acilo (SAT), para una  $\beta$ -quetoacilsintasa (KS), para la aciltransferasa del producto (AT), para la proteína transportadora de acilo (ACP) y para una metiltransferasa (MT).



**Figura 20.** Ruta biosintética del ácido micofenólico en *P. brevicompactum* a partir de acetil-CoA y malonil-CoA propuesta por Regueira *et al.*, (2011).

En la ruta biosintética propuesta por Regueira *et al.*, (2011) además del MpaC participan otro grupo de enzimas codificadas por los genes localizados en la citada agrupación génica. En esta ruta, el ácido 5-metilorselínico es oxidado a un alcohol con la intervención de MpaD, enzima homóloga a las P450 monooxigenasas. Posteriormente MpaA, enzima con similitud con las preniltransferasas, cataliza la prenilación del intermediario ftalida con la adición de una molécula de farnesil difosfato.

Estudios de homología realizados por Regueira *et al.*, (2011) les permitieron conocer que MpaH tiene similitud con Akt2, enzima involucrada en la síntesis de AK toxina en *Alternaria alternata* y que está localizada en los peroxisomas. Dicha enzima cataliza la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Este hecho les permitió a estos autores suponer que MpaH juega igual rol en la biosíntesis del ácido micofenólico.

## 6. Diseño de Experimentos en estudios de fermentación.

En un proceso en el que se trata de obtener una respuesta determinada es de gran utilidad poder controlar y conocer el modo en que intervienen los diferentes factores o variables experimentales que están involucrados o afectan en dicha respuesta de interés (Massart *et al.*, 1988).

El diseño de experimentos es uno de los métodos que permite llevar a cabo la optimización de factores experimentales considerando tanto los factores individuales como sus interacciones. Este método consiste en introducir cambios deliberados en los factores que se pretenden optimizar, de manera que sea posible observar los efectos producidos en la “variable-respuesta”.

### 6.1 Diseño factorial.

El efecto de un factor es el cambio producido en la “variable-respuesta” como consecuencia de un cambio en el nivel de un factor. Los factores pueden optimizarse de forma independiente, pero cuando existen interacciones entre diferentes factores las conclusiones a que se llegan pueden ser engañosas ya que este diseño no es capaz de detectar dichas interacciones. En estos casos es más eficaz realizar diseños factoriales. El diseño factorial es aquel en que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica del experimento. Los diseños experimentales son de gran utilidad en las primeras etapas del trabajo experimental y permiten estimar los efectos de un factor a diversos niveles de los otros factores, produciendo conclusiones que son válidas sobre toda la extensión de las condiciones experimentales. Son ampliamente utilizados para estudiar el efecto conjunto de varios factores sobre una “variable-respuesta” (Box y Hunter, 1978).

Para realizar un diseño factorial general, es necesario seleccionar un número fijo de niveles para cada uno de los factores del conjunto y luego se hacen experimentos con todas las combinaciones posibles. Si hay  $l_1$  niveles para el primer factor,  $l_2$  para el segundo..., y  $l_k$  para el k-ésimo, el conjunto de todas las  $l_1 \times l_2 \times \dots \times l_k$  condiciones experimentales constituye el diseño experimental.

Los diseños del tipo factorial en que los factores tienen únicamente dos niveles requieren relativamente pocos experimentos por cada factor, y a pesar de que no permiten explorar exhaustivamente una amplia región de los factores, pueden indicar

tendencia y así determinar una dirección favorable para realizar futuros experimentos (Cobb, 1998).

Los diseños factoriales de dos niveles parten de la suposición de linealidad de los efectos de los factores, aunque el sistema  $2^k$  puede funcionar bien incluso cuando la suposición de linealidad se cumpla sólo de manera aproximada. La réplica de puntos centrales al diseño protegerá contra la curvatura y además permitirá obtener estimadores de error independientes. Con este objetivo se hacen  $n$  réplicas del punto central.

Un motivo importante para agregar réplicas en el centro del diseño es que los puntos centrales no influyen en las estimaciones usuales que se hacen en los diseños  $2^k$ ; es decir, no tienen influencia sobre los coeficientes de regresión y además no se alteran las propiedades de ortogonalidad del diseño (Massart *et al.*, 1988).

## 6.2 Diseño de superficies de respuesta.

Además de querer conocer los factores que intervienen en un proceso y sus interacciones, a menudo se pretende conocer los valores de dichos factores para los cuales la respuesta es máxima. Esto se logra utilizando la metodología de superficie de respuesta (Massart *et al.*, 1988).

Para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés está influenciada por varios factores, y para optimizar estas respuestas, se usan una serie de técnicas matemáticas y estadísticas. A partir de la ecuación obtenida, mediante el análisis de la regresión de los datos experimentales, se construyen estas superficies de respuesta. La respuesta se presenta como una superficie sólida en un espacio tridimensional (Otto, 1999). La mejor visualización de la forma de una superficie de respuesta se logra, a menudo y si el número de dimensiones lo permite, usando contornos de dichas superficies.

En la mayoría de los problemas de los métodos de superficie de respuesta, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes.

La función de aproximación va a ser un modelo de primer orden cuando la respuesta se describe adecuadamente por una función lineal de las variables

independientes. Los polinomios de orden superior (segundo orden) deben utilizarse si existe curvatura en el sistema. Este modelo polinomial funciona muy bien en regiones relativamente pequeñas de las variables independientes.

El método de superficie de respuesta es una técnica secuencial. Cuando se considera un punto sobre la superficie de respuesta alejada del óptimo, el polinomio de primer grado es apropiado porque existe poca curvatura del sistema. En este caso, el objetivo es guiar al experimentador rápida y eficientemente a la cercanía del punto óptimo. Una vez que se ha determinado la región del punto óptimo, puede emplearse un modelo más elaborado, como por ejemplo el de superficie de respuesta de segundo grado y realizar un análisis para localizar el óptimo. Este método asegura cuando menos un óptimo relativo (Otto, 1999).



# **Objetivos**





## Objetivos

1. Optimizar la producción de andrastina A en medio líquido MAp usando la metodología del diseño de experimentos.
2. Obtener mutantes afectados en la producción de andrastina A usando la exposición de esporas a luz ultravioleta.
3. Evaluar fenotípicamente los mutantes obtenidos.
4. Comparar los proteomas de los mutantes mediante electroforesis diferencial en gel (DIGE).
5. Identificar la toxina PR mediante cromatografía y espectrometría de masas.
6. Estudiar la ruta biosintética de la toxina PR mediante silenciamiento génico de *P. roqueforti* ATCC 48936.
7. Comparar los metabolomas de los transformantes silenciados con la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936.
8. Evaluar fenotípicamente los transformantes silenciados.
9. Comparar fenotípicamente las cepas de referencia *P. roqueforti* CECT 2905 y *P. roqueforti* ATCC 48936.



# **Materiales y Métodos**



## 1. Microorganismos

### 1.1 Cepas bacterianas

***Escherichia coli DH5 $\alpha$***  (Hanahan, 1983): Cepa empleada habitualmente en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Posee una delección en el gen *lacZ* del operón *lac*, susceptible de ser complementada por determinados vectores de clonación, como el pBluescript<sup>®</sup> (Stratagene) o el pBC (Stratagene). Esta  $\alpha$ -complementación produce una coloración azul en la colonia, originada por la acción de la  $\beta$ -galactosidasa (codificada por *lacZ*) sobre el compuesto X-Gal.

### 1.2 Cepas fúngicas

***Penicillium roqueforti* CECT 2905 (ATCC 10110)**: Cepa silvestre aislada en 1930 en EE.UU. a partir de queso *Roquefort* francés (Modler *et al.*, 1974; Shetty y Gaertner, 1975).

***Penicillium roqueforti* ATCC 48936 (CECT 20485)**: Cepa silvestre aislada del queso azul inglés *Cheshire*, descrita como productora de altas concentraciones de toxina PR (Chang *et al.*, 1991b, 1996).

## 2. Vectores

pJL43RNAi: Este plásmido permite el silenciamiento de un gen diana mediante la generación de un ARN de doble cadena (ARNdc) complementario al ARN codificado por dicho gen, lo que desencadena el proceso de ARN de interferencia (ARNi) mediado por siRNA (*small interference RNA*) (Ullán *et al.*, 2008).

Tiene un tamaño de 6007 pb y contiene el casete de resistencia a fleomicina para la selección de los transformantes de los hongos filamentosos sensibles a este compuesto (Figura 21). Dicho casete está formado por el gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Austin *et al.*, 1990) bajo el control del promotor del gen *gdh* de *Aspergillus awamori* (*Pgdh*) y el terminador del gen *cyc1* *Saccharomyces cerevisiae*

(*tcyc1*). La característica fundamental del pJL43RNAi radica en la presencia de un sitio único de restricción, *NcoI*, que permite la clonación de fragmentos exónicos de ADN cuya expresión está controlada por dos promotores enfrentados, el promotor del gen *gpd* de *Aspergillus nidulans* (*Pgpd*) y el promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* (*PpcbC*). El resultado de la expresión del fragmento exónico de ADN genera un ARN de doble cadena que silencia la expresión del ARN mensajero endógeno que lo codifica. Además, este plásmido posee el origen de replicación *colE1* y el gen de resistencia a ampicilina (*Amp*) para replicación y selección en *E. coli* respectivamente.

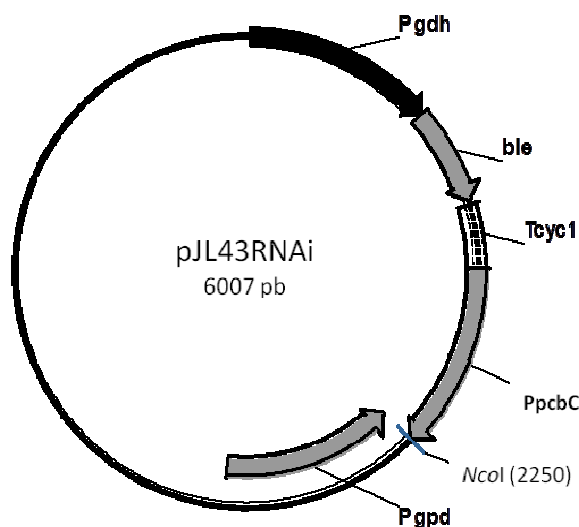


Figura 21. Plásmido pJL43RNAi.

### 3. Reactivos químicos.

#### 3.1 Antibióticos.

**Ampicilina (Amp):** Se preparó una solución acuosa concentrada a 200 mg/ml a partir del producto farmacéutico *Britapen* (Laboratorio Reig Jofré, SA). Se utilizó para la selección de transformantes de *E. coli* a una concentración final de 100 µg/ml. Fue conservada a -20 °C.

**Fleomicina (Pleo):** Se preparó a una concentración inicial de 10 mg/ml en solución acuosa. Fue utilizada para la selección de transformantes de *P. roqueforti* a una concentración de 2-8 µg/ml. Se conservó a -20 °C.

#### 3.2 Enzimas.

Las endonucleasas de restricción mencionadas en esta memoria fueron suministradas por las casas comerciales: New England Biolabs, MBI Fermentas, Takara y Roche.

Otro tipo de enzimas utilizadas fueron: Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Amersham Biosciences), ADN ligasa del fago T4 (Roche), ADNasa I libre de

ARNasa de páncreas bovino, ARNasa-A de páncreas bovino, Go-Taq ADN polimerasa (Promega), Transcriptasa reversa SuperScrip™II RNase H (Invitrogen), Lisozima de clara de huevo (Fluka Chemical & Biochemical Co),  $\beta$ - glucuronidasa y enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, Inc). En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante para su utilización.

### 3.3 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo fueron adquiridos a las casas comerciales IDT y Sigma-Genosys. Cuando se necesitó añadir secuencias de corte para endonucleasas de restricción, se siguieron las recomendaciones presentes en el manual de *Biolabs*. En la Tabla 2 se detallan los nombres y la secuencia nucleotídica de los mismos.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en el trabajo experimental.

Nombre	Secuencia 5'(-)3'
ATORF1F	CCATGCCATGGGCCAGAGGCCGAAGACAGTG
ATORF1R	CCATGCCATGGTTACCAAGTGCAGCCGTTATG
ATOFR2F	CCATGCCATGGCGGACCGAACCAAGCCAGGAAGA
ATORF2R	CCATGCCATGGGACTCCTCCGCCAGAACCT
ATORF3F	CCATGCCATGGAGCTGTCTCCGATTTCTACTCCA
ATORF3R	CCATGCCATGGAATGCGCAACAGAACTCCGACTT
ATORF4F	CCATGCCATGGCTCCGAAGAACAGCCATACT
ATORF4Fx	CCATGCCATGGGACATTGCCGTGGCCAAC
ATORF4R	GTCAAATTGTGCGCCCGTTCC
Sec ORF1F	ATAAAGCCCACCAGACATACAC
Sec ORF1R	CTCAAGCAGCTCCACACGA
OL4-F1	GAGATATAGGGCGGCCTGAC
OL4-F2	ACCCTGATCCAACACTCAGC
OL4-F3	AGGCACACCGAAATGACTTG
OL4-R	CGTATCCAGTCGCACTAGCA
INT01-1F	GGCCAATCCGCTCATTAGTA
INT01-1R	CCGGTTCAAGTATCTCTGC
INT02-1F	ATCAGGCCCAGAAATGACAC
INT02-1R	GATAATGCCCAATTCATGG
INT03-1y2F	AATACCAAAGTTGAAAGAACCG
INT03-1y2R	TTCATCTTAGCCAGGGTCTT
INT03-3F	GCTGTTCCGTTGAGAACTT
INT03-3R	TTTCTTCGACGTGATTGCAG
FPpcbC	CGGAGAGACGGACGGACGCAG
RPgpdA	GCATGCTGCATCGGGAAATCC
RT/actA-F	CTGGCCGTGATCTGACCGACTAC
RT/actA-R	GGGGGAGCGATGATCTTGACCT

### 3.4 Conjuntos de kits comerciales.

En varios de los procedimientos descritos en esta memoria se utilizaron *kits* comerciales que incluían tanto los reactivos como las instrucciones necesarias para la utilización de los mismos. Los *kits* comerciales fueron los siguientes:

- *DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit, 2<sup>nd</sup> Generation* (Roche): marcaje de AND con digoxigenina en el extremo 3' para su detección.

- *GFXTM Micro Plasmid Prep. Kit.* (Amersham Biosciences): purificación de ADN plasmídico de *E. coli* destinado a reacciones de secuenciación. El kit permite la extracción de ADN plasmídico a partir de 1-3 ml de cultivo.

- *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences): purificación, aislamiento y determinación de la concentración de productos de PCR y fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa o soluciones de DNA.

- *RNeasy<sup>TM</sup> Plant Mini Kit.* (QIAGEN): obtención y purificación de ARN total de hongos filamentosos a pequeña escala.

- *2-D Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences): limpieza de muestras de proteínas para su uso en electroforesis de proteínas de dos dimensiones.

## 4. Medios de Cultivo.

### 4.1 Medios de cultivo para bacterias.

La mayoría de los medios de cultivo utilizados fueron esterilizados mediante el método físico de calor húmedo, en olla a presión o autoclave, durante 20 minutos. En los casos en los cuales se usó un procedimiento de esterilización diferente será especificado.

**Medio Luria-Bertani (LB).** Medio de mantenimiento y propagación de *E. coli* (Miller, 1972).

Componentes:	Para 1 litro
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH 7,5	

Para obtener medio sólido se añadió un 2% de agar.



**Medio SBO.** Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* en la obtención de células competentes (Hanahan, 1983).

Componentes:	Para 1 litro
Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g
Agua destilada	Hasta 980 ml
pH 7,5	

Antes de utilizarlo se añadieron 20 ml de una solución estéril de  $MgSO_4$  1M.

#### 4.2 Medios de cultivo para hongos filamentosos.

**Medio Czapek (Cz).** Medio mínimo de crecimiento para microorganismos capaces de utilizar el  $NaNO_3$  como única fuente de nitrógeno (Smith, 1960).

Componentes:	Para 1 litro
Sacarosa	30 g
$K_2HPO_4$	0,5 g
Solución concentrada de Czapek	10 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH $6,8 \pm 0,2$	

Cuando el medio Czapek se utilizó como medio de regeneración de protoplastos se adicionó sorbitol a una concentración de 1M como estabilizador osmótico.

Solución concentrada de Czapek:

Componentes:	Para 100 ml
$NaNO_3$	30 g
KCl	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

La solución concentrada de Czapek fue almacenada sin esterilizar a 4°C y en la oscuridad para sucesivos usos.

**Medio Czapek Yeast Extract Agar (CYA):** Medio utilizado para la caracterización fenotípica de hongos filamentosos y como medio de producción de metabolitos secundarios (Pitt, 1973).

Componentes:	Para 1 litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Solución concentrada de Czapek	10 ml
Solución de metales traza	10 ml
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	20 g
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH 6,7	

Solución de metales traza:

Componentes:	Para 100 ml
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

La solución de metales traza fue almacenada sin esterilizar a 4°C en la oscuridad para sucesivos usos.

**Medio Power 2 (PW2).** Medio usado para la esporulación y mantenimiento de hongos del género *Penicillium*, el cual consiste en una fusión de los medios PM1 (López-Nieto *et al.*, 1985) y Czapek-KCl 0.7 M (Cantoral *et al.*, 1987).

Componentes:	Para 1 litro
Sacarosa	25 g
Lactosa	5 g
Peptona	2,5 g
Sólidos de maceración de maíz	0,5 g
KCl	52 g
NaCl	2 g
NaNO <sub>3</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Sales PW	1 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH 6,75	

Se añadió agar en una concentración de 2% (p/v).

Sales PW:

Componentes:	Para 200 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1 g
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,4 g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,2 g
Agua destilada	Hasta 200 ml

Esta solución fue almacenada sin esterilizar a 4°C para posteriores usos. Antes de usar se agitó para resuspender el precipitado.

**Medio Malt Extract Agar (MEA):** Medio formulado por Raper y Thom, (1949), que se utiliza en la caracterización fenotípica de hongos filamentosos con finalidades taxonómicas (Pitt, 1973).

Componentes:	Para 1 litro
Glucosa	20 g
Extracto de malta	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH 5,6	

Este medio también fue utilizado sin añadir el agar, como medio líquido, recibiendo el nombre **Medio Malt Extract (ME)**. Este medio fue utilizado para la evaluación de la producción de metabolitos secundarios por *P. roqueforti*.

**Medio MPPY.** Medio de germinación y crecimiento para *Penicillium* (Anné, 1977).

Componentes:	Para 1 litro
Glucosa	40 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
Extracto de levadura	2 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH 6,0	

**Medio Potato Dextrose Agar (PDA) Difco™.** Medio base para el cultivo de levaduras y hongos filamentosos (Formulado comercial).

Componentes:	Para 1 litro
Infusión de 200 g de patatas	4 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
pH 5,6	

39 g del preparado fueron resuspendidos en 1 litro de agua destilada.

**Medio Yeast Extract Sucrose (YES).** Medio con altas concentraciones de nitrógeno y carbohidratos, empleado para inducir la producción de micotoxinas en hongos del género *Penicillium* (Wei *et al.*, 1975; Chang *et al.*, 1991a).

Componentes:	Para 1 litro
Sacarosa	150 g
Extracto de levadura	20 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

El pH fue ajustado según el experimento. Para su uso como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro.

**Medio YES Extracto de Maíz (YESM).** Medio usado para potenciar la producción de toxina PR en *Penicillium roqueforti* (Wei *et al.*, 1973; Chang *et al.*, 1991b).

Componentes:	Para 1 litro
Sacarosa	75 g
Extracto de levadura	10 g
Extracto de maíz	200 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

Se usaron diferentes valores de pH según el experimento.

Para elaborar el extracto de maíz se hirvió 1 kg de maíz en 1200 ml de agua destilada durante 30 min. El extracto fue filtrado usando a través de un filtro nytal y se enrasó a un volumen de 1 litro con agua destilada.

**Medio arroz.** Medio descrito por Chang *et al.*, (1991b) para la producción de toxina PR.

Se utilizaron matraces de 100 ml con 7 g de arroz redondo. Se añadieron 7 ml de agua con calidad milli-Q y se deja en remojo toda la noche. Se esteriliza en autoclave 20 min a 120°C.

**Medio iniciador para la Producción de Andrastinas (MAi).** Medio usado como pre-inóculo para la producción de andrastinas en medio líquido (Omura *et al.*, 1996).

Componentes:	Para 1 litro
Glucosa	20 g
Extracto de levadura	2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Polipeptona	5 g
Agar	1 g
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH 6,0	

**Medio para Producción de Andrastinas (MAp).** Medio usado para la producción de andrastinas en medio líquido (Omura *et al.*, 1996).

Componentes:	Para 1 litro
Almidón soluble	15 g
Glicerol	5 ml
Harina de soja	10 g
Levadura comercial	3 g
KCl	3 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

El pH se ajustó según el experimento.

**Medio Complejo para fermentación *Aspergillus* (ACM).** Medio creado para favorecer el desarrollo micelial de hongos del género *Aspergillus*. En este trabajo fue utilizado para el cultivo de *P. roqueforti* en el proceso de transformación con el fin de favorecer su crecimiento sin agregaciones de hifas.

Componentes:	Para 1 litro
Glucosa	20 g
Extracto de malta	20 g
Peptona de carne	1 g
Agua destilada	Hasta 1 litro
pH 6,8	

Antes de usar se añadió por cada 100 ml de medio 2 ml de SSA y 1 ml de SUA que tienen la siguiente composición:

SSA:

Componentes:	Para 100 ml
KCl	2,6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 g
SET (solución de elementos traza)	5 ml
Agua destilada	Hasta 100 ml

Se esterilizó por filtración y se añadieron 250 µl de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O al 20%. Se conservó a 4°C en oscuridad.

SET (Solución de elementos traza):

Componentes:	Para 1 litro
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,8 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1 g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,4 g
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,11 g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0,053 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

Preparación: Se añadieron las sales junto con 0,2 ml de HCl (37,5%) a 250 ml de agua destilada y se agitó lentamente hasta su completa disolución. Finalmente el volumen se ajustó a 1 litro con agua destilada. La solución SET se conservó a 4°C.

SUA:

Componentes:	Para 1 litro
Pantotenato cálcico	0,2 g
Ácido nicotínico	0,1 g
Riboflavina	0,1 g
Piridoxina HCl	0,05 g
Tiamina	0,05 g
Ácido p-aminobenzoico	0,01 g
d-Biotina	0,01 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

Se esterilizó por filtración y fue conservado a 4°C en oscuridad.

**Medio 1 (M1).** Medio usado para la evaluación de la producción de andrastinas en medio líquido.

Componentes:	Para 1 litro
Maltosa	25,8 g
Peptona de carne	7,2 g
L-alanina	0,2 g
Glucosa	5,5 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

El pH se ajustó según el experimento.

**Medio definido de fermentación de *Acreminium* (M DFA). (Shen *et al.*, 1984)**

Componentes:	Para 1 litro
Sacarosa	36 g
Glucosa	27 g
DL-metionina	3,2 g
L-asparagina	12 g
Solución de sales N°1	8 ml
Solución de sales N°2	144 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

El pH se ajustó a 6,0.

Solución de sales N°1:

Componentes:	Para 1 litro
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Solución de sales N°2 en gramos por litro:

Componentes:	Para 1 litro
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	104 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	102 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	11,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,4 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

## 5. Crecimiento y mantenimiento de microorganismos.

### 5.1 Cultivos bacterianos

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB líquido o sólido con 2% de agar añadido.



Para el cultivo en medio líquido se inoculó una colonia desde una placa a un matraz liso de 500 ml con 100 ml de medio y se incubó durante 16-18 horas a una temperatura de 37°C y con una agitación de 250 rpm. El crecimiento en medio sólido se realizó en placas Petri con LB 2% incubando 12 horas a una temperatura de 37°C.

En algunos casos, cuando el experimento o el microorganismo lo requirió, los medios de cultivo descritos se suplementaron con diversas soluciones cuyas concentraciones se detallan a continuación:

Ampicilina (Amp): 100 µg/ml.

IPTG (1-isopropil-β-D-galactopiranosido): 0,05 mM.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido): 80 µg/ml.

Las cepas bacterianas se conservaron en placas Petri con LB 2% selladas con Parafilm™ y a 4°C durante un mes como máximo, o bien en soluciones acuosas de glicerol al 40% (v/v) a -20°C ó -80°C durante 1 año. Para su conservación por periodos de tiempo más prolongados se recurrió a la liofilización, manteniéndose estos líofilos indefinidamente a 4°C, o a temperatura ambiente.

## 5.2 Cultivos fúngicos

Para el crecimiento y esporulación de las cepas de *Penicillium roqueforti* en medio sólido se utilizó el medio PW2. Las placas se incubaron a una temperatura de 28°C durante 4-5 días, hasta que estuvo bien esporulado.

El crecimiento en medio líquido se realizó, en función del experimento, en matraces lisos con medio MPPY, YES, ACM o MAp. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 25 a 28°C. La agitación y el tiempo de incubación dependieron del experimento o metabolito secundario analizado.

Las cepas fúngicas se conservaron aprovechando la capacidad que presentan estos organismos para formar estructuras asexuales de reproducción y resistencia (conidios). Por tanto, su conservación se llevó a cabo, bien a 4°C en placas de medio PW2 sembradas con cada una de las cepas, durante un tiempo máximo de 1 mes; o bien en forma de suspensión de esporas con una concentración final de glicerol del 50% (v/v) a una temperatura de -20°C ó -80°C durante 1 año. Para períodos largos de tiempo, se recurrió a la liofilización de las suspensiones de conidios.

## 6. Producción de metabolitos secundarios en *P. roqueforti*.

### 6.1 Extracción de andrastinas a partir de cultivos en medio sólido.

Protocolo basado en el método descrito por (Hansen *et al.*, 2005), con modificaciones.

Desarrollo del protocolo:

1. Sembrar masivamente una placa de Petri (80 mm de diámetro) con medio CYA, cuya superficie está cubierta con un disco de celofán (*Gel Drying Film*, Promega), con 50  $\mu$ l una suspensión de esporas ( $10^8$  conidios/ml) de *P. roqueforti*. Incubar a 28°C durante el tiempo requerido para el experimento en condiciones de oscuridad.
2. Concluido el periodo de incubación, recoger el micelio con ayuda de una espátula, depositarlo en un cestillo previamente tarado y dejar secar a 80°C hasta obtener un peso constante.
3. Separar el disco de celofán del medio de cultivo.
4. Depositar el medio de cultivo troceado con espátula en un tubo cónico de 50 ml y hacer una extracción con 20 ml de acetato de etilo (Scharlau Chemie SA) suplementado con 0,05% de ácido fórmico (Scharlau Chemie SA). Mezclar en vortex e incubar en baño de ultrasonidos durante 30 min.
5. Centrifugar a 4500 rpm durante 10 min y recoger el solvente orgánico.
6. Realizar una segunda extracción igual a la descrita en el paso anterior.
7. Llevar a sequedad el extracto orgánico recogido en un evaporador centrífugo Jouan RC-10. Disolver el residuo seco obtenido en 200  $\mu$ l de metanol y conservar a -20°C hasta su análisis por HPLC.

### 6.2 Extracción de andrastinas a partir de cultivos en medio líquido.

Protocolo elaborado utilizando como base los métodos descritos por Omura *et al.*, (1996) y Uchida *et al.*, (1996a).

Desarrollo del protocolo:

1. Inocular 100 ml de medio de cultivo MAi en un matraz liso de 500 ml con 1 ml de una suspensión de esporas frescas ( $10^8$  conidios/ml). Incubar a 28°C, con agitación constante de 250 rpm y durante 24 horas.
2. Preparar el inóculo recogiendo el micelio por centrifugación (5 min a 4500 rpm) y lavar dos veces con NaCl 0,9% para eliminar los restos de andrastinas presentes en el medio. Resuspender el micelio en solución de NaCl 0,9% hasta completar el volumen del cultivo recogido inicialmente.
3. Inocular 100 ml de medio de cultivo MAp en un matraz liso de 500 ml con 2 ml del pre-inóculo. Incubar según requerimientos del experimento.
4. Recoger una muestra de 20 ml en un tubo cónico de 50 ml. Separar el caldo metabólico

del micelio centrifugando a 4500 rpm durante 5 min.

5. Colocar el micelio en un cestillo y secar a 80°C hasta obtener un peso constante.
6. Transferir el caldo metabólico a un tubo de 50 ml y añadir 20 ml de acetato de etilo. A continuación mezclar con vortex e incubar en un baño ultrasónico durante 30 min.
7. Recoger el solvente orgánico, repetir el protocolo de extracción descrito en el paso anterior.
8. Llevar a sequedad el extracto orgánico recogido en un evaporador centrífugo (Jouan RC-10). Disolver el residuo seco obtenido en 200 µl de metanol y conservar a -20°C hasta su análisis por HPLC.

Este protocolo se escaló para realizar micro-extracciones permitiendo evaluar un gran número de cepas.

### 6.3 Extracción de toxina PR a partir de cultivos en medio líquido.

El protocolo fue elaborado según el método descrito previamente por Chang *et al.*, (1991a).

Desarrollo del protocolo:

1. Inocular 100 ml de medio líquido YESM en un matraz liso de 500 ml con 1 ml de conidios frescos ( $10^8$  conidios/ml) procedentes de cultivo bien esporulado de *P. roqueforti* en placa de Petri con PW2.
2. Incubar a 25°C, sin agitación, durante 14 días.
3. Transferir 10 ml de caldo metabólico a un tubo de 50 ml.
4. Añadir el mismo volumen de acetato de etilo y seguidamente agitar vigorosamente en vortex durante 2 min. Dejar reposar para que se separen las dos fases y recoger el solvente orgánico.
5. Realizar una segunda extracción procediendo de igual forma que en el paso 4.
6. Llevar a sequedad el extracto orgánico recogido en un evaporador centrífugo (Jouan RC-10). Disolver el residuo seco obtenido en 200 µl de metanol y conservar a -20°C hasta su análisis mediante HPLC.

### 6.4 Extracción de toxina PR a partir del cultivo de *P. roqueforti* en arroz.

Desarrollo del protocolo:

1. Inocular los 7 g de medio de arroz (epígrafe 4.2) en un matraz liso de 100 ml con  $2 \times 10^8$  conidios de *P. roqueforti* resuspendidos en 6 ml de agua calidad milli-Q.
2. Incubar a 24°C, sin agitación, durante 15 días.
3. Descompactar la superficie del medio con ayuda de una espátula y añadir 25 ml de acetato de etilo. Dejar en reposo toda la noche.
4. Transferir a un tubo de 50 ml e incubar en un baño de sonicación durante 30 min.

5. Centrifugar a 4500 rpm durante 10 min y recuperar la fase orgánica.
6. Hacer una segunda extracción igual a la descrita en este procedimiento.
7. Mezclar el producto de ambas extracciones y llevar a sequedad en evaporador centrífugo (Jouan RC-10).
8. Resuspender en 500 µl de metanol y conservar a -20°C.

### **6.5 Cuantificación volumétrica de andrastinas mediante HPLC.**

Desarrollo del protocolo:

1. Centrifugar las muestras obtenidas en el proceso de extracción (Apartados 6.1 y 6.2 de Materiales y Métodos) durante 5 min a 13200 rpm, con el fin de eliminar las partículas insolubles en metanol.
2. Inyectar las muestras en una columna de fase reversa X Bridge™ 18C de 3,5 µm de tamaño de partícula y dimensiones 150 x 2,1 mm. La columna se montó en un equipo Waters Alliance 2695 con inyector de muestras automático (Autosampler) y detector array de fotodiodos (PDA) modelo 2998.
3. La elución se llevó a cabo a un flujo de 0,35 ml/min, empleando como fase móvil, solvente A: agua milli-Q + 0,01% ácido trifluoroacético y solvente B: 100% de acetonitrilo, con un programa de gradiente 30-45% de fase B (0-6 min) y 45-50% de fase B (6-20 min).
4. Las muestras se mantuvieron en el autosampler refrigeradas a 4°C. La temperatura de separación fue de 30°C, temperatura mantenida con un termostato de columna.
5. La cuantificación de andrastinas se expresó en µg/ml.

Para la cuantificación de andrastinas se dispuso de patrones de andrastina A y andrastina B cedidas por KF Nielsen (DTU, Copenhagen, Dinamarca).

### **6.6 Cuantificación volumétrica de ácido micofenólico.**

Desarrollo del protocolo:

1. Para eliminar las partículas insolubles en metanol, centrifugar las muestras obtenidas en el proceso de extracción (Apartados 6.3 y 6.4) durante 5 min a 13200 rpm.
2. Inyectar las muestras en una columna de fase reversa X Bridge™ C18 de 3,5 µm de tamaño de partícula y dimensiones 150 x 2,1 mm. La columna se montó en un equipo Waters Alliance 2695 con inyector de muestras automático (Autosampler) y detector array de fotodiodos (PDA) modelo 2998.
3. La elución se llevó a cabo a un flujo de 0,35 ml/min, empleando como fase móvil, solvente A: agua milli-Q + 0,01% ácido trifluoroacético y solvente B 100% de acetonitrilo con un gradiente de 5-50% de fase B en 60 min.
4. Las muestras se mantuvieron en el autosampler refrigeradas a 4°C. La temperatura de separación fue de 30°C mediante termostato de columna.
5. La cuantificación de ácido micofenólico se expresó en µg/ml.

El patrón utilizado para la cuantificación de ácido micofenólico fue adquirido a Sigma.

### 6.7 Identificación cromatográfica de toxina PR.

Para la identificación y cuantificación de toxina PR se presentó la dificultad de que no existía disponibilidad de patrón en las diferentes casas comerciales y grupos de investigación que habían trabajado con este compuesto.

La toxina PR y el ácido micofenólico tienen igual composición química ( $C_{17}H_{20}O_6$ ) y co-eluyen en carreras cromatográficas relativamente cortas (Nielsen et al., 2006). Basándonos en este hecho y disponiendo de patrón de ácido micofenólico (Sigma), utilizamos la estrategia de realizar una carrera cromatográfica con un gradiente suave de la concentración del solvente orgánico acetonitrilo y se recogieron los picos cercanos al del ácido micofenólico para posteriormente identificar la toxina PR mediante espectrometría de masas.

Desarrollo del protocolo:

1. Evaporar las muestras (extractos crudos y fracciones recogidas en HPLC) al vacío hasta llevarla a sequedad. A continuación, resuspender el residuo sólido en acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico/agua (8:2) con el fin de obtener una señal aceptable del espectrómetro de masas sin saturar el detector.
2. Inyectar 7,5  $\mu$ l de las muestras en una columna Acquity™ UPLC® BEH C18 de 1,7  $\mu$ m tamaño de partícula y dimensiones de 2,1 x 50 mm, montada en un equipo Acquity™ UPLC (Waters, Manchester, UK), equipado con una bomba *Binary Solvent Manager* y un inyector automático *Sample Manager*.
3. Eluir con un flujo de 0,3 ml/min empleando como fase móvil, solvente A (agua milli-Q + 0,1% ácido fórmico) y solvente B (100% de acetonitrilo) con un gradiente de 5-50% de fase B en 2 min y de 50-100% de fase B en 14 min.
4. La detección se realizó en un equipo Synapt HDMS G2: espectrómetro de masas con fuente de ionización por electrospray (ESI) y analizador de tiempo de vuelo (QToF).

### 6.8 Cuantificación relativa de toxina PR.

La cuantificación relativa fue realizada usando el área del pico previamente identificado como el de la toxina PR a través de espectrometría de masas.

Desarrollo del protocolo:

1. Centrifugar las muestras obtenidas en el proceso de extracción (Apartado 6.4) durante 5 min a 13200 rpm, para que precipiten las proteínas y otras partículas insolubles en metanol.
2. Inyectar las muestras en una columna de fase reversa X Bridge™ C18 de 3,5  $\mu$ m de

tamaño de partícula y dimensiones 2,1 x 150 mm. La columna se montó en un equipo Waters Alliance 2695 con inyector de muestras automático (Autosampler) y detector array de fotodiodos (PDA) modelo 2998.

3. La elución se llevó a cabo a un flujo constante de 0,35 ml/min, empleando como fase móvil, solvente A: agua milli-Q + 0,01% ácido trifluoroacético y solvente B 100% de acetonitrilo haciendo gradiente de 5-50% de fase B en 60 min.
4. Las muestras se mantuvieron en el autosampler refrigeradas a 4°C y la temperatura de separación se mantuvo con un termostato de columna a 30°C.
5. La cuantificación se realizó determinando el área de pico correspondiente a la toxina PR, expresada en  $\mu V \cdot s$ .

## 7. Obtención de ADN total de *P. roqueforti* a partir de micelio.

La extracción de ADN total a partir de micelio de *P. roqueforti* se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

1. Inocular 100 ml del medio MPPY con conidios de *P. roqueforti* provenientes de una placa de PW2 bien crecida y esporulada (4-6 días de incubación).
2. Incubar a 28°C de 24 a 48 horas con una agitación constante de 240 rpm.
3. Recoger el micelio por filtración a través de un filtro nytal de 30  $\mu m$  de diámetro de poro.
4. Lavar el micelio con NaCl al 0,9%. Secar el exceso de humedad con papel de filtro y congelar a -80°C hasta el momento en que se vaya a proceder a la extracción de ADN.
5. Romper el micelio hasta convertirlo en un polvo fino usando un mortero y nitrógeno líquido.
6. Transferir el micelio pulverizado a un tubo de 10 ml (hasta la marca de 2,5 ml).
7. Añadir 3 ml de tampón de extracción<sup>(1)</sup> previamente calentado a 65°C. Mezclar usando el vortex hasta obtener una total homogenización e incubar 20 min a 65°C.
8. Agregar 3 ml de CIA, mezclar en vortex y dejar en hielo durante 30 min.
9. Centrifugar durante 30 min a 4500 rpm y a 4°C.
10. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y añadir un volumen de isopropanol, mezclar por inversión e incubar 10 min a temperatura ambiente.
11. Recuperar el precipitado mediante centrifugación durante 15 min a 4400 rpm y a 4°C. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
12. Resuspender el residuo sólido en 800  $\mu l$  de agua calidad milli-Q y transferir a un microtubo de 2,2 ml.
13. Adicionar 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M, mezclar por inversión e incubar en hielo durante 1 hora.
14. Centrifugar 30 min a 13200 rpm y a 4°C. Transferir el sobrenadante a un microtubo limpio.
15. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
16. Centrifugar 20 min a 13200 rpm y eliminar el sobrenadante.
17. Dejar secar el precipitado y resuspender en 100  $\mu l$  de agua de calidad milli-Q.

<sup>(1)</sup> **Tampón de extracción:** 0,7M NaCl; 0,1M Na<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>); 0,1M Tris HCl pH 7,5; 0,05 M EDTA pH 8; 20% SDS.

## 8. Manipulación de ADN.

### 8.1 Eliminación selectiva de ácidos nucleicos.

Durante el proceso de purificación de ADN o ARN habitualmente las muestras están contaminadas con ARN o ADN respectivamente. Por ello, es necesaria la eliminación selectiva del ARN con ARNasa libres de ADNasa y del ADN con ADNasa libre de ARNasa. Ambas enzimas se emplearon siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 8.2 Limpieza y precipitación de ADN.

Las proteínas y otras impurezas presentes en las soluciones de ADN se eliminaron mediante un proceso de limpieza con fenol básico (fenolización) siguiendo el siguiente protocolo:

1. Añadir a la solución de ADN 0,5 volúmenes de fenol neutro pH 7,4<sup>(1)</sup> y 0,5 volúmenes de CIA<sup>(2)</sup> y mezclar por inversión.
2. Centrifugar la mezcla durante 5 min a 13200 rpm.
3. Recuperar cuidadosamente la fase superior acuosa y repetir los pasos 1 y 2 hasta que la interfase esté libre de impurezas.
4. Añadir a la solución acuosa un volumen de CIA, para eliminar los restos de fenol.
5. Mezclar por inversión y centrifugar durante 5 min a 13200 rpm.
6. Recuperar nuevamente la fase acuosa.

<sup>(1)</sup> **Fenol neutro:** Mezclar 50 g de fenol, 50 mg de hidroxiquinoleína y Tris-HCl 0,1M pH 8,5, dejar reposar hasta que se formen dos fases. Retirar la fase superior y añadir Tris-HCl 0,1M pH 8,5 hasta que se alcance pH 7,4-7,5. Conservar a 4°C en un recipiente opaco. <sup>(2)</sup> **CIA (Cloroformo-isoamílico):** Cloroformo/Alcohol isoamílico, (v:v): 24/1.

Para la precipitación del ADN se adicionan sales y un alcohol lo que provoca la pérdida de solubilidad del ADN en agua y por consiguiente precipitación.

Desarrollo del protocolo:

1. Añadir a la suspensión acuosa de ADN 0,1 volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (mantenido a -20°C)<sup>(1)</sup>. Mezclar por inversión.
2. Mantener la mezcla al menos durante 2 horas a -20°C ó 30 min a -80°C. Centrifugar a 13200 rpm durante 30 min y a una temperatura de 4°C.
3. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 0,5 volúmenes de etanol 70%<sup>(2)</sup>. Centrifugar nuevamente a 13200 rpm durante 5 min y a temperatura ambiente. Retirar el

- sobrenadante y dejar secar el precipitado.
4. Resuspender en agua o en TE<sup>(3)</sup>. Conservar a 4°C o congelado (-20°C) para largos periodos de tiempo.

<sup>(1)</sup>Se puede substituir el etanol por 0,6 volúmenes de isopropanol (2-propanol) y realizar la precipitación a temperatura ambiente. <sup>(2)</sup>**Etanol al 70%**: Diluir etanol absoluto en agua calidad milli-Q a un 70% (v/v). <sup>(3)</sup>**TE**: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; pH 8,0; en agua milli-Q.

### 8.3 Reacciones con endonucleasas de restricción.

Para la utilización de las enzimas de restricción empleadas en este trabajo se siguieron las recomendaciones de los distintos proveedores. Cada enzima posee unas condiciones óptimas de reacción en cuanto a temperatura, pH, concentración salinas y presencia de cofactores. Las tres últimas condiciones (pH, salinas y cofactores) son garantizadas con los tampones de digestión comerciales suministrados por los propios proveedores de las enzimas.

De forma general se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones a la hora de realizar una digestión con las enzimas de restricción:

1. Añadir siempre menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de la reacción, con objeto de diluir suficientemente el glicerol presente en las soluciones de conservación de las enzimas, evitando que pueda inhibir la actividad enzimática.
2. Si el ADN se encuentra suspendido en TE, configurar la reacción en un volumen que supere 10 veces el volumen de ADN a digerir. De esta manera se evita que el TE modifique las características del tampón de reacción e inhiba por tanto la reacción de la enzima.

En líneas generales el esquema seguido en la preparación de una reacción con enzimas de restricción fue el siguiente:

1. Mezclar en un microtubo:  
Tampón de digestión (10x).....1/10 del volumen final  
ADN.....1-2 µg de ADN por cada 20 µl del volumen  
Enzima de restricción.....1-2 U/µg de ADN  
Agua milli-Q.....completar hasta volumen final
2. Incubar las reacciones a la temperatura descrita por los proveedores y durante un periodo de tiempo que no exceda el tiempo máximo de actividad indicado para la enzima.
3. Analizar mediante electroforesis en geles de agarosa o purificar y precipitar según su finalidad.



#### 8.4 Ligación de fragmentos de ADN.

Para la ligación de fragmentos de ADN se utilizó la enzima ADN ligasa del fago T4 la cual cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo iones  $Mg^{2+}$  y ATP como cofactores.

Desarrollo del protocolo:

1. Mezclar en un microtubo:
 

ADN del vector.....	50 ng
ADN del inserto.....	cantidad equimolecular o superior al vector
Tampón de ligación (10x).....	1/10 del volumen final
Ligasa del fago.....	2-7 U (según recomendaciones del fabricante)
Agua milli-Q.....	completar hasta volumen final
2. Al mezclar el agua con el vector y el inserto, la solución se llevó a 65 °C durante 30 seg. Se dejó enfriar 2 min y posteriormente se añadieron el tampón y la enzima.
3. Incubar la reacción a 4-16°C durante 1-12 horas.
4. Inactivar la ligasa por calentamiento a 65°C durante 10 min.
5. Transformar en una cepa apropiada de *E. coli*.

Para la realización de las reacciones de ligación, además se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- La relación vector/inserto varió según: i) si ambos extremos eran romos o cohesivos, ii) si las ligaciones direccionales tenían un extremo romo y el otro cohesivo, iii) o ambos extremos cohesivos. Las relaciones equimoleculares variaron entre 1:3 y 1:15.
- La reacción se efectúa en el mínimo volumen posible (preferiblemente 10  $\mu$ l), excepto cuando se trata de una auto-ligación. En este caso se recomienda emplear 50  $\mu$ l como volumen final.
- En una ligación de extremos cohesivos se usaron entre 2 y 4 unidades de enzima y la incubación duró entre 1 y 6 horas.
- Cuando se trató de una ligación con extremos romos se llegaron a usar hasta 7 unidades de enzima y se empleó polietilenglicol (PEG 4000) al 5% de concentración final para favorecer la concentración "efectiva" de moléculas de ADN. Así mismo, el tiempo de incubación se extendió a 12 horas.

## **8.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa es un método que permite la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos reproduciendo las condiciones de replicación en la célula (Mullis y Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Esta técnica permite, partiendo de una molécula de ADN diana, obtener entre  $10^5$  y  $10^9$  veces una secuencia específica contenida en ella. Toda PCR contiene los siguientes componentes básicos.

- a) Cebadores (oligonucleótidos o primers): son moléculas lineales de ADN monocatenario complementarias a regiones del ADN molde que determinan el punto de inicio de la síntesis de ADN, a partir de la cual la ADN polimerasa sintetizará la cadena de ADN. Cada reacción de PCR requiere una pareja de oligos enfrentados y complementarios a cada una de las dos hebras del ADN molde, sobre las que han de anillar.
- b) ADN polimerasa: han de ser enzimas termoestables, puesto que las reacciones de PCR se alcanzan temperaturas de hasta 94 y 98°C en el paso de desnaturalización.
- c) ADN molde: es la molécula de ADN en la que existen regiones complementarias a la secuencia de los oligonucleótidos. El fragmento de ADN comprendido entre los dos cebadores es amplificado por la ADN polimerasa utilizando la información necesaria contenida en el ADN molde, para sintetizar, por complementariedad, las nuevas hebras de ADN.
- d) Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): Son los sustratos que utiliza la ADN polimerasa para sintetizar las nuevas hebras de ADN.

La amplificación se basa en la repetición de un ciclo que consta de tres etapas:

1. Desnaturalización. Consiste en la separación de las dos cadenas del ADN molde mediante la incubación a elevada temperatura (94 a 98°C). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.
2. Anillamiento de los cebadores: Consiste en la unión de dos oligonucleótidos al ADN diana. Cada uno de los cuales es complementario a una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal, que quedan enfrentados por sus

extremos 3' tras el anillamiento flanqueando la región a amplificar. La distancia entre ellos determinará la longitud de la secuencia de ADN que se pretende amplificar.

3. Extensión. Consiste en la elongación de los cebadores del conjunto ADN-cebador por la acción de una ADN polimerasa termoestable, a una temperatura próxima a los 72 °C, durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar. El resultado del proceso es la formación de las dos nuevas cadenas de ADN, copias de la molécula molde y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia al cebador respectivo. La duración de este paso depende de la velocidad de amplificación de la enzima que en líneas generales es de 1 minuto por cada Kb.

En el mercado existen diversas ADN polimerasas que se pueden usar para PCR y cada una de ellas con unas características y condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. En nuestro caso las enzimas utilizadas fueron:

i) GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase (Promega), cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento (p. ej.: sondas), o bien cuando se pretendía determinar la temperatura óptima de anillamiento de unos nuevos oligonucleótidos. Esta enzima deja una desoxiadenosina en cada extremo 3', lo que permite clonar directamente los fragmentos amplificados por PCR en vectores del tipo pGEM-T Easy (Promega).

ii) Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes), se utilizó cuando la fidelidad en la copia es imprescindible (análisis de regiones promotoras).

En la Tabla 3 se especifican, de acuerdo al manual de aplicaciones de PCR (Roche), los valores normales de los distintos componentes para la realización de un típica reacción de amplificación por PCR. Estos valores son orientativos y han de ser ajustados en función de la ADN polimerasa, el tipo de región a amplificar, etc. De igual forma, en algunas reacciones se hace necesario el uso de aditivos que potencian la eficiencia o especificidad de la reacción (DMSO, betaína, seroalbúmina bovina, detergentes, etc.).

**Tabla 3.** Componentes necesarios para realizar una PCR (50 µl de reacción).

<b>ADN molde</b>	1-10 ng ADN bacteriano
<b>Cebadores (18-24 pb)</b>	0,1-1 ng ADN plasmídico
<b>ADN polimerasa</b>	0,5-2,5 unidades
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
<b>dNTPs</b>	50-500 µM (normalmente 200 µM)
<b>Tampón 10x</b>	1x
<b>Agua Milli-Q</b>	completar el volumen de reacción

Los tiempos y temperaturas para una reacción de PCR son básicamente empíricos y dependen de diversos factores como: contenido en G+C del ADN, contenido en G+C de los oligonucleótidos, longitud del fragmento a amplificar, velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, abundancia de ADN molde, etc.

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa comprobando la correcta amplificación del fragmento de ADN deseado.

### 8.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en función de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

La electroforesis en geles de agarosa se realizó basándose en el método descrito por (Sambrook *et al.*, 1989).

Desarrollo del protocolo:

1. Disolver agarosa D1-Electroendosis Media (Pronadisa) en tampón TAE (1x)<sup>(1)</sup> en porcentajes de 0,8-2% en función del tamaño del ADN. Calentar al microondas hasta la completa disolución.
2. Verter en el molde y dejar enfriar hasta que solidifique la agarosa.
3. Mezclar la muestra con 0,1 volúmenes de tampón de carga (10x) TaKaRa antes de ser cargada en los pocillos.
4. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis que contiene TAE (1x) y cargar los pocillos con las muestras y el marcador de peso molecular.
5. Desarrollar la electroforesis con una diferencia de potencial de 80-100 voltios durante 2-3 horas.
6. Teñir el gel sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio<sup>(2)</sup> durante 10-15 min.

7. Visualizar el gel sobre un transluminador Spectroline TR-302, el cual emite una luz con una longitud de onda de 302 nm. Fotografíar con el sistema Video Graphic Printer UP-890CE (UPV).

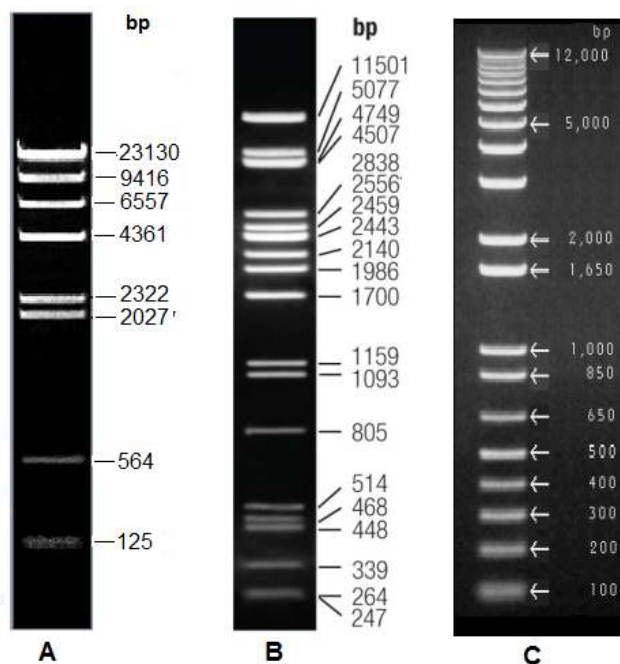
<sup>(1)</sup> **TAE (50x)**: 2M Tris base; 5,7% (v/v) ácido acético glacial; 50 mM EDTA 0,5 mM pH 8. <sup>(2)</sup> **Bromuro de etidio (BrEt)**: Se prepara una solución concentrada a 10 mg/ml en agua y se conserva protegida de la luz. Se adiciona 50  $\mu$ l de la solución concentrada para un litro de agua destilada.

Los marcadores de peso molecular empleados (Figura 22) fueron los siguientes:

- ADN del bacteriófago lambda (MBI Fermentas), digerido con las endonucleasas de restricción *Hind*III (Figura 22A) y *Pst*I (Figura 22B). Para la digestión se utilizó una concentración de ADN de 50 ng/ $\mu$ l. Para cada gel se utilizaron 20  $\mu$ l del producto de la digestión (1  $\mu$ g de ADN).

- “1Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen), marcador comercial que presenta bandas desde 12 Kb hasta 100 pb (Figura 22C). Se diluye en TE a una concentración final de 50 ng/ $\mu$ l. Se utilizaron 5  $\mu$ l por gel.

- “DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled” (Roche), marcador comercial correspondiente al ADN del fago lambda digerido con *Hind*III marcado con digoxigenina. Presenta bandas desde 23 Kb hasta 125 pb. Se utilizaron 10  $\mu$ l por gel. Este marcador se utiliza para las hibridaciones no radiactivas de ADN (ver más adelante).



**Figura 22.** Marcadores de peso molecular utilizados para ADN: (A)  $\lambda$  *Hind*III, (B)  $\lambda$  *Pst*I y (C) “1Kb Plus DNA Ladder”.

### **8.7 Extracción de ADN de geles de agarosa.**

La extracción de los fragmentos de ADN se realizó mediante el *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham-Biosciences). Este kit emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN de doble cadena (0,1-48 Kb) a la matriz de la columna. Una vez que el ADN es “retenido” las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El ADN es posteriormente eluido en un tampón de baja fuerza iónica con un porcentaje de recuperación mayor al 60%.

Desarrollo del protocolo:

1. Cortar la banda del gel de agarosa que contiene el fragmento de ADN deseado procurando tomar la menor cantidad de agarosa posible.
2. Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 2,0 ml previamente pesado y calcular el peso de agarosa.
3. Adicionar 10  $\mu$ l de buffer de captura por cada 10 mg de agarosa. Incubar a 60°C hasta la completa disolución de la agarosa.
4. Transferir la muestra a una columna GFX e incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar durante 30 seg a 13200 rpm.
5. Descartar el eluyente y adicionar a la columna 500  $\mu$ l de tampón de lavado. Centrifugar durante 30 seg a 13200 rpm.
6. Transferir la columna a un nuevo microtubo de 1,5 ml y añadir 15-50  $\mu$ l de agua calidad milli-Q e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Para recuperar el ADN purificado, centrifugar durante 1 minuto a 13200 rpm.

### **8.8 Cuantificación y análisis de pureza de los ácidos nucleicos.**

Las preparaciones de ADN se cuantificaron de manera visual, por comparación con la intensidad de cantidades conocidas del marcador de peso molecular. Observando la fotografía del gel, se compara la intensidad de fluorescencia que poseen las bandas de la muestra con la intensidad de las bandas del patrón, para lo cual se tuvo en cuenta que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN de las bandas.

Cuando se precisó una cuantificación más exacta de la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra, el método utilizado fue la medida espectrofotométrica de los ácidos nucleicos (A 260). La relación absorbancia/cantidad de ácidos nucleicos viene establecida por las siguientes concentraciones equivalentes a una unidad de absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm:

50 µg/ml ADN bicatenario

40 µg/ml ARN total

33 µg/ml ADN monocatenario

Además la relación  $A_{260}/A_{280}$  indica la pureza de la muestra. Una muestra pura de ADN presenta una relación  $A_{260}/A_{280} = 1,8$ . Este valor debe ser de 1,9-2,1 para muestras de ARN (Sambrook y Russel, 2001).

## 9. Transformación de *E. coli* y obtención de ADN plasmídico.

### 9.1 Obtención de células de *E. coli* competentes.

Las células de *E. coli* en estado natural no son capaces de interiorizar ADN plasmídico, es decir, no son competentes. Para lograr el estado de competencia es necesario someterlas a tratamientos que alteren las envolturas celulares para aumentar la permeabilidad al ADN.

En este trabajo se indujo el estado de competencia utilizando el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983, 1985) donde las células alcanzan una eficiencia de transformación de hasta  $5 \times 10^8$  transformantes/µg ADN.

Desarrollo del protocolo:

1. Inocular una colonia aislada de *E. coli* procedente de medio LB sólido en 100 ml de medio SOB líquido (suplementado con la solución de sales de magnesio<sup>(1)</sup>) e incubar durante 14-16 horas a 37°C y con una agitación de 250 rpm.
2. Inocular 100 ml de medio SBO con 200-400 µl del pre-inóculo anterior (suplementado con 2 ml de solución de sales de magnesio), incubando en idénticas condiciones de temperatura y agitación.
3. Cuando el cultivo alcanza una  $DO_{600 \text{ nm}}$  de 0,4-0,5 unidades, enfriar rápidamente en un baño de agua con hielo para detener el crecimiento celular de inmediato. A partir de este momento las células se mantienen a una temperatura constante de 4°C.
4. Recoger las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Resuspender el precipitado en 30 ml de solución RF1<sup>(2)</sup> fría y se mantiene durante 30 min en hielo.
5. Recoger las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a 4°C y resuspender en 8 ml de solución RF2<sup>(3)</sup> fría.
6. Repartir esta suspensión en alícuotas de 120 µl. Se pueden utilizar al momento o conservarse a -80°C, previa congelación en N<sub>2</sub> líquido.

<sup>(1)</sup>Solución de sales de magnesio: MgCl<sub>2</sub> 1M; MgSO<sub>4</sub> 1M. Esterilizar mediante filtración. <sup>(2)</sup>RF1: RbCl 100mM; MnCl<sub>2</sub> 50mM; Acetato potásico 30mM; CaCl<sub>2</sub> 10mM; Glicerol 15%, pH 5,8 ajustado con ácido acético 0,2M. Esterilizar por filtración. <sup>(3)</sup>RF2: MOPS 10mM; RbCl 10mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; Glicerol 15%, pH 6,8 ajustado con NaOH 1N. Esterilizar mediante filtración.

## 9.2 Transformación de *E. coli*.

Para la transformación de células competentes de *E. coli* fue utilizado el protocolo descrito por Hanahan, (1983).

Desarrollo del protocolo:

1. Mezclar 100  $\mu$ l de células competentes de *E. coli*, previamente descongeladas en hielo, con 1-10  $\mu$ l de solución de ADN plasmídico e incubar en hielo durante 30 min.
2. Someter la mezcla anterior a un choque térmico, incubando en baño de agua a 42°C durante 45 seg y enfriando rápidamente en hielo durante 2 min.
3. Añadir 600  $\mu$ l de medio LB líquido a la mezcla de transformación e incubar a 37°C, durante una hora a 250 rpm para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico de selección presente en el ADN plasmídico.
4. Sembrar la mezcla distribuida en dos placas de LB sólido suplementado con el antibiótico de selección.

## 9.3 Minipreparación de ADN plasmídico.

Este método fue descrito por Holmes y Quigley, (1981) y se empleó para analizar un alto número de muestras.

Desarrollo del protocolo:

1. Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular un microtubo de 1,5 ml con 1 ml de medio TB suplementado con 10 ml de sales TB y el(los) marcador(es) de resistencia necesario(s) para el mantenimiento del plásmido. Incubar durante 8-14 horas a 37°C en agitación a 250 rpm.
2. Precipitar las células mediante centrifugación a 8000 rpm durante 4 min.
3. Resuspender el precipitado en 350  $\mu$ l de STET<sup>(1)</sup> y luego añadir 10  $\mu$ l de una solución acuosa de lisozima 10 mg/ml.
4. Agitar vigorosamente durante 40 seg.
5. Hervir durante 45 seg y centrifugar inmediatamente a 13200 rpm durante 15 min. Eliminar con un palillo estéril el precipitado de restos celulares y proteínas.
6. Añadir un volumen de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2. Mezclar por inversión y dejar reposar 10 min.
7. Centrifugar a 13200 rpm, 15 min, a temperatura ambiente.
8. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado. Resuspender en 30  $\mu$ l de TE o agua milli-Q.

<sup>(1)</sup>STET: 8% (p/v) sacarosa; 0,5% (v/v) Tritón X-100; 50 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; en solución acuosa.



#### 9.4 Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala.

Este procedimiento se utilizó para la obtención de ADN plasmídico a gran escala (Zhou *et al.*, 1990).

Desarrollo del protocolo:

1. Inocular 100 ml de medio LB, complementado con el antibiótico adecuado, con una colonia de *E. coli*. Incubar el cultivo durante 12-16 horas a 37°C y con una agitación de 250 rpm.
2. Transferir el cultivo a tubos de 50 ml y recoger las células centrifugando a 4800 rpm, durante 10 min y a 4°C. Dejar un poco de medio de cultivo para resuspender el precipitado.
3. Añadir 6 ml de TENS<sup>(1)</sup> y mezclar suavemente por inversión hasta obtener una mezcla homogénea viscosa. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
4. Añadir 3 ml de acetato sódico 3M, pH 5,2 y agitar suavemente hasta obtener una mezcla homogénea y fluida. Esto permite que precipiten las proteínas y los restos celulares.
5. Eliminar los restos precipitados mediante centrifugación a 4800 rpm durante 25 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 50 ml limpio.
6. Precipitar los ácidos nucleicos del sobrenadante añadiendo 18 ml de etanol absoluto frío (mantenido a -20°C) y mezclarlo suavemente por inversión. Dejar precipitar a -20°C durante al menos 2 horas.
7. Recoger los ácidos nucleicos centrifugando a 4800 rpm durante 30 min y a 4°C. Lavar el precipitado con etanol a 70% en agua. Una vez seco el precipitado se resuspende en 1 ml de TE.
8. Digerir la solución obtenida con ARNasa (concentración final de 10 µg/ml) libres de ADNasa durante 30-90 min a 37°C para eliminar el ARN.
9. Transcurrido este tiempo eliminar las proteínas por fenolización (Apartado 8.2 de Materiales y Métodos).
10. Precipitar el ADN en microtubos de 2,5 ml con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M a pH 5,2.
11. Recuperar el ADN por centrifugación a 13200 rpm, durante 30 min, a 4°C. Lavar el precipitado con etanol al 70% en agua, dejar secar y resuspender en 75-150 µl de TE.

<sup>(1)</sup>TENS: NaOH 0,15M, SDS 1% en TE.

#### 10. Transferencia de ADN de geles de agarosa a filtros de nailon (*Southern blotting*).

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina *Southern blotting* (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, desnaturalización del mismo y transferencia de los fragmentos en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a

la misma mediante luz UV. Tradicionalmente, los fragmentos de ADN se transferían a filtros de nailon (Hybond-N™ de Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridad utilizando una torre de papel. Actualmente se tiende a sustituir este método por la transferencia mediante sistema de vacío (VacuGene XL, Amersham Pharmacia Biotech) que permite una transferencia óptima de moléculas de ADN de pequeño y mediano tamaño.

### **10.1 Transferencia de ADN mediante sistema de vacío:**

Desarrollo del protocolo:

1. Separar el ADN, previamente digerido, mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando como marcador el DNA *Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*. Tefir el gel con bromuro de etidio y fotografiarlo.
2. Cortar un filtro de nailon (Hybond™ - N) de un tamaño de 1 cm por cada lado mayor que el tamaño del gel y humedecerlo con SSC (2x). Depositarlo sobre la placa porosa de la unidad de transferencia, ensamblada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
3. Colocar sobre la placa porosa una lámina de plástico que cubra toda la superficie de la placa porosa y que tenga una abertura central con un tamaño ligeramente inferior al del gel.
4. Colocar cuidadosamente el gel sobre la ventana de plástico donde se halla el filtro, comenzar por el extremo con pocillos e ir dejándolo que haga contacto suave y progresivamente.
5. Encender la bomba de vacío (transferir a 50 mbar).
6. Cubrir toda la superficie del gel con solución depurinizante<sup>(1)</sup> y dejar 20 min. En este tiempo el resto de tampón de carga presente en el frente de migración debe cambiar su color de azul a amarillo, producido por un cambio en el pH.
7. Eliminar los restos de solución depurinizante y cubrir la superficie del gel con solución desnaturalizante<sup>(2)</sup> durante 20 min. El frente de migración debe recuperar su color azul.
8. Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante<sup>(3)</sup> durante 20-25 min.
9. Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC (20x)<sup>(4)</sup> durante 30-60 min.
10. Retirar todo el líquido y marcar la posición de los pocillos del gel sobre el filtro con bolígrafo azul. Apagar la bomba de vacío.
11. Lavar el filtro en una solución de SSC (6x) y dejarlo secar sobre un papel Whatman.
12. Finalmente fijar el ADN mediante la aplicación de luz ultravioleta al filtro (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).
13. Estos filtros se pueden conservar, a 4°C durante varios meses, protegidos con papel Whatman y papel de aluminio.

<sup>(1)</sup> Solución depurinizante: 0,25M HCl. <sup>(2)</sup> Solución desnaturalizante: 1,5M NaCl; 0,5N NaOH. <sup>(3)</sup> Solución neutralizante: 1,5M NaCl; 0,05M Tris-HCl, pH 7,2; 1mM EDTA. <sup>(4)</sup> SSC 20x: 3M NaCl; 0,3M citrato sódico, pH 7,0.

## 11. Hibridación no radioactiva de ADN.

En el proceso completo de hibridación no radioactiva de ADN se pueden distinguir cinco fases: marcaje de la sonda, prehibridación, hibridación, lavados y detección. A continuación describimos cada una de estas fases.

### 11.1 Marcaje de sondas de ADN.

El sistema de marcaje no radiactivo comercializado por la compañía Roche se basa en la utilización del desoxinucleótido dUTP, modificado por la unión de un hapteno esteroide denominado digoxigenina (DIG), que actúa como antígeno de los anticuerpos que posteriormente se utilizarán en la detección. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (random primed) descrito por (Feinberg y Vogelstein, 1983). La reacción de marcaje con el sistema *DIG-High Prime* (Roche) se realiza de la siguiente forma:

1. Disolver el ADN que se desea marcar (0,1-3 µg) en 15 µl de H<sub>2</sub>O.
2. Desnaturalizar el ADN hirviéndolo durante 10 min y enfriándolo rápidamente en hielo durante 2-3 min.
3. Añadir 2 µl de hexanucleótidos marcados<sup>(1)</sup> (10x), 2 µl DIG-labelling mix<sup>(2)</sup> y 1 µl de enzima *Klenow* (2U/µl, Fermentas). Incubar a 37°C durante 20 horas.
4. Purificar la sonda para eliminar los restos de sales y enzima. Para realizar esta purificación: añadir 2 µl EDTA 0,2 M pH 8,0; 2,5 µl de LiCl 4M y 75 µl de etanol absoluto frío. Mezclar suavemente por inversión e incubar a -20°C toda la noche para lograr la precipitación óptima de la sonda.
5. Recuperar el ADN de la sonda por centrifugación a 13200 rpm durante 30 min a 4°C. Seguidamente, lavar el precipitado con etanol al 70% para eliminar los restos de sales. Dejar secar el precipitado al aire y resuspender en 400 µl de TE.

<sup>(1)</sup> Hexanucleótidos marcados (10x): dATP/dGTP cada uno 1 mM; dTT 0,65mM. <sup>(2)</sup> DIG-Labelling Mix: DIG-11-dUTP 0,35mM; tampón de reacción (5 x 50%).

### 11.2 Prehibridación

Para evitar las uniones inespecíficas de la sonda de ADN al filtro, éste se trata con agente bloqueante. Así se eliminan los posibles sitios activos de la membrana donde no se han unido los ácidos nucleicos durante la transferencia y que pudieran retener la sonda generando la aparición de señales de hibridación inespecíficas. Para esto se utiliza el producto comercial *Blocking reagent* (Roche).

Desarrollo del protocolo:

1. Colocar el filtro de nailon, al que se ha transferido el ADN digerido, en una bolsa de plástico adecuada para tal fin.
2. Añadir 10-20 ml de tampón de hibridación<sup>(1)</sup> y retirar las burbujas que se puedan haber formado para evitar su interferencia en el proceso de hibridación de la sonda.
3. Sellar la bolsa para evitar la fuga del tampón de hibridación.
4. Colocar la bolsa en un baño de agua con agitación constante e incubar a la temperatura adecuada (generalmente 42°C) durante 1-4 horas.

<sup>(1)</sup> **Solución de Hibridación:** 40% Formamida; 5x SSC; 2% agente bloqueante (Blocking Reagent de Roche); 0,1% lauroilsarcosina; 0,02% SDS.

### **11.3 Hibridación.**

Durante el proceso de hibridación se produce la unión de la sonda marcada al ADN previamente fijado a la membrana. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura a la que se desarrolla la hibridación y la concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores.

Desarrollo del protocolo:

1. Desnaturalizar el ADN, de la sonda previamente marcada, hirviendo durante 10 min y enfriándola rápidamente en hielo. Añadir la sonda así desnaturalizada al tampón de hibridación a una concentración de 5-25 ng/ml. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces, en caso de ser así, desnaturalizar de igual manera.
2. Eliminar el tampón de hibridación utilizado en la prehibridación y añadir la solución de hibridación.
3. Cerrar herméticamente la bolsa eliminando las burbujas de aire. Incubar en baño con agitación a 42°C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, recoger la solución de hibridación en un tubo y conservarla a -20°C para su reutilización.

***Nota:** Las condiciones de astringencia de la hibridación se controlan mediante la temperatura de hibridación y la composición del tampón de hibridación, sobre todo en cuanto a la concentración de formamida del mismo. En nuestros estudios la hibridación de ADN se realizó a 42°C y con un 40% de formamida.*

### **11.4 Lavado de los filtros.**

Los lavados, permiten la eliminación selectiva de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN. La intensidad y la duración del lavado dependerán de la especificidad de la sonda.

La composición de la solución de lavado y las condiciones de incubación que se emplearon fueron las siguientes:

- SSC (2x); SDS 0,1%: 15 min a la temperatura de hibridación.
- SSC (0,1x); SDS 0,1%: 15 min a la temperatura de hibridación.

Una vez lavados los filtros se dejaron secar al aire y se realizó la detección inmunológica.

### 11.5 Detección Inmunológica.

La detección de filtros marcados con sondas no radioactivas se realiza por métodos inmunológicos. La sonda se detecta por su unión a un anticuerpo anti-digoxigenina que lleva unida la enzima fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina utiliza como sustrato el compuesto comercial CDP, el cual al ser desfosforilado por la enzima genera de inmediato una señal de luz visible que puede ser “grabada” en un filtro fotográfico y éste revelarse.

Desarrollo del protocolo:

1. Tratar la membrana con Solución 1<sup>(1)</sup> (100 ml) durante 5 min en agitación.
2. Bloquear la membrana con Solución 2<sup>(2)</sup> durante 30 min en agitación a temperatura ambiente.
3. Introducir el filtro en una bolsa de plástico y añadir 20 ml de Solución 2 más anticuerpo (Ac) anti-digoxigenina conjugado con la fosfatasa alcalina (Roche) en una proporción de 2 µl Ac/10 ml de Solución 2. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación.
4. Eliminar la solución de Ac y lavar el filtro 2 veces con Solución 1 durante 15 min (cada vez) en agitación para eliminar el exceso de Ac.
5. Eliminar la Solución 1 y sustituirla por la Solución 3<sup>(3)</sup> (tampón de la fosfatasa) durante 5 min en agitación.
6. Tratar la membrana con la solución de CDP-Star<sup>(4)</sup> durante 5 min en reposo y en oscuridad.
7. Secar el filtro al aire e introducirlo en un casete de autoradiografía colocando sobre él una película de autodiografía (Hyper film, Amersham Pharmacia Biotech). El tiempo de exposición variará en función de la intensidad de la señal, el estado del CDP, el estado del revelador, etc.
8. Revelar la película tratándola con las siguientes soluciones: revelador<sup>(5)</sup> (hasta que aparezcan las señales de hibridación), 1 min en solución de paro<sup>(6)</sup>, y fijador<sup>(7)</sup> (hasta que la película esté transparente). Lavar con agua y dejar secar la película de autoradiografía.

<sup>(1)</sup> **Solución 1:** 11,61 g ácido maleico, 8,76 g NaCl, hasta 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada. <sup>(2)</sup> **Solución 2:** Solución 1 más 1% de agente bloqueante (Blocking Reagent de Roche). <sup>(3)</sup> **Solución 3:** 0,1M Tris HCl, pH 9,5; 0,1M NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>. <sup>(4)</sup> **Solución CDP-Star:** Se prepara diluyendo 100 veces en Solución 3, la solución del compuesto disodio 2-cloro-5-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricio[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il)-1-fenilfosfato (CDP-Star, Roche), quedando a una concentración final de 0,25 mM. Se almacena a 4°C en oscuridad. <sup>(5)</sup> **Revelador (Kodak Professional HC-110 Developer):** diluir el preparado comercial 1:30 en agua milli-Q. <sup>(6)</sup> **Paro:** Solución al 2,5% de ácido acético en agua milli-Q. <sup>(7)</sup> **Fijador:** Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:9 en agua milli-Q.

## 12. Obtención de mutantes por luz ultravioleta.

Con el fin de obtener mutantes afectados en la producción de andrastina se decidió utilizar la técnica de mutagénesis con luz ultravioleta. Esta técnica es muy simple y consiste en someter a las conidias de *P. roqueforti* a radiación de luz ultravioleta por periodos de tiempo controlados. La metodología empleada se describe a continuación.

Desarrollo del protocolo:

1. Preparar 30 ml de una suspensión de conidias de *P. roqueforti* en NaCl 0,9% ( $4,0 \times 10^8$  conidias/ml). Verter la suspensión en una placa Petri estéril.
2. Agitar la suspensión de esporas con ayuda de un agitador magnético y un imán previamente esterilizado.
3. Irradiar con luz ultravioleta usando una lámpara de 254 nm de longitud de onda con 8 W de potencia (*Vilber Lourmant*, modelo VL-4.LC) y con una separación de 6 cm.
4. Tomar 500  $\mu$ l de muestra a 0, 1, 2, 3, 4, 5, y 6 min de exposición a luz ultravioleta.
5. Terminada la exposición trabajar con la mayor oscuridad posible para evitar revertir las mutaciones.
6. Hacer diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$  a partir de las diferentes muestras.
7. Sembrar por duplicado 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones en placas PW2. Calcular el porcentaje de mortalidad de cada uno de los tiempos de exposición.
8. Una vez que se encuentra el tiempo exposición en que se logra una mortalidad mayor a un 95%, repetir la mutación y muestrear solo los tiempos escogidos.
9. Repicar las colonias que crezcan en la nueva mutación a placas de PW2 para la posterior conservación en gliceroles a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 13. Transformación de *Penicillium roqueforti*.

Para la transformación de *P. roqueforti* se utilizó como sistema de selección positiva el gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus*, que confiere resistencia frente a fleomicina. Dicho compuesto es un antibiótico metaloglucopeptídico de la familia de bleomicina (Berdy, 1980) con un amplio espectro antimicrobiano. Su mecanismo de acción se basa en la rotura del ADN monocatenario con secuencias repetidas invertidas y sobre ADN bicatenario no metilado (Hertzberg *et al.*, 1985). La resistencia frente a este antibiótico se produce por bloqueo físico de las moléculas de fleomicina mediante el producto del gen *ble*. Este gen ha sido encontrado en bacterias Gram negativas (Genilloud *et al.*, 1984; Collis y Hall, 1985), en bacterias Gram positivas (McKenzie *et al.*, 1986) y en el actinomiceto productor de fleomicina *S. hindustanus* (Drocourt *et al.*, 1990). En los experimentos de transformación realizados se han

usado plásmidos que contenían un casete de resistencia a fleomicina formado por el gen *ble* bajo el control del promotor del gen *gdh* de *Aspergillus awamori* y el terminador *Tcyc* de *Saccharomyce cerevisiae* (Russo *et al.*, 1991).

### 13.1 Obtención de protoplastos de *P. roqueforti*.

Para la elaboración del protocolo de obtención de protoplastos de *P. roqueforti* se utilizaron modificaciones de los protocolos existentes de hongos filamentosos *P. chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum*. La mayor dificultad que presentaba la obtención de protoplastos de *P. roqueforti* fue la liberación de los mismos debido a la agregación de micelio producido durante el crecimiento y los lavados previos a la utilización de las enzimas líticas.

El protocolo elaborado para la obtención de protoplastos en *P. roqueforti* durante el desarrollo de la presente memoria fue el siguiente:

1. Inocular 100 ml de medio ACM en un matraz liso de 500 ml con  $1 \times 10^8$  conidias obtenidas de un cultivo masivo de *P. roqueforti* procedentes de una placa de Petri con medio PW2 e incubada a 28°C durante 5 días.
2. Incubar la mezcla a 28°C con agitación de 240 rpm hasta que los tubos germinativos alcancen una longitud media de 10 a 15 veces el diámetro de las conidias (entre 20 y 24 horas).
3. Recoger el micelio en tubos GSA por centrifugación en una centrifuga Sorvall a 8000 rpm durante 30 min y con desaceleración 0 para evitar la compactación del micelio
4. Resuspender el pellet en 100 ml TPP<sup>(1)</sup>. Añadir 2 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M y 1 ml de ditioneitol (DTT) 1M previamente filtrado. Incubar a una temperatura de 28°C durante 2 horas y con agitación constante de 240 rpm. El tratamiento con DTT permite reducir las uniones disulfuro de la pared celular, facilitando la disgregación del micelio que suele crecer en agrupaciones.
5. Preparar el micelio por centrifugación a 4500 rpm durante 10 min con desaceleración 0. Seguidamente, lavar el micelio con TPP para eliminar los restos de DTT. Precipitar el micelio mediante las condiciones descritas anteriormente.
6. En un tubo de 10 ml, preparar 10 ml de una solución de enzimas líticas (Sigma-Aldrich Chemical Co) disueltas en TPP a una concentración de 40 mg/ml y esterilizarla por filtración.
7. Resuspender el micelio en tampón TPP hasta 10 ml agitando hasta lograr una mezcla homogénea. Agregar la solución de enzimas líticas previamente preparada y transferirlo todo a un matraz liso de 250 ml.
8. Incubar a 28°C durante 2-4 horas en agitación orbital de 80 rpm. Muestrear a cada hora para monitorizar la liberación de protoplastos.
9. Una vez que la mayoría de las hifas han generado y liberado los protoplastos, filtrar la suspensión a través de un filtro de nailon (Nytal) de 30 µm. Recoger el eluyente en 2 tubos de 10 ml.
10. Hacer dos lavados con KCM<sup>(2)</sup> centrifugando a 2500 rpm durante 5 min y 4°C.

11. Antes del último lavado contar el número de protoplastos usando una cámara Thoma.
12. Resuspender los protoplastos en KCM con un 10% (v/v) de PCM<sup>(3)</sup> obteniendo una concentración final de  $2,5 \times 10^8$  protoplastos/ml.

<sup>(1)</sup> **Tampón de protoplastos (TPP):** 50mM Tampón fosfato potásico; 0,7M KCl; pH 5,8. <sup>(2)</sup> **Solución KCM:** 0,7M KCl; 50mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM Mes, pH 5,8. <sup>(3)</sup> **Solución PCM:** 50% Polietilenglicol 6000; 50mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM Mes, pH 5,8.

### 13.2 Transformación de protoplastos.

Durante el proceso de transformación fue usado el medio de cultivo mínimo Czapek, al cual se le añadió sorbitol 1M como estabilizante osmótico, con el fin de evitar el colapso de los protoplastos. Como agente de selección de los transformantes fue usada fleomicina a una concentración de 2-10 µg/ml dependiendo del lote del antibiótico empleado y de la cepa de *P. roqueforti* a transformar.

En cada uno de los experimentos de transformación se utilizaron controles positivos y negativos, para verificar la ausencia de revertientes (colonias de mutantes espontaneas resistentes al agente de selección empleado), la sensibilidad frente a dicho agente y la viabilidad de los protoplastos usados en la transformación.

El protocolo de transformación fue el siguiente:

1. En un tubo de 10 ml realizar la siguiente mezcla de transformación:  
suspensión de protoplastos ( $2,5 \times 10^8$  p/ml).....100 µl  
ADN (1µg/µl).....10 µl  
ácido auritricarboxílico (ATA) 0,1M ..... 10 µl  
Mezclar mediante pipeteo suave procurando no generar burbujas.
2. En otro tubo hacer una mezcla idéntica a la anterior, pero sin adicionar ADN, como reacción control para determinar la capacidad de regeneración de los protoplastos, así como la aparición de colonias revertientes.
3. Incubar la mezcla en hielo durante 20 min.
4. Adicionar 500 µl de tampón PCM y mezclar suavemente. Incubar a temperatura ambiente durante otros 20 min.
5. Diluir el polietilenglicol del tampón de PCM con 600 µl de tampón KCM.
6. En un tubo de 10 ml reunir 300 µl de la reacción de transformación, la fleomicina y el medio de cultivo Cz sorbitol 1M fundido a una temperatura de entre 48 y 50°C.
7. Mezclar suavemente y añadir como una cobertera sobre 10 ml de medio base (con igual composición que la cobertera pero sin protoplastos) previamente preparado. Dejar secar.
8. Incubar a 28°C durante 4-7 días hasta la aparición de las colonias de los transformantes.
9. Repicar los transformantes obtenidos en medio Czapek con igual concentración de fleomicina y volver a incubar a 28°C durante 4-7 días.



## 14. Caracterización fenotípica.

### 14.1 Extensión radial (apical).

El crecimiento en medio sólido de los hongos filamentosos se lleva a cabo de manera radial. Desde el punto de germinación conidial, las hifas vegetativas se extienden radialmente avanzando sobre el medio de cultivo hasta colonizar toda su superficie formando un círculo. La velocidad a la que se extiende el radio de este círculo sobre el medio es una medida directa del crecimiento vegetativo del hongo.

Desarrollo del protocolo:

1. Inocular 0,2 µl de una suspensión de conidios de  $1 \times 10^6$  conidios/ml, en el centro de tres placas de Petri de 80 mm de diámetro con el medio de cultivo a probar<sup>(1)</sup>.
2. Incubar a 28°C durante 7 días.
3. Medir el diámetro de la colonia, tomando como referencia el frente externo (de color blanco) de hifas vegetativas. Tomar dos medidas, perpendiculares entre si, por colonia.
4. Realizar estas mediciones hasta las 168 horas cada 24 horas a partir de las 48 horas de incubación.
5. Procesar los datos y determinar la tasa de extensión apical en mm/hora.

<sup>(1)</sup> Se ensayaron los medios Czapek, PW, CYA y PDA.

### 14.2 Peso seco en medio líquido.

La densidad del crecimiento en medio líquido se cuantificó mediante la determinación del peso seco por volumen de medio de cultivo.

Desarrollo del protocolo:

1. Recoger las conidias, a partir de placas de Petri con medio PW2, con 8 ml solución estéril de NaCl al 0,9% por placa. Homogenizar la suspensión de conidias y pasarlas a través de un filtro de nailon de 30 µm de poro.
2. Recoger la solución y cuantificar el número de conidias presentes con una cámara Thoma. Calcular el volumen necesario para conseguir  $1-2 \times 10^9$  conidias y centrifugarlo a 4.000 rpm durante 5-10 min.
3. Resuspender en 10 ml del medio de cultivo a utilizar<sup>(1)</sup> e inocular con ésta suspensión, 110 ml del medio en un matraz de 500 ml.
4. Incubar a 28°C en agitación orbital a 250 rpm durante 7 días. Tomar en un tubo de 10 ml una muestra de 6 ml del cultivo cada 24 horas, desde las 0 horas.
5. Centrifugar la muestra a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Retirar cuidadosamente el

sobrenadante.

6. Lavar el precipitado en 2 ml de HCl 1M, resuspender y centrifugarlo a 4000 rpm durante 10 min. Descartar el sobrenadante y repetir, en las mismas condiciones, el lavado con 1 ml de NaCl 0,9% (p/v).
7. Descartar completamente el sobrenadante. Sumergir cada tubo en N<sub>2</sub> líquido hasta su completa congelación y seguidamente realizar un choque térmico sumergiendo por unos seg el tubo en un baño de agua a 55-60°C. Este proceso genera el desprendimiento del micelio aún congelado.
8. Desprender el taco congelado de micelio, por medio de unos golpes sobre el tubo y depositarlo sobre un cestillo previamente tarado y rotulado.
9. Secar los cestillos con el micelio a 65°C hasta que el peso permanezca constante (unas 72-84 horas). Pesar los cestillos y determinar el peso seco (en mg/ml) por la diferencia del peso vacío y lleno.

<sup>(1)</sup> Se emplearon los medios: MPPY y Czapek líquido.

## **15. Métodos para análisis de ARN.**

La obtención de ARN presenta una dificultad añadida debido a la existencia de ARNasas, enzimas muy activas que no necesitan cofactores para desarrollar su actividad. Para las diferentes técnicas en que se trabajó con ARN fue muy importante el uso de guantes a lo largo de todos los procesos. También se extremó el grado de limpieza del material utilizado, desinfectando con cloroformo y etanol el material de vidrio, esterilizando (preferiblemente dos veces) en autoclave el material de plástico y cuidando la limpieza del lugar de trabajo, para lo cual se utilizó agua oxigenada y papel de filtro limpio para cubrir las superficies sobre las que se ejecutaron las diferentes técnicas.

### **15.1 Obtención de ARN total a gran escala.**

La extracción del ARN total de *P. roqueforti* se realizó en las mismas condiciones en que se cuantificó la producción de toxina PR. El medio utilizado fue arroz previamente hidratado y esterilizado. Estas condiciones de crecimiento presentaban la dificultad de que el micelio crece entre los granos de arroz sin posibilidad de separación de éste del medio de cultivo. Por tal motivo la extracción del ARN se realizó de una mezcla micelio en medio de arroz.

Para la extracción se realizaron modificaciones al procedimiento descrito por (Chomczynski y Sacchi, 1987) previamente utilizado en el laboratorio para la extracción de ARN total en *P. chrysogenum*.

## Desarrollo del protocolo:

1. Crecer *P. roqueforti* en medio arroz durante 13 días. Recoger el cultivo y compactarlo entre papeles de filtro.
2. Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenar a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN. Es conveniente guardar la muestra en pequeñas porciones por si es necesario realizar más de una extracción.
3. Pulverizar la muestra congelada en un mortero con nitrógeno líquido hasta reducirlo a polvo fino, y recoger 500 mg en un microtubo de 2,2 ml. A continuación, se añaden 1,3 ml de tampón EFA<sup>(1)</sup> y se agita vigorosamente aplicando vortex durante un minuto, para conseguir una mezcla homogénea.
4. Centrifugar a 13200 rpm durante 5 min a 4°C. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a otro microtubo de 2,2 ml. Añadir 130 µl de CIA y agitar enérgicamente durante 15 seg.
5. Centrifuga a 13200 rpm durante 5 min a 4°C, recoger la fase superior obtenida y hacer una extracción con fenol/CIA.
6. Precipitar el ARN total añadiendo 0,5 volúmenes de LiCl 8M<sup>(2)</sup> e incubar a 4°C durante al menos 30 min.
7. Centrifugar a 13200 rpm durante 15 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente con una micropipeta sin arrastrar el precipitado.
8. Finalmente, lavar el precipitado dos veces, primero con 1 ml y luego con 400 µl de etanol al 70% centrifugando a 13200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Resuspender el ARN precipitado en 150 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y conservar hasta su utilización a -80°C.

<sup>(1)</sup>**Tampón EFA:** 1 volumen de tampón de extracción suplementado con 7 µl de β-mercaptoetanol y 1 volumen de fenol neutro. **Tampón de extracción:** isotiocianato de guanidinio 4M y lauril sarcosina al 5% en tampón citrato sódico 25mM pH 7. <sup>(2)</sup>**LiCl 8M** en agua libre de ARNasas. <sup>(3)</sup>**H<sub>2</sub>O libre de ARNasas:** H<sub>2</sub>O con calidad milli-Q recogida en una botella libre de ARNasas (tratada previamente con peróxido de hidrógeno y etanol absoluto) autoclavada dos veces.

La concentración del ARN se valoró utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. La integridad del ARN puede visualizarse cargando una alícuota en un gel de agarosa al 1%.

## 15.2 Tratamientos con ADNasas de las muestras de ARN.

Las muestras de ARN obtenidas presentaron una alta contaminación con ADN debido a las características de las muestras utilizadas. Por tal motivo se les realizó un doble tratamiento con ADNasas para lograr la total eliminación del ADN contaminante.

El primer tratamiento se realizó con DNase I (Sigma). Este tratamiento se realizó en microtubos. El segundo tratamiento se realizó con la DNase I (QIAGEN) llevándose a cabo con el kit RNeasy (QIAGEN).

**Desarrollo del protocolo:**

Primer tratamiento con DNase I (Sigma) en microtubo.

1. Calcular el volumen necesario de la solución de ARN para tratar 4 µg de ARN.
2. Añadir 10 µl de buffer de reacción 10x y 10 µl de DNase I y completar con agua libre de ARNasa hasta un volumen de 100 µl.
3. Mezclar sin movimientos bruscos e incubar 45 min a 25°C.

Segundo tratamiento con DNase I (QIAGEN) en columna.

4. Añadir 350 µl del buffer RLT (β-mercaptoetanol) y mezclar por pipeteo.
5. Adicionar 250 µl etanol (99%) y mezclar por pipeteo.
6. Colocar la muestra en la columna RNeasy.
7. Centrifugar 30 seg a 13200 rpm y descartar el líquido resultante.
8. Añadir una mezcla 10 µl de DNase I (QIAGEN) y 70 µl de buffer RDD directamente sobre la superficie de sílica de la columna.
9. Incubar durante 45 min a 25°C.
10. Lavar la columna añadiendo 500 µl de RW1 y centrifugando durante 30 seg a 13200 rpm.
11. Transferir la columna a un nuevo tubo de 2 ml.
12. Hacer dos lavados añadiendo 500 µl RPE y centrifugando a 13200 rpm.
13. Inmediatamente después del segundo lavado centrifugar durante 1 min a 13200 rpm para eliminar los restos de RPE de la membrana de sílica.
14. Transferir la columna a un nuevo micro tubo de 1,5 ml.
15. Eluir el ARN de la columna añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y centrifugando durante 1 min a 13200 rpm.
16. Hacer una segunda elución como en el paso anterior.
17. Colocar el tubo con el ARN eluido en hielo y determinar la concentración con el espectrofotómetro NanoDrop.

**Nota:** Los buffer RLT, RPE y RW1 son soluciones del kit RNeasy (QIAGEN) de las cuales no se conoce la composición.

### **15.3 Transcripción reversa de ARN (RT-PCR).**

Esta técnica permite la síntesis de ADNc a partir de ARN y su posterior amplificación por PCR. De esta forma se puede hacer una valoración semicuantitativa del nivel de expresión génica. Esto es posible debido a que mediante una reacción de PCR, teóricamente, en cada ciclo se duplica el número de copias de una determinada molécula, y tras un número n de ciclos, la cantidad de ADN amplificado será proporcional al número de moléculas de partida. Para llevar a cabo la reacción de RT-PCR se ha utilizado el kit comercial Superscript™ RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen).

El kit lo forman dos componentes fundamentales:

- SuperScrip™ II RT/Platinum®Taq Mix: Contiene una mezcla de Transcriptasa Reversa (SuperScrip™ II RT) y de ADN polimerasa (Platinum®Taq) para la síntesis de ADNc y su posterior amplificación por PCR.
- 2x Mix: Consiste en un tampón optimizado para las transcripciones reversas y amplificaciones por PCR. Contiene Mg<sup>2+</sup>, desoxi-ribonucleótidos trifosfato y estabilizadores.

En las Tabla 4 y Tabla 5 se especifican las condiciones generales de los componentes de reacción y programas de PCR recomendados por el fabricante del kit Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen).

La síntesis de ADN complementario se realiza mediante la incubación a 45-55°C durante 30 min. Para inactivar la retrotranscriptasa se incuba la mezcla a 94°C durante 2 min. El fragmento de ADN complementario se amplifica mediante PCR.

**Tabla 4.** Componentes necesarios para realizar una RT-PCR y cantidades para una reacción de 50 µl.

ARN molde	200-400 ng
2x Mix	25 µl
Oligonucleótido F (10 µM)	1 µl
Oligonucleótido R (10 µM)	1 µl
RT/Platinum®Taq Mix	1 µl
Agua milli-Q libre de ARNasas	Completar a 50 µl

**Tabla 5.** Programa de RT-PCR aplicado.

		Actividad	Temperatura	Tiempo	
Proceso	RT	Síntesis de cDNA	50°C	30 min	N ciclos
	PCR	pre-Desnaturalización	94°C	2 min	
		Desnaturalización	94°C	15 seg	
		Anillamiento	55°C – 60°C	30 seg	
		Extensión	72°C	30 seg	
		Pausa	4°C		

El resultado de la reacción de RT-PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa, en este caso al 2% (p/v).

Cuando se quiso comparar niveles de expresión de un gen en diferentes condiciones se cuantificaron las bandas por densitometría usando el programa “Gel-Pro Analyzer” (Media Cybernetics). Los niveles de transcripción fueron normalizados comparando la intensidad de la señal de cada ARNm con la señal del ARNm de  $\beta$ -actina. Se consideró que hubo diferencias significativas en los niveles de expresión cuando  $p < 0,01$ .

## **16. Métodos para el análisis de proteínas.**

### **16.1 Extracción de proteínas de *P. roqueforti*.**

La extracción de proteína se realizó según las modificaciones realizadas por Jami *et al.*, (2010) al procedimiento descrito por Fernández-Acero *et al.*, (2006).

Desarrollo del protocolo:

1. Preparar un inóculo con  $1 \times 10^8$  conidias por ml, a partir de una placa bien crecida de *P. roqueforti* en PW2.
2. Sembrar una placa de 140 mm de diámetro de medio CYA con 100  $\mu$ l del inóculo de *P. roqueforti* ( $1 \times 10^7$  conidias) usando la técnica del papel celofán para facilitar la posterior recogida del micelio. Incubar a 28°C durante 40 horas.
3. Recoger el micelio y colocarlo en un tubo de 50 ml. Conservar a -80°C hasta el momento de procesar la muestra.
4. Machacar el micelio en un mortero con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino y pasarlo a un tubo de 50 ml con un peso conocido. Mantenerlo a -20°C.
5. Obtener el peso final del tubo y calcular el peso del micelio pulverizado.
6. Resuspender el micelio en TPP+DTT<sup>(1)</sup>. Añadir a razón de 5 ml por g de peso del micelio y homogenizar en vortex.
7. Agitar durante al menos 2 horas a 4°C.
8. Clarificar las proteínas por centrifugación. Primero en el tubo de 50 ml a 4400 rpm durante 10 min. Luego en microtubos de 2 ml a 13200 rpm durante 15 min.
9. Precipitar las proteínas añadiendo igual volumen de Solución TCA/acetona<sup>(2)</sup>. Incubar durante al menos 30 min a -20°C.
10. Centrifugar a 4400 rpm y 4°C durante 10 min. Eliminar el sobrenadante por vertido cuidando de no perder el precipitado.
11. Lavar 2 veces con de solución Acetona/DTT<sup>(3)</sup>. Se utiliza igual volumen que el usado para precipitar. Homogenizar usando el vortex y recoger el precipitado por centrifugación.
12. Eliminar el sobrenadante y añadir 10 ml de acetona 80%, homogenizar bien y pasar a un tubo de 10 ml.
13. Centrifugar a 4400 rpm 4°C y eliminar el sobrenadante. Eliminar los restos de acetona con una pipeta y secar ligeramente. Resuspender el precipitado en 100-300  $\mu$ l de tampón de rehidratación<sup>(4)</sup>.

14. Agitar entre 1-2 horas hasta resuspender del todo.
15. Centrifugar 1 min y recoger el sobrenadante.
16. Cuantificar las proteínas totales mediante el método de Bradford y guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

<sup>(1)</sup> **TPP+DTT**: 10 mM tampón fosfato potásico, pH 7,4; 0,07% DTT. El tampón debe tener un inhibidor de proteasas. Antes de usar, añadir 2 pastillas de Complete (Roche) por cada 50 ml. Agitar hasta que se disuelve completamente. <sup>(2)</sup> **Solución TCA/Acetona**: 20% TCA; 0,14% DTT en acetona. <sup>(3)</sup> **Solución Acetona/DTT**: 0,7% DTT en acetona. <sup>(4)</sup> **Tampón de rehidratación**: 8 M urea; 2% CHAPS; 0,002% Bromofenol azul, suplementado al momento con: [20 mM DTT; 0,5% Amfolitos (GE Healthcare)].

## 16.2 Determinación de la concentración de proteínas.

La cuantificación de proteínas existentes en una solución se llevó a cabo mediante el método descrito por Bradford, (1976). Para ello se utilizó el compuesto *Bio-Rad Dye reagent* (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo tiene como principio el cambio de absorción de 465 nm a 595 nm del azul de Coomassie al reaccionar con proteínas. La concentración de la muestra problema se determinó al comparar con una recta patrón realizada con seroalbúmina bovina (MBI Fermentas). Para ello se realizó una solución madre de seroalbúmina bovina (BSA) con una concentración de 0,25 mg/ml, a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones de referencia para la recta patrón que se especifican en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Concentraciones de BSA para elaborar la curva patrón.

<b>µg de proteínas</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>3,75</b>	<b>5,0</b>	<b>6,25</b>	<b>7,5</b>	<b>8,75</b>	<b>10</b>
<b>µl de solución madre</b>	0	2	5	10	15	20	25	30	35	40
<b>µl de agua</b>	800	798	795	790	785	780	775	770	765	760

El protocolo para determinar la concentración de proteínas se desarrolló de la siguiente manera:

1. Preparar la solución madre de BSA con una concentración de 0,25 mg/ml.
2. Distribuir por duplicado los volúmenes de BSA en microtubos de 1,5 ml y completar con agua hasta 800 µl.
3. Preparar por duplicado 800 µl de una dilución 1/2000 de la muestra problema.
4. Añadir 200 µl de la solución de Bradford a los viales de la curva patrón y luego a los viales de las muestras problema. Agitar y dejar reposar durante 5 min en oscuridad.
5. Agitar nuevamente y medir la absorbancia a 595 nm en el mismo orden que fue añadida la solución de Bradford.

### 16.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes.

El dodecil-sulfato sódico (SDS) es un detergente iónico que disocia las proteínas oligoméricas en sus monómeros y rompe los enlaces por puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas entre los péptidos. El SDS despliega la estructura tridimensional de las proteínas y les confiere una carga negativa proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica.

La electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) se realizó según el método descrito por Laemmli, (1970). Los geles de poliacrilamida utilizados constan de dos zonas, una superior concentradora y una inferior separadora. Las dos fases difieren en sus características, como son: porosidad, pH y fuerza iónica, así como en su función. La parte superior sirve para concentrar la muestra en el límite de separación de ambas fases y así permitir la entrada homogénea de las proteínas en la siguiente fase del gel (Tabla 7). En la parte inferior se realiza la separación de las proteínas según su peso molecular (Tabla 8).

**Tabla 7.** Composición de los geles desnaturizantes de proteínas. Parte concentradora.

Componente	Volumen
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	1,3 ml
Tris-HCl 0'5M, pH 6'8	2,5 ml
SDS 20% (p/v)	50 µl
Persulfato amónico 10% (p/v)	50 µl
TEMED <sup>(1)</sup>	10 µl
Agua milli-Q	6,09 ml

<sup>(1)</sup>TEMED: N, N, N', N'-Tetrametilendiamina.

**Tabla 8.** Composición de los geles desnaturizantes de proteínas. Parte separadora.

Componentes	Concentración final de poliacrilamida		
	5%	12%	15%
<b>Acrilamida/bis-acrilamida 30%<sup>(1)</sup></b>	<b>2,5 ml</b>	<b>4,0 ml</b>	<b>5,0 ml</b>
<b>Tris-HCl 1,5M, pH 8,8</b>	<b>2,5 ml</b>	<b>2,5 ml</b>	<b>2,5 ml</b>
<b>SDS 20% (p/v)</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>
<b>Persulfato amónico 10% (p/v)</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>
<b>TEMED</b>	<b>5 µl</b>	<b>5 µl</b>	<b>5 µl</b>
<b>Agua milli-Q</b>	<b>4,9 ml</b>	<b>3,4 ml</b>	<b>2,4 ml</b>

<sup>(1)</sup>Acrilamida/bis-acrilamida (National Diagnostic): 30% (p/v) de acrilamida y 0,8% (p/v) de bis-acrilamida.

**Nota:** Se indican las cantidades necesarias para 10 ml de volumen final y diferentes porcentajes de acrilamida/bis-acrilamida. Las distintas concentraciones de poliacrilamida están indicadas para la resolución de proteínas de los siguientes rangos de peso molecular: 7% entre 250 y 50 kDa; 12% entre 100 y 20 kDa; 15% entre 60 y 10 kDa.



## Desarrollo del protocolo:

1. Montar la cubeta para la polimerización de los geles con el sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm según las indicaciones del fabricante. El grosor de gel utilizado fue de 0,75 mm.
2. Preparar la mezcla para el gel separador (Tabla 8), añadiendo al final el persulfato amónico y el TEMED (catalizadores de la reacción de polimerización).
3. Una vez añadidos los catalizadores de la polimerización, mezclar ligeramente y depositar la mezcla entre los cristales de la cubeta hasta la altura deseada. Cubrir inmediatamente la mezcla con 2-butanol saturado con agua o isopropanol (2-propanol) y dejar polimerizar el tiempo necesario (entre 30-45 min).
4. Preparar la solución del gel concentrador (Tabla 7).
5. Colocar el peine para formar los pocillos entre los dos cristales y añadir el gel concentrador, dejándolo polimerizar durante 15 min.
6. Diluir las muestras con al menos 2 volúmenes de tampón de muestra desnaturalizante<sup>(1)</sup> y hervirlas durante 5 min.
7. Colocar los geles dentro de la cámara de electroforesis y llenarla con tampón de electroforesis<sup>(2)</sup>. Cargar las muestras en los pocillos.
8. Realizar la electroforesis a una tensión continua de 100-150 V hasta que la banda correspondiente al colorante del tampón de muestra desnaturalizante comience a salir del gel.
9. Retirar los geles de la cubeta. Fijarla durante 30 min en solución fijadora<sup>(4)</sup> con agitación. Teñirlos con solución de teñido<sup>(3)</sup> toda la noche.
10. Eliminar la solución de teñido y hacer lavados de 15 a 30 min con agua milli-Q hasta que desaparece el color de fondo.

<sup>(1)</sup>Tampón de muestra desnaturalizante: 1,2 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 1 ml de SDS 20%; 1 ml de glicerol; 500 µl de Azul de bromofenol al 0,5% en agua y 5,85 ml de agua milli-Q. <sup>(2)</sup>Tampón de electroforesis: 3 g de Tris-base (20mM); 14 g de glicina (186mM) y 5 ml de SDS 20% (0,1%); completar con agua hasta 1 litro. Comprobar que el pH sea de 8,3 (± 0,2). <sup>(3)</sup>Solución de teñido: 10% (v/v) ácido fosfórico; 10% sulfato de amonio; 0,12% Coomassie Blue G-250; 20% metanol anhidro. <sup>(4)</sup>Solución fijadora: 7% (v/v) ácido acético glacial; 7% (v/v) metanol; en agua milli-Q.

#### 16.4 Análisis bidimensional de proteínas de *P. roqueforti*.

La electroforesis bidimensional (2D) fue utilizada por primera vez por O'Farrell, (1975) y Klose, (1975). Es un método realizado en dos pasos que permite el análisis de mezclas complejas de proteínas basándose en dos propiedades distintas de las mismas. La primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) separa las proteínas de acuerdo a su punto isoelectroico (pI); la segunda dimensión (SDS-PAGE) separa las proteínas en función de su peso molecular.

##### 16.4.1 Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF)

Las proteínas son moléculas anfóteras, lo que significa que pueden presentar una carga neta positiva, negativa o cero, dependiendo del pH del entorno. La carga neta de

una proteína es la suma de todas las cargas negativas y positivas de las cadenas laterales de sus aminoácidos y de sus extremos amino y carboxilo terminales. El punto isoeléctrico (pI) es el pH específico al cual la carga neta de la proteína es cero. En un gradiente de pH, bajo la influencia de un campo eléctrico, una proteína se moverá a la posición del gradiente en la cual su carga neta sea cero. Esta es la base del efecto de isoelectroenfoque (IEF), por el cual se concentran las proteínas en su pI y permite separarlas basándose en pequeñas diferencias de carga (*2-D Electrophoresis using immobilized gradients. Principles and Methods. Amersham Biosciences*).

En este trabajo se utilizó, como sistema de separación de proteínas, el *IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare), y como rango de pH se utilizaron tiras de 18 cm con gradientes de pH inmovilizados de 3,0-10,0.

Desarrollo del protocolo:

1. Para tiras de 18 cm, poner en un microtubo de 1,5 ml: 300-350 µg de proteína, 0,5-1% de IPG-buffer<sup>(1)</sup> 3-11 NL y 20-60mM de 2,5M DTT (Ditiotreitol). Completar con tampón de rehidratación<sup>(2)</sup> hasta 350 µl. Mezclar y dar un pulso de centrifuga.
2. Depositar los 350 µl de la mezcla en un sarcófago (*Holder*) para tiras de 18 cm del sistema *IPGphor Isoelectric Focusing System I ó II* (GE Healthcare).
3. Retirar el plástico de protección de la tira con gradiente de pH inmovilizado y colocarla en el sarcófago con el gel desecado en contacto con las proteínas. Evitar la formación de burbujas.
4. Cubrir con 2-2,5 ml de *DryStrips Cover Fluid* (GE Healthcare).
5. Iniciar el programa de isoelectroenfoque (IEF) (con un máximo de 75 µA/tira y 20°C) consistente en: 1h a 0 V (rehidratación); 12 h a 30 V; 2 h a 60 V; 1 h a 500 V; 1 h a 1000 V, subir en gradiente durante media hora hasta 8000 V y aproximadamente 7 h a 8000 V hasta llegar a los 50000 Vh (Voltios hora).
6. Retirar las tiras y continuar con la fase de equilibrado o bien congelar a -80 °C.

<sup>(1)</sup>**IPG-buffer o Pharmalite (Amersham Biosciences)**: mezcla comercial de anfolitos que potencian la migración de las proteínas y producen una conductividad uniforme a través del gradiente de pH de la tira. <sup>(2)</sup>**Tampón de rehidratación**: 8 M Urea; 2% (p/v) CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato); 0,01% azul de bromofenol. Filtrar con filtros de 0,45 µm (Millipore). Conservar congelado a -20°C.

#### 16.4.2 Segunda dimensión (SDS-PAGE)

Como se describió en el apartado dedicado a geles monodimensionales, el SDS (dodecil-sulfato sódico) forma complejos SDS-proteínas confiriéndole a las mismas una carga neta negativa, lo que permite su migración electroforética. Además, previamente a la segunda dimensión las tiras con las proteínas inmovilizadas en su

interior son tratadas con ditioneitol (DTT), el cual es un agente reductor que rompe los puentes disulfuro presentes en las proteínas. La combinación de SDS y DTT hace que la migración de las proteínas en geles de poliacrilamida dependa casi exclusivamente de peso molecular. Las proteínas también sufren un segundo tratamiento con iodoacetamida antes de la segunda dimensión, lo que previene la reoxidación durante la electroforesis evitando así la formación de artefactos.

**Tabla 9.** Composición de geles desnaturalizantes de proteínas. Segunda dimensión.

Componentes	12,5% poliacrilamida
<b>Acrilamida/bis-acrilamida 30%</b> <sup>(1)</sup>	<b>166,8 ml</b>
<b>Tris-HCl 1,5M pH 8,8</b>	<b>100 ml</b>
<b>SDS 20% (p/v)</b> <sup>(2)</sup>	<b>2 ml</b>
<b>Persulfato amónico 10% (p/v)</b>	<b>2 ml</b>
<b>TEMED</b>	<b>132 µl</b>
<b>Agua milli-Q</b>	<b>129,2 ml</b>

<sup>(1)</sup>Debido a los grandes volúmenes que se utilizan de la mezcla acrilamida/bis-acrilamida y a la pureza necesaria para los geles bidimensionales, ésta se adquiere de forma comercial (Comercial Canda). <sup>(2)</sup>Filtrar con filtros de 0,45 µm (Millipore).

**Nota:** Se indican las cantidades para 6 geles (400 ml) del sistema *Ettan DALT Six* (GE Healthcare).

#### Desarrollo del protocolo:

1. Preparar la mezcla para el gel (SDS-PAGE) según lo indicado en la Tabla 9 excepto el persulfato amónico.
2. Desgasificar la mezcla en un Kitasato conectado a una bomba de vacío.
3. Montar los cristales del sistema *Ettan DALT Six* (Amersham Biosciences) para la polimerización de los geles según las indicaciones del fabricante. El grosor de los geles utilizados fue de 1 mm.
4. Añadir el persulfato amónico a la mezcla y agitar unos segundos. Dispensar la mezcla entre los cristales hasta la altura deseada. Cubrir inmediatamente la mezcla con 2-propanol y dejar polimerizar durante toda la noche.
5. Eliminar el 2-propanol, lavar con agua milli-Q el frente del gel y rellenar con tampón de electroforesis a 1x<sup>(1)</sup>. Si no se van a utilizar de inmediato, se pueden conservar a 4°C durante 2 días cubriendo el frente con tampón de electroforesis 1x.
6. Equilibrar las tiras en 2 pasos de 15 min con tampón de equilibrado<sup>(2)</sup>. Primero: tampón de equilibrado (4,870 ml) suplementado con 130 µl de DTT 2,5M. Segundo: tampón de equilibrado (5 ml) suplementado con 200 mg de iodoacetamida. Se utilizan 5 ml de tampón por cada tira de 18 cm. Mantener las tiras en el tampón con agitación constante.

7. Lavar las tiras con agua milli-Q y depositarlas sobre un papel Whatman 3MM.
8. Eliminar 1 cm de los extremos de cada tira e introducir las tiras con las proteínas inmovilizadas entre los cristales. Si se desea utilizar marcador de peso molecular, dispensar 5 µl de marcador preteñido en un trozo de papel Whatman 3MM de 10-15 mm x 2 mm inmediatamente antes de iniciar la carrera.
9. Introducir los geles en la cámara de electroforesis y añadir 1,5 L de tampón de electroforesis 2x en la cámara superior del sistema. En la cámara inferior se utilizan 5 L de tampón de electroforesis 1x, los cuales se pueden reutilizar varias veces.
10. Realizar la separación de las proteínas en las siguientes condiciones: 25°C, 3-5 W por gel durante 30 min, 15-20 W por gel (180 W máximo) durante 3,5-4 horas.

<sup>(1)</sup>**Tampón de electroforesis 10x:** 250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,92 M glicina; 1% (p/v) SDS; agua hasta 1 litro. Almacenar a temperatura ambiente. <sup>(2)</sup>**Tampón de equilibrado:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M urea; 30% glicerol; 2% SDS. Filtrar con filtros de 0,45 µm (Millipore). Conservar a temperatura ambiente.

Se utilizó el marcado de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (BioRad), marcador comercial preteñido con bandas entre 200 y 10 kDa. Se utilizan 3-5 µl por gel.

### 16.5 Detección de proteínas.

Actualmente son varios los métodos descritos para la detección de proteínas en geles bidimensionales. En todos los métodos es deseable que se cumplan las siguientes características: alta sensibilidad, amplio rango lineal para la cuantificación, compatibles con espectrometría de masas, baja toxicidad y seguros para el medio ambiente.

Autoradiografía o fluorografía: es el más sensible de los métodos de detección, por debajo de los 200 fg de proteína. La mayor desventaja es la necesidad de un marcaje radiactivo *in vivo* de las proteínas.

Difference Gel Electrophoresis (DIGE): es el más sensible de los métodos no radiactivos de tinción, por debajo de los 125 pg. Su mayor inconveniente es el económico debido al equipamiento necesario para su utilización.

Tinción de plata: su sensibilidad se sitúa por debajo de 1 ng. Presenta un gran número de pasos y la calidad de todos los reactivos es crucial en el resultado. Omitiendo el glutaraldehído en la sensibilización y el formaldehído en la solución de nitrato de plata es compatible con análisis por espectrometría de masas.

Tinción con Coomassie: es aproximadamente 50 ó 100 veces menos sensible que la tinción de plata, pero es un método relativamente simple y más cuantitativo que la

tinción de plata. Dentro de este protocolo existen métodos de tinción con Coomassie coloidal que incrementan la sensibilidad (por debajo de 100 ng de proteína/punto).

Tinción negativa de Zinc-Imidazol: presenta un límite de detección de 15 ng por punto proteico y es compatible con espectrometría de masas, pero es una técnica pobre para la cuantificación.

Marcaje fluorescente y tinción fluorescente: utiliza colorantes del tipo SYPRO™, presentando una sensibilidad entre el Coomassie coloidal y la tinción modificada de plata. Requiere escáneres que detecten fluorescencia y es compatible con espectrometría de masas.

En este trabajo se utilizó la tinción DIGE debido a su alta sensibilidad y a la información que brinda.

Además se utilizó la tinción de Coomassie para teñir los geles preparativos de los que se picaron los spots de las proteínas seleccionadas para su análisis por el método DIGE.

### 16.5.1 Tinción por el método de Coomassie Coloidal.

Desarrollo del protocolo:

1. Una vez finalizada la segunda dimensión, retirar los geles de la cámara de electroforesis y extraerlos de los cristales. Eliminar los restos de agarosa.
2. Situar los geles en bandejas de teñido y añadir 300 ml de la solución fijadora <sup>(1)</sup>. Mantener en agitación durante 30 min.
3. Eliminar la solución fijadora y hacer tres lavados de 10 min con agua milli-Q.
4. Quitar los restos de agua y añadir 300 ml de solución de teñido <sup>(2)</sup>. Incubar durante toda la noche en agitación.
5. Retirar la solución de teñido que contiene el Coomassie y hacer lavados de 30 min con agua milli-Q para eliminar el exceso de colorante.

<sup>(1)</sup>Solución fijadora: 7% (v/v) ácido acético glacial; 7% (v/v) metanol; en agua milli-Q. <sup>(2)</sup>Solución de teñido: 10% (v/v) ácido fosfórico; 10% sulfato de amonio; 0,12% Coomassie Blue G-250; 20% metanol anhidro.

### 16.5.2 Tinción por DIGE

Esta técnica se caracteriza por el marcaje de las proteínas previamente a su separación y por el empleo de un estándar interno constituido por la mezcla equimolar de todas las muestras a analizar. Este patrón interno se analiza en cada uno de los geles del experimento junto con muestras a comparar. Las muestras se marcaron con

tres tipos diferentes de fluorocromos en función de sus espectros de excitación y emisión Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) y Cy5 (633/670) (*CyDye™ DIGE Dyes*, GE Healthcare). Estos fluorocromos presentan un grupo tioéster NHS reactivo diseñado para producir una unión covalente al grupo amino y de los residuos de lisina. En estas condiciones se marcan únicamente el 3% las de proteínas presentes y sólo una lisina por molécula de proteína (Alban *et al.*, 2003).

El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Limpiar 250 µg de proteína total de cada una de las muestras usando el *Clean Up Kit* (Amersham-GE). Seguir el procedimiento indicado por el fabricante.
2. Resuspender las proteínas en tampón RB2<sup>(1)</sup>.
3. Ajustar a pH 8,5 con NaOH (100-250 mM) utilizando papel indicador de pH para medir el pH.
4. Marcar cada muestra de 50 µg con CY3 ó CY5 y 25 µg con Cy2 (control interno).
5. Mantener a temperatura ambiente los colorantes al menos durante 5 min para que se atemperen y no se hidraten al abrirse.
6. Preparar una solución maestra añadiendo 5 µl de dimetilformamida a una concentración de 5nM de colorante quedando finalmente a una concentración de 1nM. Esta solución se puede almacenar hasta 3 meses.
7. Preparar la solución de trabajo a 400pM, 2 partes de solución maestra en 3 partes de dimetilformamida.
8. Añadir 50 µg (5-10 µg/µl) de muestra en un micro tubo de 1,5 ml. Adicionar 1 µl del colorante (solución de trabajo). Mezclar en vortex y centrifugar. Incubar en oscuridad durante 30 min y en hielo.
9. Parar el proceso de tinción añadiendo 1 µl de lisina 10mM. Incubar 10 min en hielo y en ausencia de luz.
10. Combinar las muestras que se correrán en un mismo gel. Completar hasta 350 µl con tampón RB<sup>(2)</sup> suplementado con IPG buffer 0,5% y DTT 20mM.
11. Finalmente se realiza el isoelectroenfoco y los demás pasos del análisis bidimensional.

<sup>(1)</sup>Tampón RB2: Urea 8 M; CHAPS 4%; Tris 30 mM (antes de usarse) <sup>(2)</sup>Tampón RB: Urea 8M; CHAPS 2%; 0,01% azul de bromofenol.

## 16.6 Digestión trípica de proteínas separadas mediante electroforesis 2D-PAGE.

Se siguió el siguiente protocolo (Havlis *et al.*, 2003):

1. Cortar los puntos de proteínas con una punta de pipeta recortada y depositar cada una de ellas en un microtubo de 1,5 ml.
2. Añadir agua milli-Q hasta que cubra el punto y evite su deshidratación. Guardar a 4°C hasta el procesamiento de las muestras.

3. Realizar 2 lavados con agua milli-Q durante 10 min. Los lavados se realizan a 25°C y en agitación (1400 rpm).
4. Deshidratar los puntos añadiendo 50 µl de acetonitrilo (AcN) y esperar 5 min para que el gel se deshidrate y libere el colorante. Repetir esta operación dos veces con el fin de eliminar el Coomassie quedando el gel más o menos blanco. Entre cada deshidratación hacer un lavado con agua milli-Q.
5. Secar los puntos en centrifuga de vacío (Jouan RC-10).
6. Cubrir los puntos con una solución 10mM de Ditiotreitól (DTT) en bicarbonato amónico 25mM (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), incubar 30 min a 56°C con agitación de 300 rpm.
7. Retirar la solución de DTT con una micropipeta.
8. Añadir 50 µl AcN y retirar rápidamente para incubar con iodoacetamida 55mM (10 mg /ml) en 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> durante 15 min y en oscuridad.
9. Eliminar la iodoacetamida y añadir 20 µl de AcN, se incuba durante 5 min y se retira.
10. Añadir 20 µl NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a 25mM e incubar 5 min, tras los cuales sin retirar el sobrenadante se añade igual volumen de AcN y se incuba 15 min más.
11. Retirar el sobrenadante y secar en centrifuga de vacío.
12. Añadir 10 µl tripsina a una concentración de 12,5 ng/µl en 25mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Incubar en hielo durante 45 min para que los puntos absorban la tripsina pero sin que esta llegue a actuar.
13. Retirar el sobrenadante y añadir NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM cubriendo completamente los puntos.
14. Incubar durante al menos 6 horas a 37°C, preferiblemente toda la noche.
15. Tras la digestión, centrifugar y recoger el sobrenadante en un nuevo microtubo.
16. Añadir un 50% AcN con 0.5% ácido trifluoroacético (TFA) y sonicar 10 min. Pasar el sobrenadante al microtubo en el que se había recogido el sobrenadante en el paso anterior.
17. Realizar otra extracción de 10 min pero sólo con AcN y depositar los sobrenadantes junto con la extracción anterior.
18. Llevar a sequedad usando la centrifuga de vacío y resuspender en 5 µl de 50% AcN con 0,1% TFA.

## 17. Aplicación de diseño de experimento.

En el presente trabajo se optimizaron las condiciones para la producción de toxina PR en medio líquido mediante técnicas de diseño de experimentos. Para ello se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.15 para Windows.

Utilizando datos bibliográficos y experimentos previos se seleccionaron los efectos importantes y se discriminaron factores no determinantes. Con el programa informático se crearon diseños “factoriales 3<sup>3</sup>” que permitieron evaluar superficies de respuesta. Este programa ofrece la posibilidad de aleatorizar los experimentos presentando una

hoja de trabajo apropiada con las condiciones experimentales. Además permite la estimación del grado de libertad para el error, para lo cual se hicieron cuatro replicas en el punto central del diseño.

Las repuestas obtenidas en cada uno de los experimentos diseñados por el programa estadístico, se introdujeron en la hoja de trabajo correspondiente y se estudiaron los efectos y sus interacciones. Se realizó i) análisis de varianza (ANOVA), para conocer la significatividad estadística de los efectos. Se determinó ii) los coeficiente de regresión de los modelos matemáticos propuestos y iii) la existencia de fallo de ajuste en el modelo. Se realizaron iv) predicciones sobre otros puntos experimentales y v) optimización de la “variable-respuesta”.

El programa Statgraphics brinda la posibilidad de diferentes salidas gráficas que nos ayudaron a interpretar los resultados. Se utilizaron el diagrama de Pareto, el diagrama de efectos principales y sus interacciones, el gráfico de probabilidad normal de los efectos, la superficie de respuesta y el diagrama de diagnóstico.



# Capítulo I

**Estudio de la producción de andrastina A  
en *Penicillium roqueforti*.**



# **Objetivos del Capítulo I**



## Objetivos del Capítulo I

1. Optimizar la producción de andrastina A en medio líquido MAp usando la metodología del diseño de experimentos.
2. Obtener mutantes afectados en la producción de andrastina A usando la exposición de esporas a luz ultravioleta.
3. Evaluar fenotípicamente los mutantes obtenidos.
4. Comparar los proteomas de los mutantes mediante electroforesis diferencial en gel (DIGE).



# **Resultados del Capítulo I**





# Resultados del Capítulo I

## 1. Optimización de la producción de andrastinas en *P. roqueforti* CECT 2905.

Las andrastinas son un grupo de compuestos que han suscitado gran interés debido a su actividad como inhibidores de la enzima farnesiltransferasa. Esta enzima, cataliza la farnesilación de las proteínas oncogénicas Ras; primer paso en las modificaciones postraduccionales que tienen que sufrir estas proteínas para poder anclarse en la membrana celular y de esta forma cumplir su función en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular. De ahí su importancia para la salud humana como posibles anticancerígenos.

Al inicio de la presente memoria se propuso estudiar las condiciones óptimas para la producción de andrastina A en *P. roqueforti* CECT 2905 debido a que, dentro del conjunto de las andrastinas (andrastinas A-D), es la que se produce en mayor cantidad y sus niveles de producción están directamente relacionados con el de los demás compuestos del grupo.

Este metabolito fue aislado por primera vez por Uchida *et al.*, (1996a) haciendo extracciones con solventes orgánicos del caldo metabólico de cultivos en medio líquido. Otros autores han realizado fermentaciones en medios de cultivos sólidos (Fernández-Bodega *et al.*, 2009; Overy *et al.*, 2005) para evaluar la producción de andrastinas en *P. roqueforti*, si bien la producción en medio sólido no es idónea para estudios bioquímicos.

Para este estudio se propuso optimizar las condiciones de producción de andrastinas en medio líquido en matraces con la perspectiva de ser posteriormente escalados en fermentadores y por tanto en un mayor volumen.

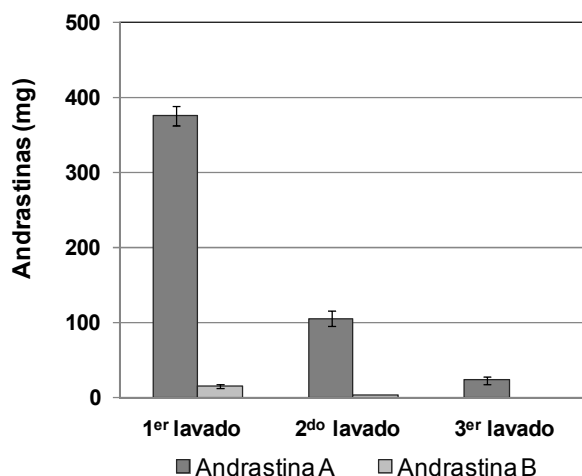
### 1.1 Experimentos previos.

La producción de andrastina A y B se evaluó en diferentes medios líquidos para hongos. Las esporas de *P. roqueforti* CECT 2905 procedentes de un cultivo en placa de medio PW2 (4-5 días de incubación) fueron inoculadas en 100 ml de los diferentes medios de cultivo, en matraces lisos de 500 ml. Se incubaron a 25°C con agitación de 240 rpm. Las muestras se recogieron por triplicado a los 2, 4 y 6 días de incubación y se realizaron extracciones con acetato de etilo a partir del caldo de cultivo.

En este experimento preliminar se obtuvieron resultados inesperados ya que existieron grandes diferencias entre las réplicas de un mismo muestreo. Además, como regla general, las mayores producciones de andrastinas A y B se obtuvieron a tiempos de incubación en los cuales el micelio del hongo aún no estaba bien desarrollado. Esto se contradecía con los resultados obtenidos por otros autores y con el hecho de que las andrastinas son metabolitos secundarios que se producen al final de la fase logarítmica y durante la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo productor.

En vista de estos resultados, observamos que al hacer los lavados del cultivo de *P. roqueforti* en las placas, previamente crecidas en PW2, con agua milli-Q podríamos arrastrar, además de las esporas, gran cantidad de andrastinas que estaban agregadas a las esporas.

Con el fin de confirmar esta hipótesis se realizaron recogidas de esporas a partir de cultivos de *P. roqueforti* CECT 2905 en placas de PW2 lavando dos veces con agua milli-Q y arrastrando las esporas con ayuda de un bastoncillo estéril. Se agitó con ayuda de vortex durante dos minutos; luego, por centrifugación, se separaron las esporas de la fase líquida. Se realizaron tres lavados de las esporas con igual procedimiento y se realizaron cuantificaciones del contenido de andrastinas en cada uno de ellos.



**Figura 23.** Cuantificación de andrastinas A y B presentes en los lavados de las esporas con agua milli-Q.

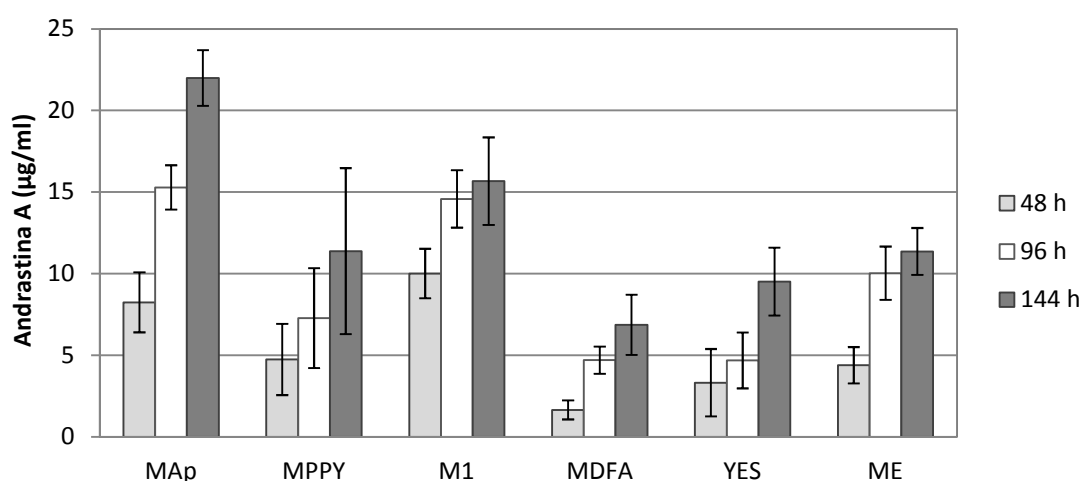
En los resultados (Figura 23) observamos que con el inóculo iban cantidades importantes de andrastinas A y B asociadas a las esporas que se añadían al cultivo. Esto interfería en su posterior cuantificación, sobre todo en los primeros tiempos de muestreo.

Con los lavados sucesivos se redujo la cantidad de andrastinas que acompañan a las esporas en el inóculo. Esta circunstancia parecía ser la causante de los altos niveles de producción durante los primeros días de incubación y la elevada variabilidad entre réplicas.

Los datos anteriores hicieron modificar el método de inoculación, de manera que en los ensayos posteriores se realizaron pre-inóculos con “Medio Iniciador para la producción de Andrastinas” (MAi) inoculado con esporas de *P. roqueforti* e incubado durante 24 horas a 28°C y agitación de 240 rpm. Tanto las esporas con las que se inoculó el medio para el pre-inóculo, como el micelio obtenido del pre-inóculo para hacer los cultivos, se lavaron dos veces con agua milli-Q para evitar de esta forma la incorporación indeseada de andrastinas en el comienzo de la fermentación.

Teniendo en cuenta que la producción de metabolitos secundarios en hongos filamentosos depende en gran medida del sustrato en que crecen, se propuso evaluar la producción de andrastina A por *P. roqueforti* CECT 2905 en diferentes medios de cultivo utilizados frecuentemente para la producción de metabolitos secundarios en hongos filamentosos.

Se inocularon 100 ml de cada uno de los medios de cultivo a ensayar (MAp, MPPY, M1, MDFA, YES y ME) con 2% de pre-inóculo (2 ml). La incubación se realizó a una temperatura de 27°C y con una agitación constante de 250 rpm. Se tomaron muestras a las 48, 96 y 144 horas de incubación. Los resultados obtenidos en cuanto a producción de andrastinas se muestran en la Figura 24.



**Figura 24.** Producción volumétrica de andrastina A por *P. roqueforti* CECT 2905 tras su crecimiento en diferentes medios de cultivos y a distintos tiempos de fermentación.

El análisis de dichos resultados indicaba que el medio MAp (el cual contiene almidón soluble, glicerol, harina de soja, levadura comercial y sales) resulta el más adecuado para optimizar la producción de andrastina A, ya que con él se obtuvo los mayores niveles de producción. Además el crecimiento de *P. roqueforti* CECT 2905 se produjo de forma óptima y homogénea en las diferentes réplicas del experimento. En

cambio, en los otros medios de cultivo analizados se observó gran variabilidad entre réplicas del experimento atendiendo a las características del crecimiento y a la producción del metabolito de interés.

## 1.2 Primer diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

Una vez elegido el medio óptimo para producir andrastinas, se procedió a mejorar las condiciones de producción. Para la optimización de la producción de andrastina A utilizamos un diseño “factorial 3<sup>3</sup>”. Los factores ensayados fueron: pH, temperatura y tiempo de incubación. Para cada uno de los factores establecimos 3 niveles (alto, medio y bajo) (Tabla 10). Mantuvimos fija la composición del medio de cultivo y la velocidad de agitación.

**Tabla 10.** Factores, “variable-respuesta”, factores y niveles evaluados en el primer diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

Factores	Niveles		
	Bajo	Medio	Alto
pH del medio	5,0	6,0	7,0
Temperatura de incubación	20°C	25°C	30°C
Tiempo de incubación	3 días	5,5 días	8 días
Variable-respuesta	Producción volumétrica de andrastina A (µg/ml)		

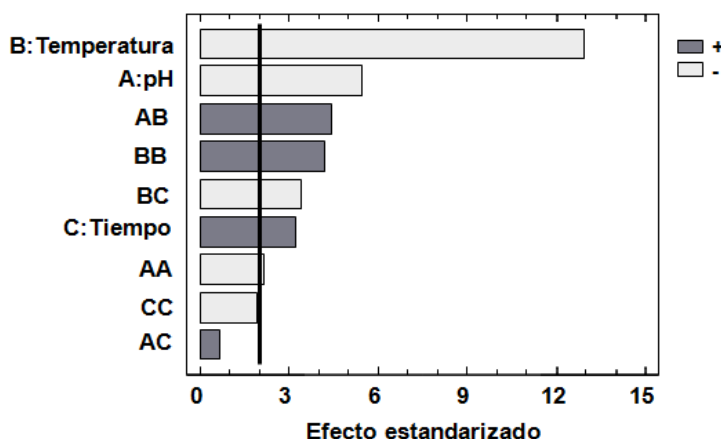
Como “variable-respuesta” se escogió la producción volumétrica de andrastina A, la cual se expresa en µg de andrastina A por mililitro de medio de cultivo (µg/ml). Se utilizó esta “variable-respuesta” en lugar de la producción específica (µg/g de peso seco) debido a que en determinadas condiciones (tiempos prolongados, valores de pH y temperatura bajos) tiende a disminuir el peso seco del micelio como consecuencia de la lisis celular por el agotamiento de nutrientes. Esta disminución del peso seco hace que los valores de producción de andrastina A relativizados aumenten influenciados en mayor medida por la lisis del micelio y la conservación del metabolito en el medio, que por la nueva producción de este metabolito secundario.

Este diseño constituyó un primer acercamiento que nos permitió conocer cómo se comportaba la producción ante las variaciones de los diferentes factores. En la Tabla 11 se detallan los valores de la respuesta obtenidos con el primer diseño experimental en cada una de las condiciones evaluadas.

Tabla 11. Valores de la “variable-respuesta” en el primer diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

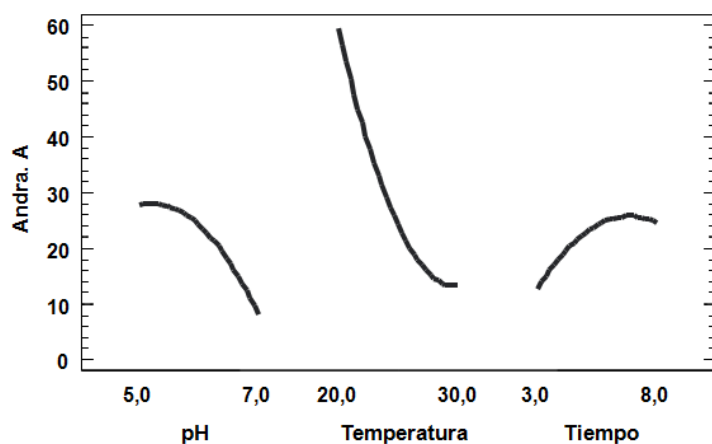
Experimento	Bloque	Temperatura (°C)	pH	Tiempo de Incubación (días)	Andrastina A (µg/ml)
1	1	30,0	5,0	8,0	8,40
2	1	25,0	6,0	5,5	17,80
3	1	30,0	7,0	5,5	2,61
4	1	30,0	7,0	3,0	1,65
5	1	20,0	6,0	3,0	34,52
6	1	30,0	6,0	5,5	3,91
7	1	25,0	6,0	5,5	24,03
8	1	25,0	6,0	5,5	21,63
9	1	25,0	5,0	5,5	18,57
10	1	25,0	7,0	5,5	10,36
11	1	25,0	7,0	3,0	9,06
12	1	20,0	7,0	5,5	25,57
13	1	25,0	5,0	3,0	25,49
14	1	30,0	5,0	5,5	4,630
15	1	20,0	6,0	8,0	77,10
16	1	20,0	5,0	5,5	86,84
17	1	20,0	5,0	3,0	55,41
18	1	30,0	6,0	8,0	6,351
19	1	20,0	7,0	8,0	36,33
20	1	20,0	5,0	8,0	58,33
21	1	25,0	6,0	5,5	22,29
22	1	20,0	7,0	3,0	14,82
23	1	25,0	6,0	3,0	13,88
24	1	25,0	6,0	8,0	30,99
25	1	30,0	6,0	3,0	11,03
26	1	30,0	7,0	8,0	3,68
27	1	25,0	7,0	8,0	9,14
28	1	30,0	5,0	3,0	7,17
29	1	25,0	5,0	8,0	16,56
30	1	20,0	6,0	5,5	94,37
31	2	30,0	5,0	8,0	10,16
32	2	25,0	6,0	5,5	19,88
33	2	30,0	7,0	5,5	3,09
34	2	30,0	7,0	3,0	2,27
35	2	20,0	6,0	3,0	29,30
36	2	30,0	6,0	5,5	5,34
37	2	25,0	6,0	5,5	21,44
38	2	25,0	6,0	5,5	21,92
39	2	25,0	5,5	5,5	22,48
40	2	25,0	7,0	5,5	7,15
41	2	25,0	7,0	3,0	9,68
42	2	20,0	7,0	5,5	23,72
43	2	25,0	5,0	3,0	16,44
44	2	30,0	5,0	5,0	5,58
45	2	20,0	6,0	8,0	80,30
46	2	20,0	5,0	5,5	95,88
47	2	20,0	5,0	3,0	51,10
48	2	30,0	6,0	8,0	4,033
49	2	20,0	7,0	8,0	40,38
50	2	20,0	5,0	8,0	62,55
51	2	25,0	6,0	5,5	20,14
52	2	20,0	7,0	3,0	11,90
53	2	25,0	6,0	3,0	16,29
54	2	25,0	6,0	8,0	25,09
55	2	30,0	6,0	3,0	8,07
56	2	30,0	7,0	8,0	3,31
57	2	25,0	7,0	8,0	11,86
58	2	30,0	5,0	3,0	5,13
59	2	25,0	5,0	8,0	25,64
60	2	20,0	6,0	5,5	70,49

A partir de los resultados obtenidos se estudiaron los efectos de los factores y sus interacciones para la “variable-respuesta” a través del diagrama de Pareto (Figura 25). En esta representación, la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado dividido por su



**Figura 25.** Diagrama de Pareto estandarizado para el primer diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

error estándar). La línea vertical nos permite juzgar qué efectos son estadísticamente significativos fijando un valor de 95% de confianza. Del análisis de este diagrama se deduce que los tres factores estudiados A (pH), B (temperatura) y C (tiempo) tuvieron efecto significativo sobre la “variable-respuesta”, siendo la temperatura el factor que más influencia ejerció sobre la producción de andrastina A. Las interacciones AB y BC también ejercieron efectos significativos sobre la “variable-respuesta”.



**Figura 26.** Diagrama de efectos principales para el primer diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

En el diagrama de efectos principales (Figura 26) se puede apreciar la respuesta frente a la variación de cada factor. En el eje X se representan los valores de los diferentes efectos y en el eje Y la “variable-respuesta”. En el caso de la temperatura vemos que hay una mayor pendiente al pasar de temperatura baja a alta, lo

que indica su mayor influencia sobre la “variable-respuesta”. Los mayores niveles de producción volumétrica de andrastina A ocurren a temperaturas bajas (20°C).

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó por comparación entre la  $F_{calculada}$  y la  $F_{tabulada}$  (probabilidades actuales  $p < 0,05$ ). Se determinaron los factores influyentes y las

interacciones existentes entre ellos, considerando los resultados cuyo valor de  $p$  fue menor de 0,05, es decir, aquellos significativamente diferentes de cero con más de un 95% de confianza. El ANOVA (Tabla 12) confirmó los resultados obtenidos en el diagrama de Pareto (Figura 25). Además se observa que no fue significativo el efecto que pudiera causar los dos bloques en que se realizaron los experimentos. El valor del coeficiente de regresión  $r^2$  (84,22%) nos indica que el modelo explica un porcentaje adecuado de la varianza de los resultados experimentales.

**Tabla 12.** Análisis de varianza en la producción volumétrica de andrastina A ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el primer diseño "factorial  $3^3$ ".

Efectos	SC <sup>(1)</sup>	GL <sup>(2)</sup>	MC <sup>(3)</sup>	F-Ratio	p <sup>(4)</sup>
A:pH	3397,74	1	3397,74	29,54	0,0000
B:Temperatura	19194,5	1	19194,5	166,90	0,0000
C:Tiempo	1204,67	1	1204,67	10,47	0,0022
AA	538,271	1	538,271	4,68	0,0354
AB	2260,68	1	2260,68	19,66	0,0001
AC	49,3474	1	49,3474	0,43	0,5155
BB	2029,61	1	2029,61	17,65	0,0001
BC	1328,05	1	1328,05	11,55	0,0014
CC	414,25	1	414,25	3,60	0,0636
Bloques	31,0292	1	31,0292	0,27	0,6058
Error puro	5635,47	49	115,01		
Total (corr.)	35711,3	59			

<sup>(1)</sup> SC: suma de cuadrados

<sup>(2)</sup> GL: grado de libertad

<sup>(3)</sup> MC: media de cuadrados

<sup>(4)</sup> p: nivel de significación

$$r^2 = 84,22\%$$

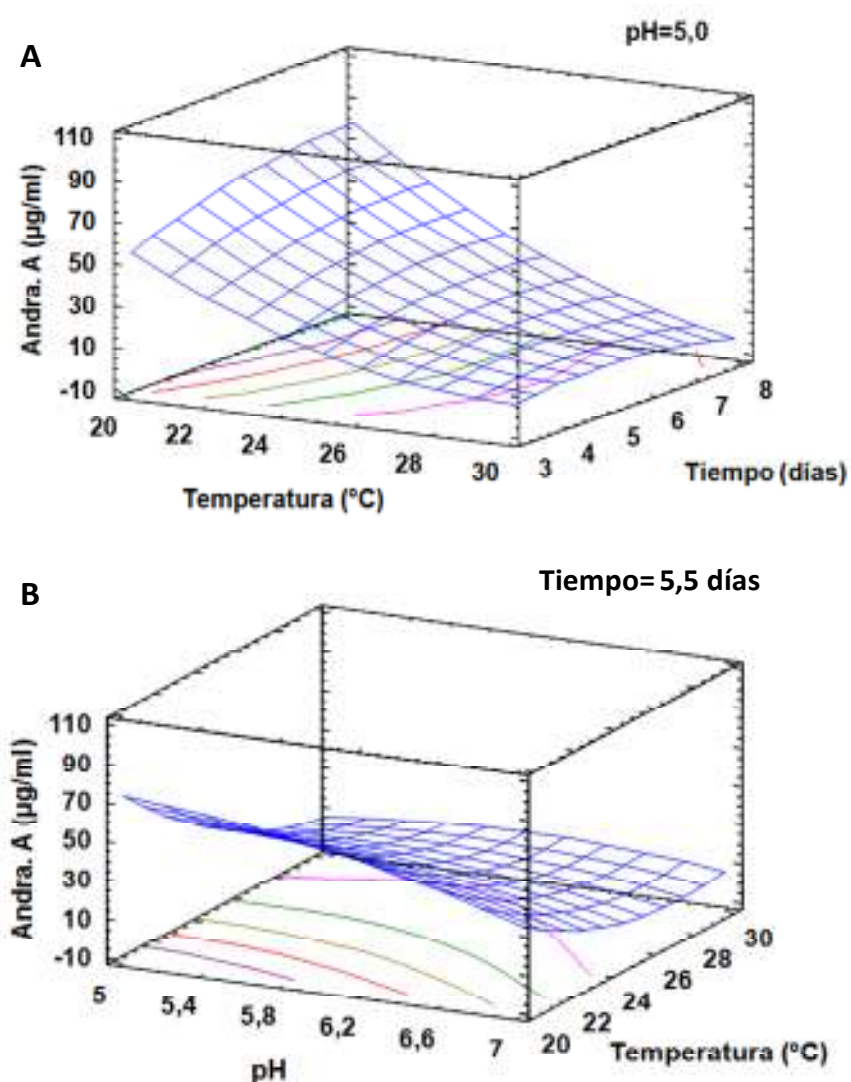
$$r^2 \text{ (ajustada con los grados de libertad)} = 80,9\%$$

El modelo matemático obtenido del diseño responde a la siguiente ecuación de segundo grado.

$$\begin{aligned} \text{Andra. } A = & 465,396 + 13,782 \times pH - 37,322 \times temperatura + 23,4229 \\ & \times tiempo - 6,2649 \times pH^2 + 1,94108 \times pH \times temperaturuta \\ & + 0,57357 \times pH \times tiempo + 0,486608 \times temperatura^2 - 0,595101 \\ & \times temperatura \times tiempo - 0,879355 \times tiempo^2 \end{aligned}$$

**Nota.** Andra. A: producción volumétrica de anradtina A.

En las superficies de respuesta (Figura 27A y B), generadas a partir del modelo indicado anteriormente, se representa la producción volumétrica de andrastina A (“variable-respuesta”) en el eje Z frente a un par de factores ( $X$  e  $Y$ ) manteniendo un tercer factor constante. Los diagramas nos permiten conocer la dirección hacia la cual hay que mover valores de los diferentes factores para obtener los mayores niveles de producción volumétrica de andrastina A. Analizando estas superficies de respuesta se puede inferir que si se disminuye la temperatura de incubación y el pH del medio de cultivo por debajo los valores estudiados la producción de andrastina A debería aumentar. El incremento de los días de incubación también aumentaría la producción de este metabolito, pero en menor proporción.



**Figura 27.** Diagramas de superficie de respuesta estimada para la producción volumétrica de andrastina A en el primer diseño “factorial 3<sup>3</sup>”. **(A)** Temperatura de incubación (20-30°C), tiempo de incubación (3-8 días) y pH 5,0. **(B)** pH (5-7), temperatura de incubación (20-30°C) y tiempo de incubación 5,5 días.



En la Tabla 13 se observa el comportamiento de la producción de andrastina A, según el modelo matemático, al variar cada uno de los tres factores, así como los valores teóricos que tendrían que alcanzar los otros dos factores. En la primera sección de la tabla (Tabla 13A) se predice la respuesta al modificar el pH del medio de cultivo de 6,0 a 1,0. En la segunda sección (Tabla 13B) al modificar la temperatura de 25°C a 15°C y en la tercera (Tabla 13C) al variar el tiempo de incubación de 5,5 días a 10,5 días.

**Tabla 13.** Predicción de la producción volumétrica de andrastina A al variar los diferentes factores: pH (A), temperatura de incubación (B) y tiempo de incubación (C).

A				B				C			
pH	Temp. (°C)	Tiemp. (días)	Prod.And.A (ug/ml)	pH	Temp. (°C)	Tiemp. (días)	Prod And A (ug/ml)	pH	Temp. (°C)	Tiemp. (días)	Prod And A (ug/ml)
6,0	25,0	5,5	24,12	6,0	25,0	5,5	24,12	6,0	25,0	5,5	24,12
5,5	16,92	6,34	109,47	5,92	24,0	5,62	30,43	5,69	20,39	6,0	63,19
5,0	7,09	7,27	320,26	5,85	23,0	5,73	37,91	5,41	15,23	6,5	137,38
4,5	-3,18	8,21	666,37	5,79	22,0	5,84	46,60	5,14	9,91	7,0	247,83
4,0	-13,63	9,17	1149,97	5,73	21,0	5,94	56,50	4,87	4,52	7,5	394,75
3,5	-24,16	10,14	1771,87	5,67	20,0	6,04	67,60	4,61	-0,90	8,0	578,21
3,0	-34,74	11,11	2532,49	5,61	19,0	6,14	79,93	4,35	-6,33	8,5	798,23
2,5	-45,35	12,07	3432,06	5,56	18,0	6,23	93,47	4,09	-11,78	9,0	1054,82
2,0	-55,98	13,05	4470,72	5,50	17,0	6,33	108,23	3,83	-17,24	9,5	1348,0
1,5	-66,63	14,02	5648,6	5,45	16,0	6,43	124,20	3,57	-22,70	10,0	1677,74
1,0	-77,28	14,99	6965,76	5,40	15,0	6,52	141,39	3,31	-28,17	10,5	2044,07

**Prod. And. A:** Predicción de la producción volumétrica de Andrastina A. **Temp:** temperatura de incubación. **Tiemp:** tiempo de incubación.

Estos valores son orientativos ya que al trabajar con organismos vivos hay límites fisiológicos que al sobrepasarse afectarían el desarrollo del microorganismo y por lo tanto a la viabilidad del experimento. Por ejemplo, no es viable plantearse realizar un experimento a temperaturas de incubación negativas, aunque la tendencia indicada matemáticamente por el modelo así lo refleje.

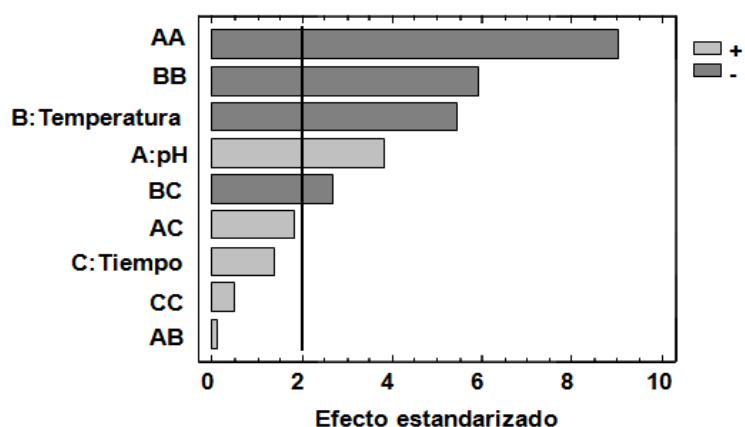
### 1.3 Segundo diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

Con el objetivo de mejorar la producción de andrastina A, se realizó un segundo diseño de experimento en los que se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en el diseño anterior y los límites fisiológicos del microorganismo de ensayo. Los valores de los tres niveles de cada factor se reflejan en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Factores, “variable-respuesta” y niveles evaluados en el segundo diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

Factores	Niveles		
	Mínimo	Intermedio	Máximo
pH del medio	3,5	4,5	5,5
Temperatura de incubación	17°C	20°C	23°C
Tiempo de incubación	6 días	9 días	12 días
Variable-respuesta	Producción volumétrica de Andrastina A (µg/ml)		

Los resultados de la “variable-respuesta” obtenidos en cada uno de los experimentos diseñados por el programa estadístico fueron introducidos en las hojas de trabajo correspondientes (Tabla 15) y se analizaron estadísticamente de igual forma que en el diseño anterior.



**Figura 28.** Diagrama estandarizado de Pareto para el segundo diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

Del estudio del diagrama estandarizado de Pareto (Figura 28) y el análisis de varianza (Tabla 16) se infiere que en este diseño y en la región del espacio muestral estudiada, el tiempo no influyó de forma significativa en la producción volumétrica

de andrastina A. Sin embargo la temperatura de incubación y el pH si tenían efecto significativo sobre la respuesta. Sólo la interacción entre la temperatura y el tiempo de incubación (BC) tuvo una influencia significativa sobre la producción de andrastina A.

La varianza de los datos explicada por el modelo ( $r^2$ ) fue de 79,9%, lo que indica una aproximación adecuada y válida para el diseño experimental.

Tabla 15. Valores de la “variable-respuesta” en el segundo diseño “factorial 3<sup>3</sup>”.

Experimento	Bloque	Temperatura (°C)	pH	Tiempo de Incubación (días)	Andrastina A (µg/ml)
1	1	23,0	3,5	12,0	20,80
2	1	20,0	4,5	9,0	10,65
3	1	23,0	5,5	9,0	42,72
4	1	23,0	5,5	6,0	39,51
5	1	17,0	4,5	6,0	74,87
6	1	23,0	4,5	9,0	51,53
7	1	20,0	4,5	9,0	101,80
8	1	20,0	4,5	9,0	111,90
9	1	20,0	3,5	9,0	38,17
10	1	20,0	5,5	9,0	78,62
11	1	20,0	5,5	6,0	77,71
12	1	17,0	5,5	9,0	52,26
13	1	20,0	3,5	6,0	70,92
14	1	23,0	3,5	9,0	27,29
15	1	17,0	4,5	12,0	154,52
16	1	17,0	3,5	9,0	39,02
17	1	17,0	3,5	6,0	37,62
18	1	23,0	4,5	12,0	42,58
19	1	17,0	5,5	12,0	80,90
20	1	17,0	3,5	12,0	40,12
21	1	20,0	4,5	9,0	107,55
22	1	17,0	5,5	6,0	39,22
23	1	20,0	4,5	6,0	134,58
24	1	20,0	4,5	12,0	116,72
25	1	23,0	4,5	6,0	36,41
26	1	23,0	5,5	12,0	38,45
27	1	20,0	5,5	12,0	85,35
28	1	23,0	3,5	6,0	26,32
29	1	20,0	3,5	12,0	29,26
30	1	17,0	4,5	9,0	117,78
31	2	23,0	3,5	12,0	17,18
32	2	20,0	4,5	9,0	109,87
33	2	23,0	5,5	9,0	42,17
34	2	23,0	5,5	6,0	38,55
35	2	17,0	4,5	6,0	58,05
36	2	23,0	4,5	9,0	44,34
37	2	20,0	4,5	9,0	99,53
38	2	20,0	4,5	9,0	110,96
39	2	20,0	3,5	9,0	46,30
40	2	20,0	5,5	9,0	79,84
41	2	20,0	5,5	6,0	84,07
42	2	17,0	5,5	9,0	66,18
43	2	20,0	3,5	6,0	55,91
44	2	23,0	3,5	9,0	22,53
45	2	17,0	4,5	12,0	152,53
46	2	17,0	3,5	9,0	42,25
47	2	17,0	3,5	6,0	36,63
48	2	23,0	4,5	12,0	46,41
49	2	17,0	5,5	12,0	65,17
50	2	17,0	3,5	12,0	34,77
51	2	20,0	4,5	9,0	101,24
52	2	17,0	5,5	6,0	35,84
53	2	20,0	4,5	6,0	148,83
54	2	20,0	4,5	12,0	119,64
55	2	23,0	4,5	6,0	40,21
56	2	23,0	5,5	12,0	44,14
57	2	20,0	5,5	12,0	89,85
58	2	23,0	3,5	6,0	25,35
59	2	20,0	3,5	12,0	33,53
60	2	17,0	4,5	9,0	132,27

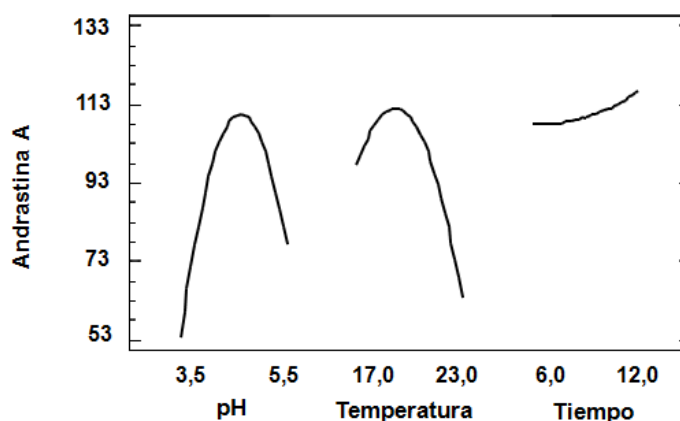
**Tabla 16.** Análisis de varianza en la producción volumétrica de andrastina A ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el segundo diseño “factorial  $3^3$ ”.

Efecto	SC	GL	MC	F-Ratio	p
A:pH	4965,24	1	4965,24	14,68	0,0004
B:Temperatura	10027,0	1	10027,0	29,65	0,0000
C:Tiempo	636,123	1	636,123	1,88	0,1762
AA	27553,1	1	27553,1	81,47	0,0000
AB	3,84945	1	3,84945	0,01	0,9155
AC	1148,19	1	1148,19	3,40	0,0712
BB	11916,5	1	11916,5	35,24	0,0000
BC	2452,0	1	2452,0	7,25	0,0096
CC	89,2071	1	89,2071	0,26	0,6097
Bloques	0,518823	1	0,518823	0,00	0,9689
Total error	17247,1	51	338,178		
Total (corr.)	85854,4	61			

$$r^2 = 79,91\%$$

$$r^2 \text{ (ajustada con los grados de libertad)} = 75,97\%$$

En el diagrama de efectos principales (Figura 29) se observa una inflexión en las curvas que representan el pH y la temperatura, indicando el valor donde se logra la máxima respuesta. En el caso del tiempo tiende a aumentar la producción de andrastina A con periodos de incubación más prolongados, pero la poca



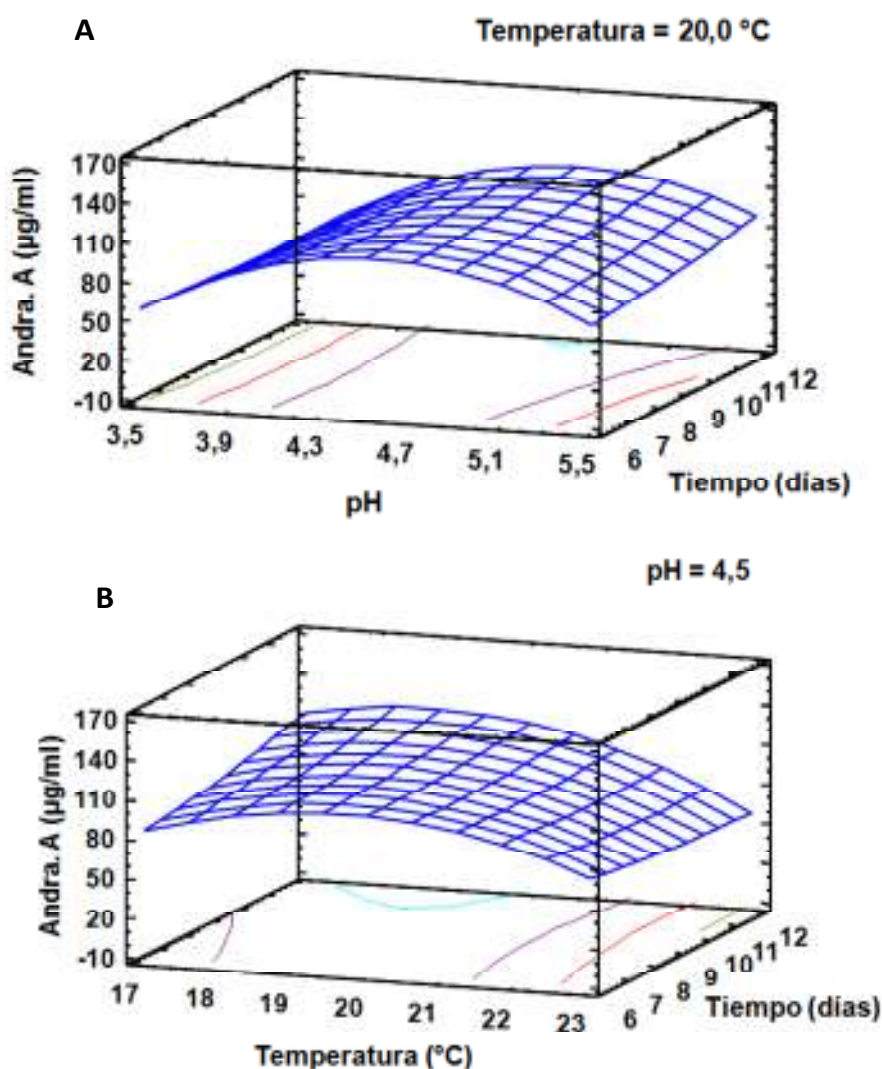
**Figura 29.** Diagrama de efectos principales para el segundo diseño “factorial  $3^3$ ”.

pendiente de la curva indica que el efecto que ejerce este factor sobre la “variable-respuesta” es muy moderado en el rango estudiado. Estos resultados coinciden con lo indicado previamente en el diagrama de Pareto (Figura 28).

Al igual que en el diseño anterior y dado que se trata de un diseño “factorial  $3^3$ ”, el modelo matemático del diseño responde a una ecuación de segundo grado.

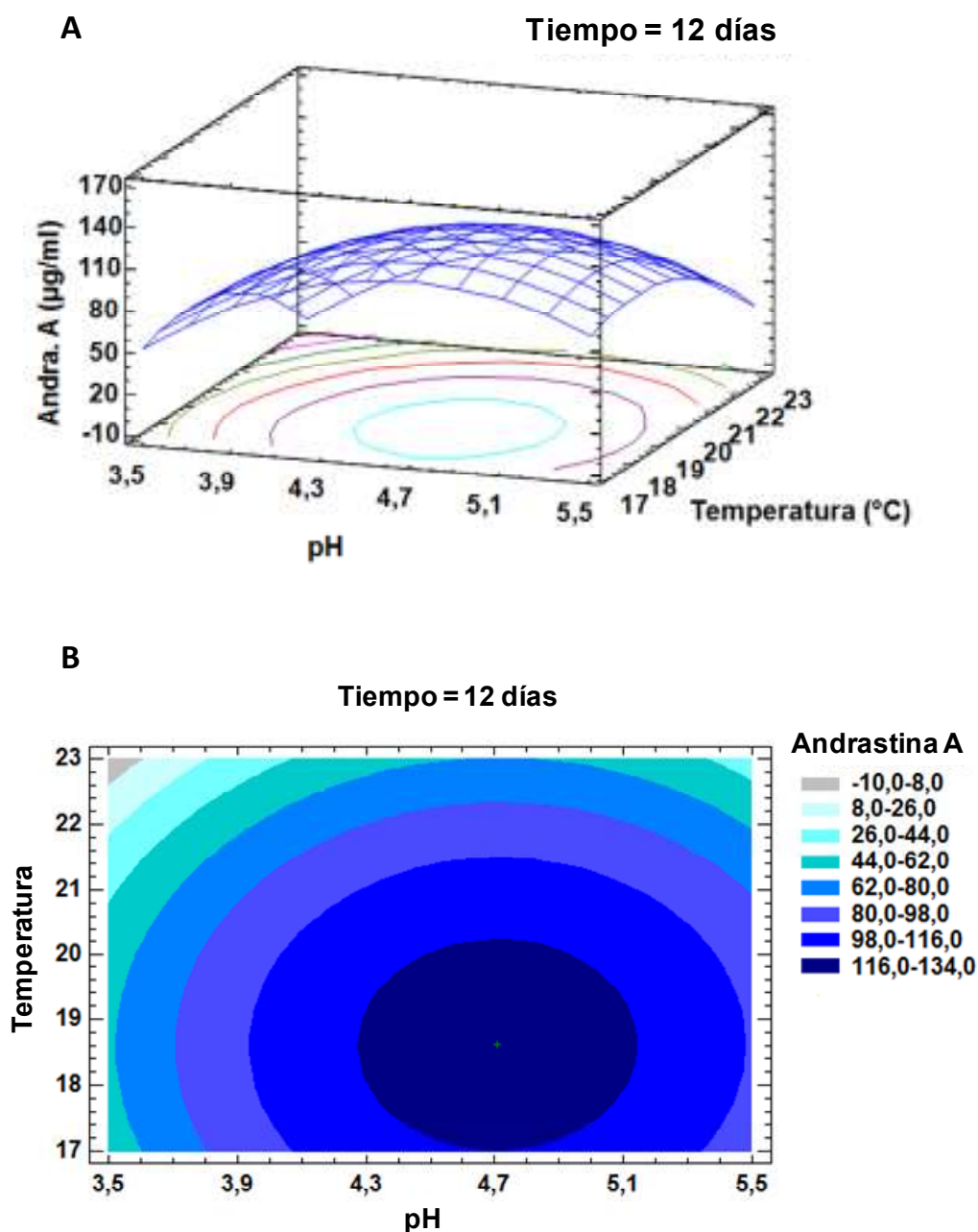
$$\begin{aligned}
 PR \text{ Andra. A} = & -2110,41 + 386,986 \times pH + 133,414 \times temperatura + 8,44687 \\
 & \times tiempo - 44,2957 \times pH^2 + 0,133497 \times pH \times temperatura + 2,30558 \\
 & \times pH \times tiempo - 3,23675 \times temperatura^2 - 1,12308 \times temperatura \\
 & \times tiempo + 0,280049 \times tiempo^2
 \end{aligned}$$

Analizando los gráficos de superficie respuesta (Figura 30A y B) y los valores de la variable respuesta de los diferentes experimento en segundo diseño "factoria 3<sup>3</sup>" (Tabla 15) se observa que la respuesta es máxima (150 µg/ml) a los 12 días de incubación, pero el tiempo de incubación no ejerce una gran influencia sobre la producción. Optimizando el pH y la temperatura se puede alcanzar una producción volumétrica de andrastina A por encima de 120 µg/ml en sólo los 6 ó 9 días.



**Figura 30.** Diagrama de superficie de respuesta estimada para la producción volumétrica de andrastina A. **(A)** pH (3,5-5,5), tiempo de incubación (6-12 días) y temperatura de incubación (20°C). **(B)** Temperatura de incubación (17-23°C), tiempo de incubación (6-12 días) y pH 4,5.

El modelo matemático predice que la producción volumétrica de andrastina A alcanzaría los mayores niveles (116-134  $\mu\text{g/ml}$ ) a los 12 días de incubación en rangos de pH de 4,3 a 5,1 y de temperatura entre los 17 y 20°C (Figura 31A y B). Aunque se alcanzaron valores experimentales superiores a 150  $\mu\text{g/ml}$ .

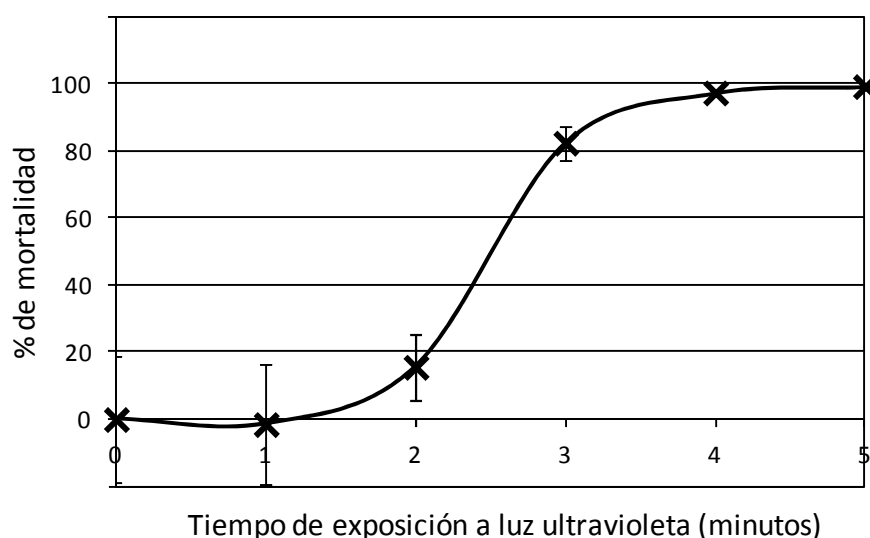


**Figura 31.** Estimación de la producción volumétrica de andrastina A en *P. roqueforti* CECT 2905 a los 12 días de incubación, pH (3,5-5,5) y temperatura de incubación (17-23°C). **(A)** Diagrama de superficie de respuesta. **(B)** Diagrama de contorno de superficie de respuesta esperada.

## 2. Obtención de mutantes de *P. roqueforti* CECT 2905 con la producción de andrastina A afectada.

Con el fin de obtener mutantes al azar de *P. roqueforti* CECT 2905 afectados en la producción de andrastina A se empleó la técnica de mutagénesis por exposición de esporas a luz ultravioleta (Apartado 12 de Materiales y Métodos).

El primer paso consistió en realizar la curva de mortalidad/supervivencia sometiendo una suspensión de esporas de *P. roqueforti* CECT 2905 ( $4,0 \times 10^8$  esporas/ml) a diferentes tiempos de exposición con luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm y 8 W de potencia. Se tomaron muestras a 0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos con los cuales se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio PW2. Finalmente, tras incubar las placas a 28°C durante 5 días, se realizó un recuento de las colonias y se determinó el % de mortalidad de las esporas a los distintos tiempos de exposición a luz ultravioleta, resultados que se muestran en la Figura 32. Como se observa *P. roqueforti* es claramente sensible a la luz ultravioleta.



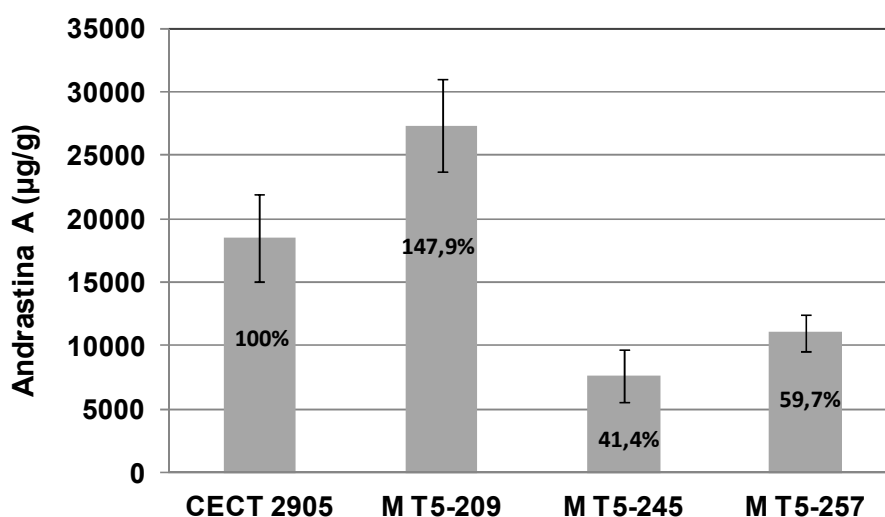
**Figura 32.** Curva de mortalidad de *P. roqueforti* CECT 2905 a diferentes tiempos de exposición con luz ultravioleta.

Para la obtención de los mutantes se repitió el ensayo utilizando el rango de tiempos en el que se obtuvo una mortalidad mayor de un 95% (4 y 5 minutos de exposición). Se obtuvieron 300 mutantes en cada uno de los tiempos ensayados. Se realizaron micro-extracciones de cultivos de los mutantes y la cepa parental (*P. roqueforti* CECT 2905) en medio *Czapek Yeast Extract Agar* (CYA), para evaluar la producción de andrastinas.

Del total de mutantes evaluados se seleccionaron 3 con variaciones significativas en la producción de andrastina A, con respecto a la cepa parental (2 con disminución en la producción y 1 con aumento). Los mutantes con baja producción son útiles para caracterizar intermediarios en la vía biosintética.

Los mutantes seleccionados se sembraron en placas petri (80 mm de diámetro) con CYA usando la técnica del papel de celofán, la cual es descrita en el Apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Esta técnica permitió obtener la producción específica, ya que se puede separar el medio de cultivo empleado para realizar extracciones con solvente orgánico y del micelio con el que se determinó el peso seco. A cada cepa se le realizaron seis replicas (tres experimentos con dos replicas cada uno). La producción de andrastina A fue evaluada mediante el método cromatográfico descrito previamente (Apartado 6.5 de Materiales y Métodos).

En la Figura 33 se muestra la producción de los diferentes mutantes en medio CYA tras su incubación durante 7 días a 28°C. En el caso del mutante MT5-209 la media de producción de andrastina A es de 27361,8 µg/g de micelio, lo cual representa un 47,9% más de la media producida por la cepa parental (18469,33 µg/g). Las cepas MT5-245 y MT5-257 presentan una clara disminución de la producción de andrastina A con reducciones de 58,6% y 40,3% respectivamente con respecto a la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905.



**Figura 33.** Producción específica de andrastina A por *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta crecidos en medio CYA durante 7 días de incubación

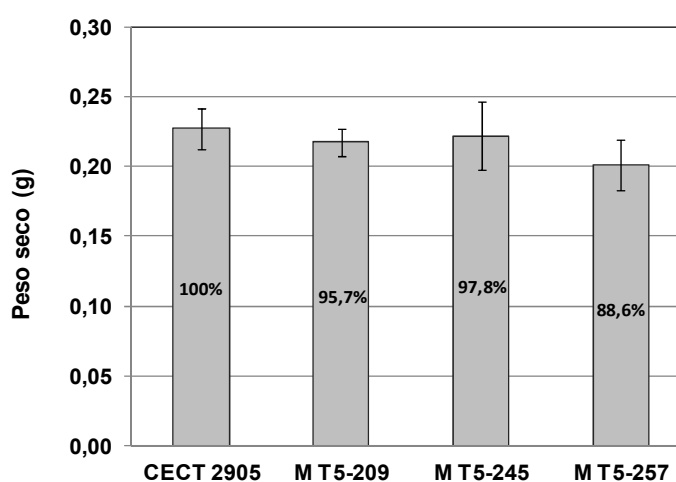


### 3. Evaluación fenotípica de los mutantes.

#### 3.1 Evaluación fenotípica de los mutantes en medio sólido.

Se realizaron estudios fenotípicos comparativos de la cepa *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes, obtenidos a partir de esta, que tuvieron afectada la producción de andrastina A. Estos estudios nos permitieron conocer hasta qué punto la disminución de la producción de andrastina A puede estar vinculada a mutaciones que afectan tanto al crecimiento como al desarrollo del microorganismo.

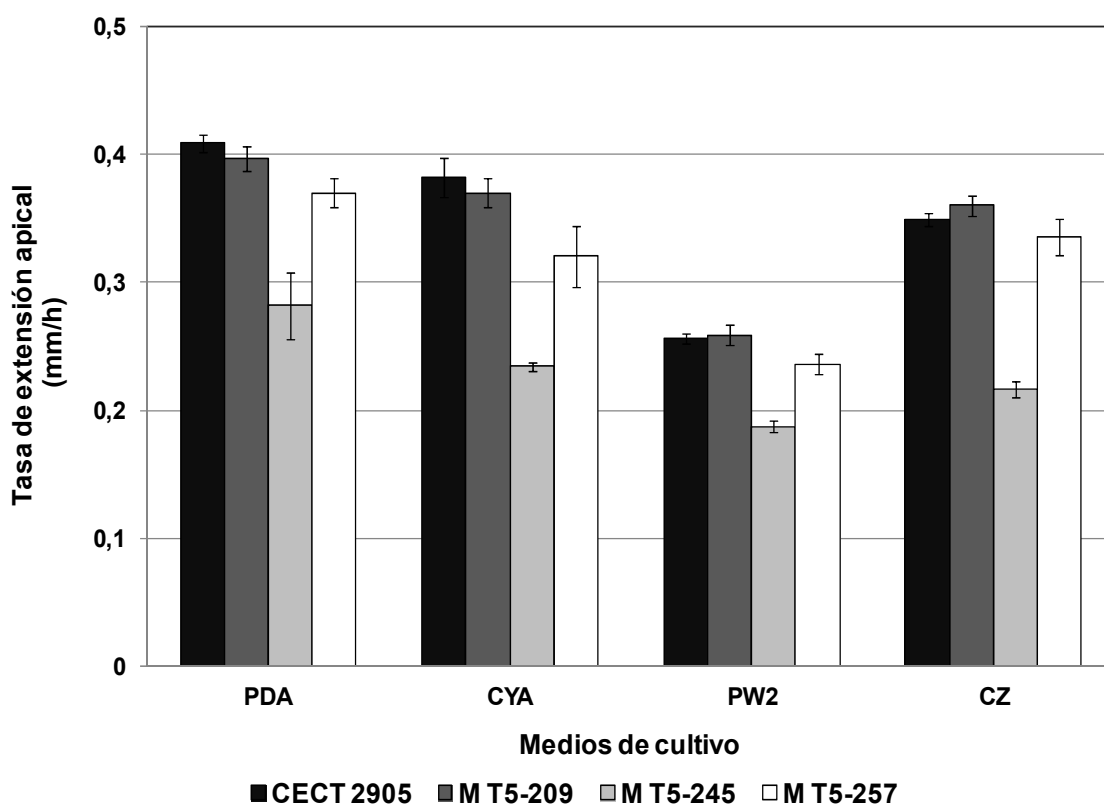
Cuando se analiza el peso seco del micelio tras el cultivo en medio CYA (en condiciones de producción de andrastina A) de la cepa control y los mutantes, se observa que el crecimiento es menor en los tres mutantes evaluados (Figura 34). En los mutantes MT5-209 y MT5-245 la disminución no sobrepasó el 5% con respecto del peso seco



**Figura 34.** Peso seco del micelio producido por cada uno de los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental (*P. roqueforti* CECT 2905).

del micelio en la cepa parental. Sin embargo en el mutante MT5-257 la disminución fue más marcada alcanzando un 11,4% de reducción.

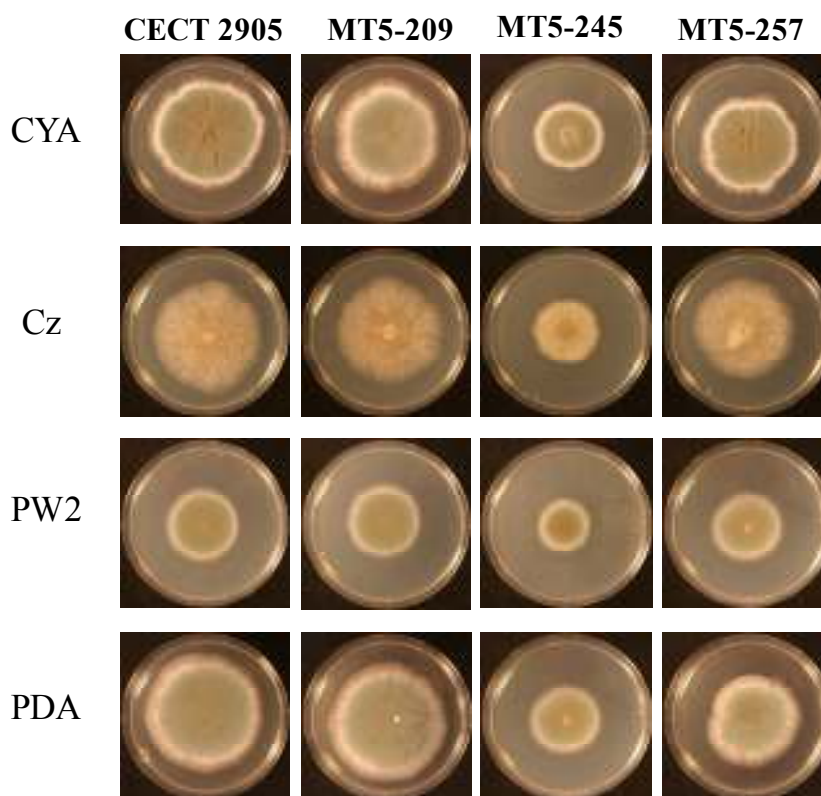
La tasa de crecimiento apical de los mutantes y la cepa parental, en diferentes medios de cultivo sólidos (Figura 35) se evaluó a los 7 días de incubación (Apartado 14.1 de Materiales y Métodos). Los medios de cultivo utilizados fueron: *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Czapek Yeast Extract* (CYA), *Power 2* (PW2) y *Czapek* (Cz). La tasa de crecimiento apical fue expresada en mm por hora.



**Figura 35.** Tasa de crecimiento apical de los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental (*P. roqueforti* CECT 2905) en diferentes medios de cultivo sólido.

El mutante super-productor de andrastina A (MT5-209) no presentó variación marcada de la tasa de crecimiento apical al compararse con la cepa parental en los diferentes medios de cultivo empleados. En el caso de los mutantes MT5-245 y MT5-257, que habían presentado una disminución en la producción de andrastina A, la disminución en la tasa de crecimiento con respecto a la cepa parental fue mayor. Dichas medias en la reducción de la tasa de crecimiento apical en los diferentes medios de cultivo fueron del 33% para MT5-245 y un 9% para MT5-257 (Figura 35).

Las imágenes de las colonias de *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes crecidos en los diferentes medios de cultivo sólido se muestran en la Figura 36. Las diferencias entre cada cepa radicarón fundamentalmente en el diámetro de la colonia y no tanto en la coloración o la esporulación.



**Figura 36.** Fenotipo de las colonias de los mutantes obtenidos con luz ultravioleta y la cepa parental (*P. roqueforti* CECT 2905) en los diferentes medios de cultivo sólido analizados.

### 3.2 Evaluación fenotípica de los mutantes en medio líquido.

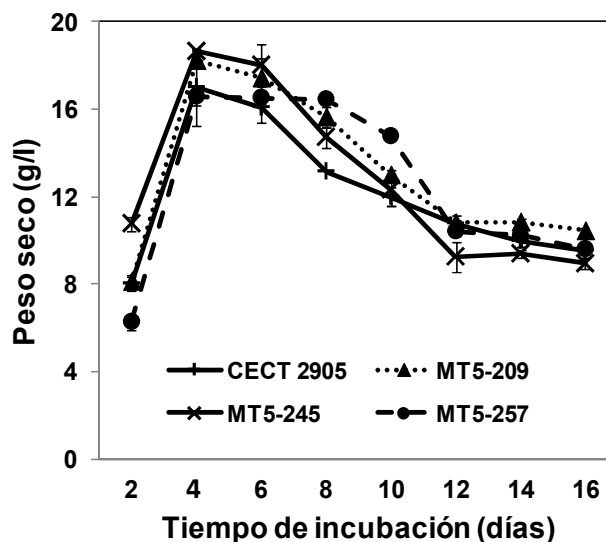
Además de las fermentaciones en medio sólido para evaluar la producción de andrastina A de la cepa parental y los mutantes, se hicieron fermentaciones en medio MAp líquido.

Para este proceso experimental se realizó la curva de crecimiento de *P. roqueforti* CECT 2905 y de los mutantes con la producción de andrastina A afectada, obtenidos por incidencia de luz ultravioleta. Para este ensayo se utilizaron las condiciones óptimas de producción de andrastina A previamente obtenidas en el diseño experimental. Además, junto a la curva de crecimiento, se evaluó la producción específica y volumétrica de andrastina A y la producción de esporas de la cepa parental y sus mutantes.

Los 100 ml de MAp en matraces lisos de 500 ml se inocularon con 2 ml de pre-inóculo de cada cepa a ensayar. El pH fue ajustado a 4,5 y se incubó con agitación de 240 rpm a una temperatura de 19°C. Los muestreos para peso seco, producción de

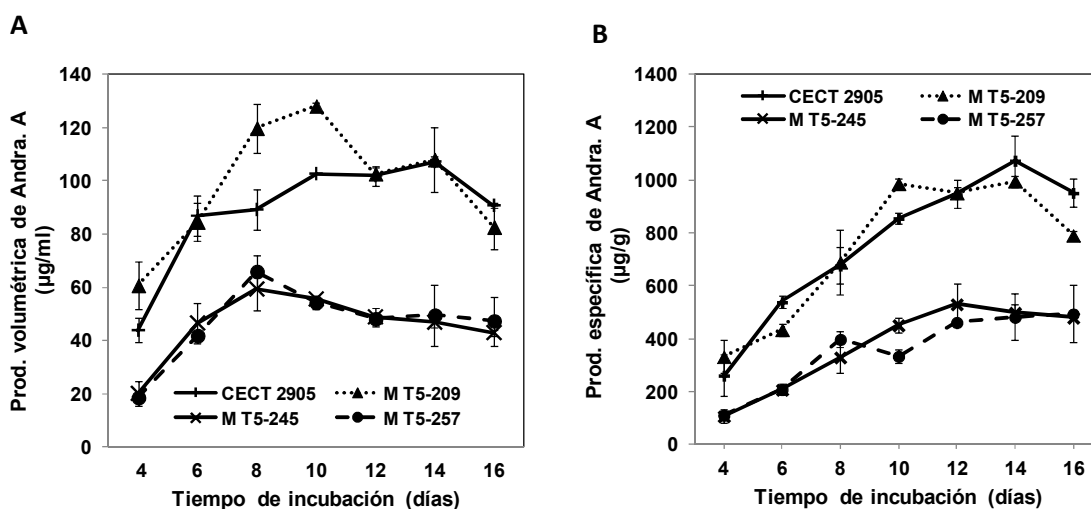
andrastina A y esporas se realizaron a intervalos constantes desde el día 2 de incubación hasta el día 16.

Al analizar las muestras no se encontraron grandes diferencias en la producción de micelio en medio MAp entre la cepa parental (*P. roqueforti* CECT 2905) y los mutantes evaluados (Figura 37). De forma general, se observa un rápido crecimiento hasta el día 4 y luego un descenso paulatino de la masa micelial hasta el día 12. Desde el día 12 hasta el 16 los valores de peso seco se mantienen prácticamente estables en las cuatro cepas ensayadas.



**Figura 37.** Curva de crecimiento en medio líquido de *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta.

Cuando se analiza tanto la producción volumétrica como la específica de andrastina A, se observa que en la cepa parental la producción aumenta hasta el día 14 de incubación, para disminuir en el día 16. La cepa MT5-209 presenta valores de producción superior a la cepa control salvo en los días 8 y 10 de incubación, (Figura 38).

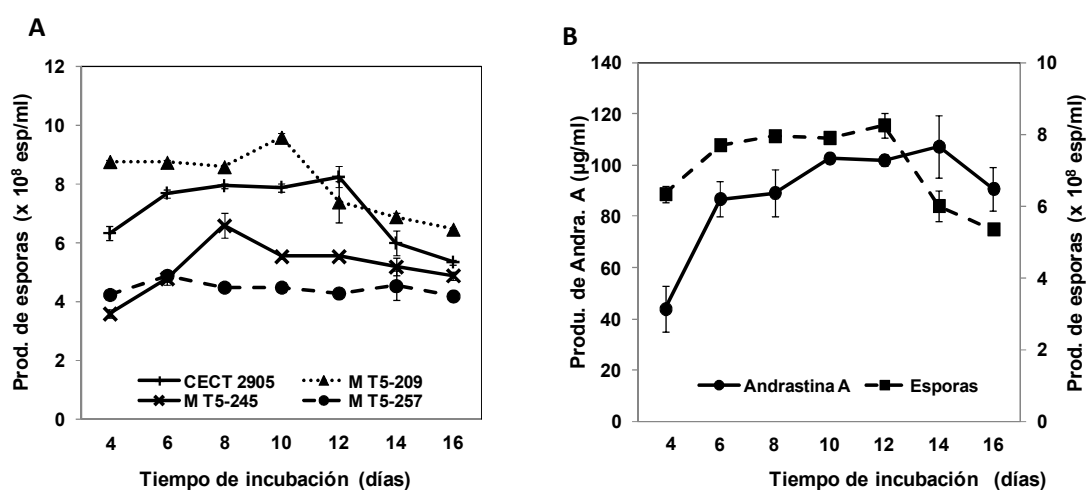


**Figura 38.** Producción de andrastina A en *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta. (A) Producción volumétrica. (B) Producción específica.

Los mutantes MT5-245 y MT5-257 tienen un comportamiento semejante tanto en la producción volumétrica de andrastina A como en la producción específica. Dichos niveles de producción son claramente inferiores a los de la cepa parental y alcanzan el máximo de producción el día 8 de incubación en el caso de la producción volumétrica (Figura 38A) y el día 12 en el caso de la producción específica (Figura 38B).

Adicionalmente, se evaluó la producción de esporas en el medio líquido de cada cepa en los mismos tiempos de incubación en los cuales se evaluó la producción de andrastina A (Figura 39A). Se observó cómo los valores de producción de andrastina A fueron menores en las cepas que presentaron un menor nivel de esporulación (MT5-245 y MT5-257). Sin embargo, en la cepa parental y el mutante MT5-209, en los cuales los niveles de producción de andrastina A fueron altos, la esporulación fue mayor (Figura 39A).

La correlación que existe en *P. roqueforti* CECT 2905 entre la producción volumétrica de andrastina A y la producción de esporas se muestra en la Figura 39B.



**Figura 39.** Esporulación de *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes obtenidos con luz ultravioleta en medio MAp líquido **(A)**. Correlación de la producción de andrastina A y la esporulación en *P. roqueforti* CECT 2905 **(B)**.

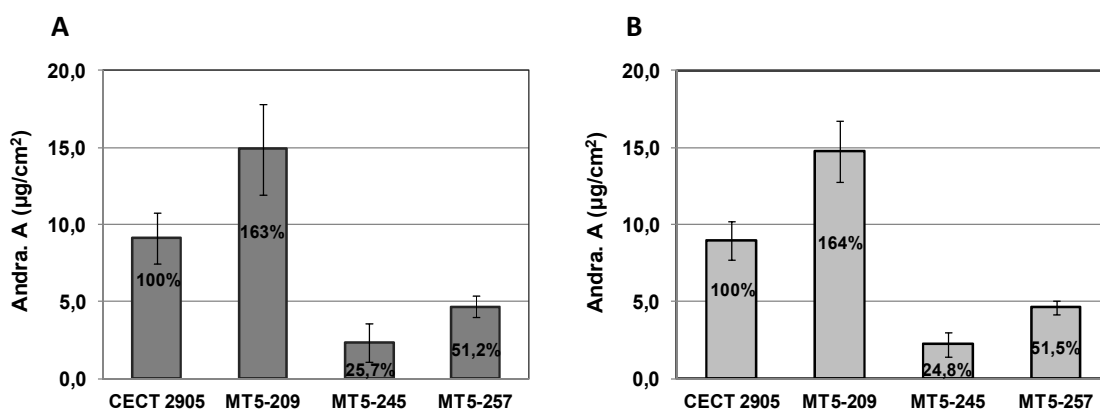
#### 4. Estudio proteómico comparativo entre los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905.

Uchida *et al.*, (1996a) propusieron una ruta biosintética para las andrastinas basándose en estudios de incorporación a andrastina A de acetato con <sup>13</sup>C marcado y estudios similares realizados por Kosemura *et al.*, (1992, 1994) con el citreohidrol. Sin embargo en la bibliografía consultada no se han encontrado las enzimas que

intervienen en la síntesis de estos compuestos ni los genes que las codifican. En vista de ello se planteó un estudio comparativo entre los proteomas de los mutantes afectados en la producción de andrastinas y la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905.

El proteoma de las cepas de estudio se obtuvo del micelio procedente de cultivos en medio sólido, empleándose la técnica del papel celofán (Apartado 16.1 de Materiales y Métodos). Los cultivos se realizaron a 28°C en placas de 140 mm de diámetro con medio CYA inoculados con 10<sup>6</sup> esporas sobre la superficie del celofán. Las placas se incubaron durante 36 horas ya que fue el tiempo de incubación en el que existieron diferencias en la producción de andrastina A entre las cepas, pero a la vez, con una esporulación mínima. Este último factor es importante ya que la presencia de esporas interfiere en el proceso de extracción de las proteínas.

Se realizaron 6 réplicas distribuidas en 2 experimentos con tres réplicas biológicas cada uno. Para el estudio de proteómica fue descartado el micelio de la réplica de valor más elevado y el de menor de producción de andrastina A disminuyendo de esta forma la desviación estándar de las 4 réplicas seleccionadas (Figura 40).



**Figura 40.** Producción de andrastina A por superficie de medio de cultivo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes obtenidos por irradiación de luz ultravioleta. (A) 6 réplicas. (B) 4 réplicas (excluyendo las réplicas con mayor y menos producción).

Para comprobar la calidad de los extractos de proteínas totales de las 16 réplicas se utilizó la técnica electroforesis bidimensional (2D) convencional con tiras de 18 cm de IPG (*Immobilized pH Gradient*) con un gradiente de pH de 3-10 NL. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se evaluó si había degradación en alguna de las muestras.

Una vez comprobada la calidad de las muestras se llevó a cabo una comparación de los niveles de proteínas de las preparaciones de las cuatro replicas biológicas de cada una de las cepas a evaluar: cepa parental (CECT 2905) y los tres mutantes (MT5-209, MT5-245 y MT5-257). Para ello se empleó la tecnología 2D-DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*), la cual permite disminuir la variación experimental de la electroforesis bidimensional convencional. Esta técnica se basa en el marcaje diferencial de los extractos proteicos previamente a su separación por electroforesis bidimensional. En el 2D-DIGE en cada gel se analizan dos muestras a comparar, más un estándar interno el cual consiste en una mezcla equimolar de todas las muestras a analizar que permite normalización de las señales de fluorescencia que generan las dos muestras que se están comparando (Alban *et al.*, 2003).

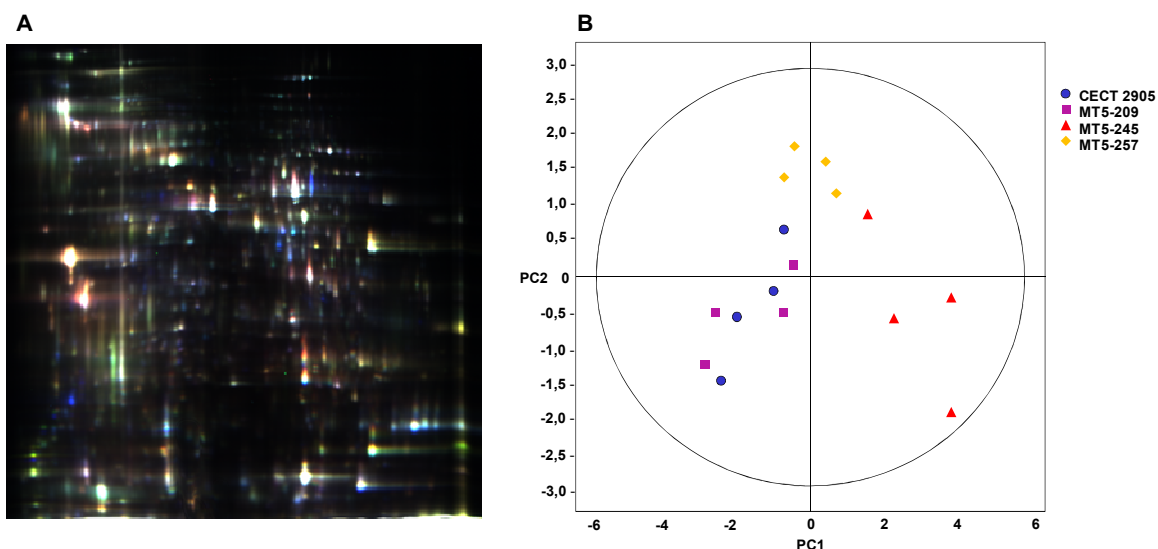
De cada condición se analizaron cuatro réplicas biológicas, dos marcadas con el fluorocromo Cy3 (rojo) y dos con el Cy5 (azul) (Tabla 17). El patrón interno fue marcado con el fluorocromo Cy2 (amarillo). Los tres extractos se mezclaron y se sometieron a una separación por electroforesis bidimensional usando un gradiente de pH de 3-10 NL. Los geles se escanearon usando el equipo *Ettan Dige Imager* (EDI) (GE Healthcare), así se obtuvieron las imágenes de los tres fluorocromos por separado. El programa DeCyder™ 2D 7.0 (GE Healthcare) detectó aproximadamente 4500 manchas en cada uno de los 8 geles. Estas manchas corresponden a proteínas cuyo punto isoeléctrico está en rango de pH entre 3 y 10 y cuyo peso molecular está comprendido entre 13,5 y 270 kDa.

El módulo de análisis de componentes principales (PCA) del DeCyder™ (Figura 41B) mostró que los proteomas de las 4 muestras de los mutantes MT5-245 y MT5-257 estaban bien diferenciadas entre ellas y de las 4 muestras obtenidas de la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905. Sin embargo la cepa MT5-209 no logra diferenciarse de la cepa parental. De los 4500 puntos, 2913 tenían un volumen superior a 30000 y con ellas se hizo el análisis estadístico para la comparación de medias mediante la t de Student de cada uno de los mutantes con la cepa parental. Se encontraron cambios significativos ( $p < 0,05$ ) y una relación mayor que 1,5 o menor que -1,5 en 61 manchas. Uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie para extraer las manchas y proceder a su identificación por espectrometría de masas Maldi-ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*). Se identificaron un total de 33 proteínas cuyos niveles de expresión eran diferentes entre la cepa parental y al menos uno de los mutantes (Figura 42-Figura 45, Tabla 19). No fue posible identificar

25 proteínas, lo cual se debe a que el genoma de *P. roqueforti* no está secuenciado y pudieran tratarse de proteínas específicas de esta especie, o bien proteínas con péptidos modificados. La mayor parte de las proteínas identificadas presentaron alta homología con proteínas pertenecientes a la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, cuyo genoma fue secuenciado por Van den Berg *et al.*, (2008).

**Tabla 17.** Electroforesis diferencial en gel (DIGE). Fluorocromos con los que se marcaron cada muestra y el gel en el que fueron analizadas.

Geles	CY3	CY5
1	CECT 2905 (I)	MT5-209 (I)
2	MT5-245 (I)	CECT 2905 (II)
3	CECT 2905 (III)	MT5-257 (I)
4	MT5-209 (II)	MT5-245 (III)
5	MT5-245 (II)	MT5-257 (II)
6	MT5-257 (III)	MT5-209 (III)
7	MT5-209 (IV)	CECT 2905 (IV)
8	MT5-257 (IV)	MT5-245 (IV)



**Figura 41.** Imagen correspondiente a la superposición de las señales de fluorescencia que generan los fluorocromos empleados en el 2D-DIGE (A). Esquema del análisis de componentes principales (B).



De los 61 puntos de proteínas que mostraron diferencias significativas entre los mutantes y la cepa parental, ninguno de ellos perteneció a la cepa MT5-209. Este resultado concuerda con el PCA en el cual al estudiar todo el proteoma no se logran separar las replicas de estas dos cepas (Figura 41B) con las dos componentes principales. Las replicas biológicas de las cepas MT5-245 y MT-257 fueron separada de las de *P. roqueforti* CECT 2905 por la componente horizontal y vertical respectivamente (Figura 41B).

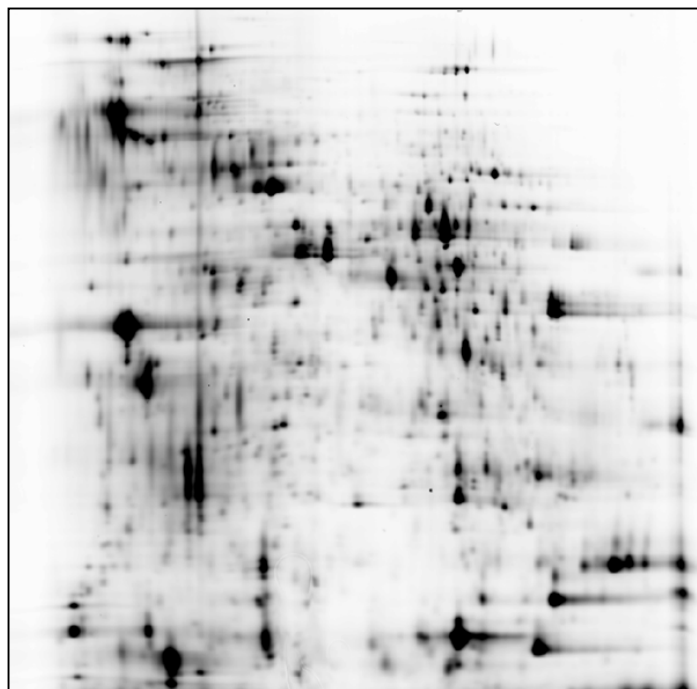
En el proteoma de la cepa MT5-245 se identificaron 31 proteínas con diferencias de expresión con respecto a la parental. De ellas 18 proteínas estuvieron sobreexpresadas y 13 reprimidas (Figura 44). La diferencia de expresión entre la cepa MT5-257 y *P. roqueforti* CECT 2905 consistieron en 5 proteínas sobreexpresadas y una reprimida (Figura 45).

Se utilizó el programa DeCyder™ para agrupar las proteínas identificadas atendiendo a su nivel de expresión en los diferentes mutantes y la cepa parental. Se conformaron 11 perfiles de expresión (Figura 46 y Tabla 18).

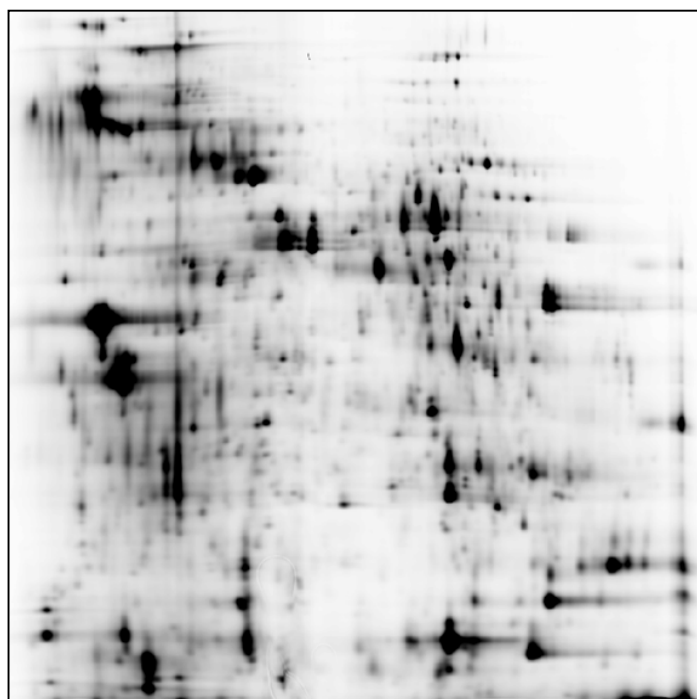
**Tabla 18.** Proteínas identificadas pertenecientes a cada perfil de expresión.

Perfil	Proteínas	Perfil	Proteínas
1.		7.	Pc18g05190, Pc21g15880
2.	Pc22g17870, Pc12g05640, Pc13g09680, Pc22g20490, Pc20g15580, Pc12g10800, Pc21g16970, Pc21g02360, Pc22g01260, Pc16g13060, TSTA_018690	8.	
3.	Pc16g11070, Pc13g03420, Pc20g04810, Pc20g07400,	9.	
4.	PgkA,	10.	Pc22g19060
5.	Pc21g16620, Pc16g05650, Pc13g12400, Pc22g06700, Pc21g15880, Pc21g15880, NCU02289, Pc21g15880	11.	Pc21g15880
6.			

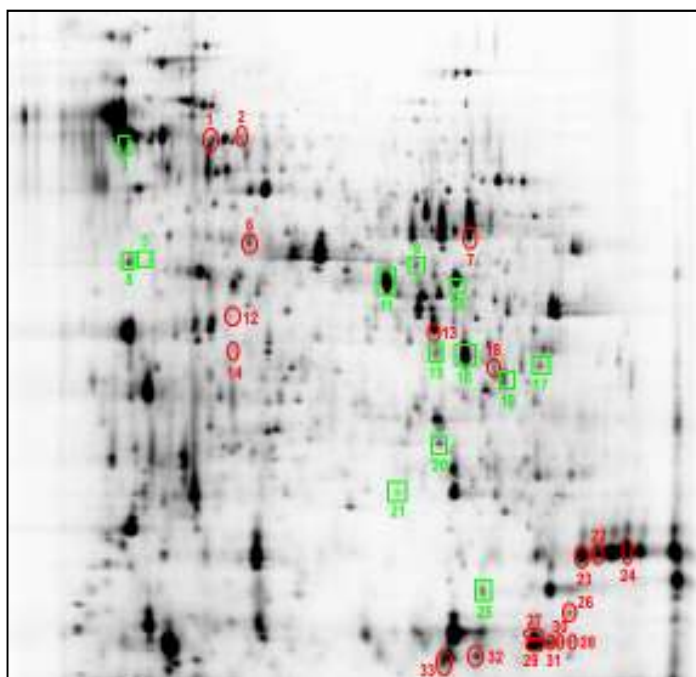
Al perfil de expresión número 2 respondieron el mayor número de las proteínas del proteoma de las cepas estudiadas con 71 proteínas (Figura 46) y de las proteínas identificadas con 11 (Tabla 18). Este perfil de expresión tiene un comportamiento similar al que presentó la producción de andrastina A en los mutantes y la cepa parental; la cepa MT5-209 súper-productora y la MT5-245 y MT5-257 con menos producción al compararse con la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905.



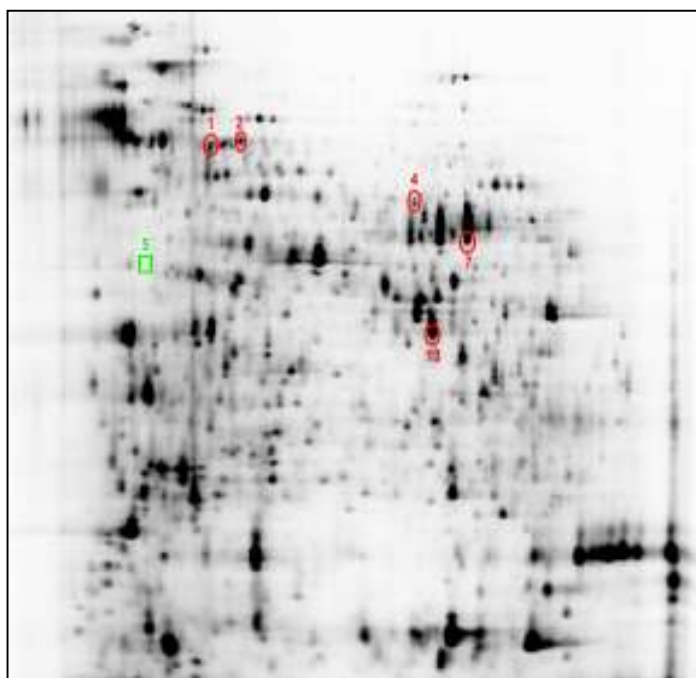
**Figura 42.** Proteoma intracelular de *P. roqueforti* CECT 2905 marcado con Cy3.



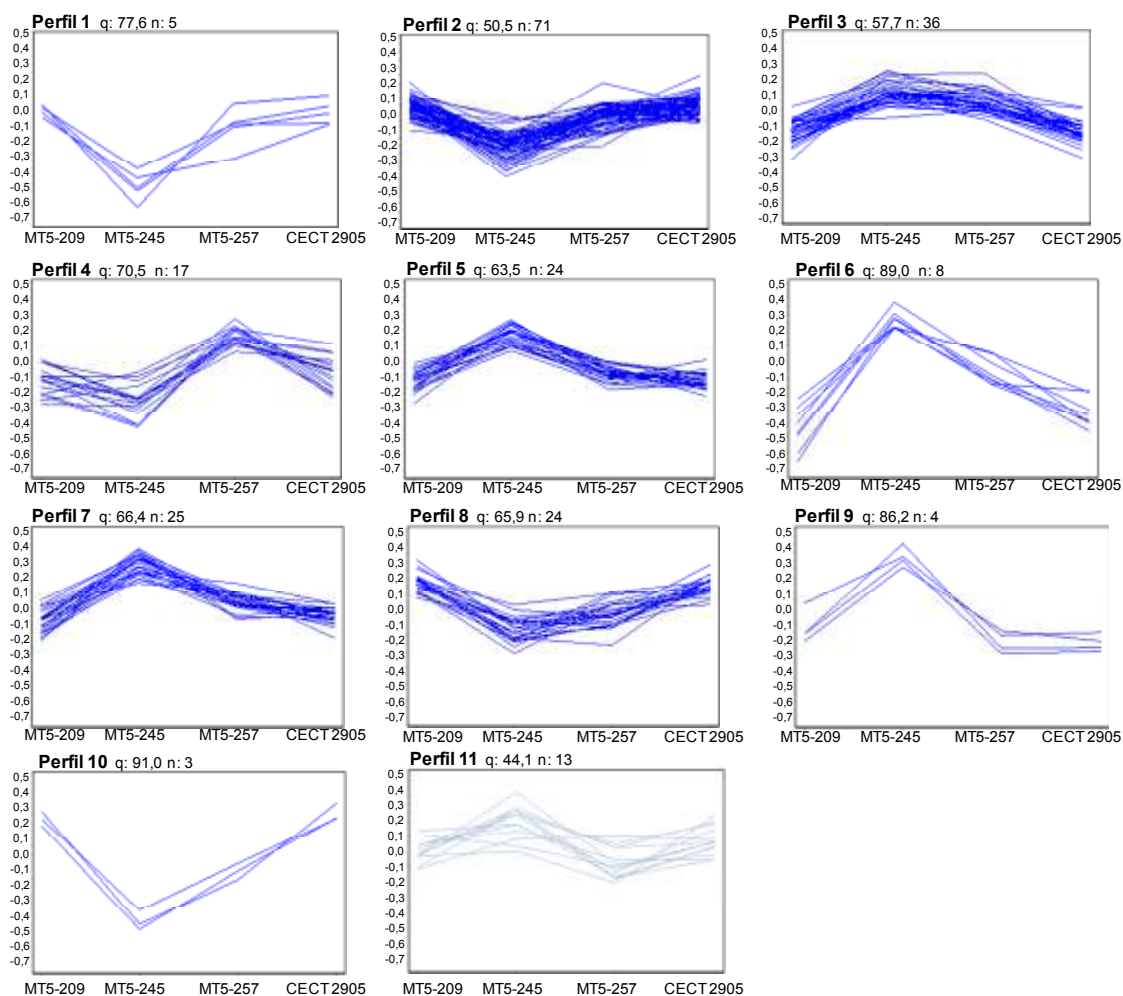
**Figura 43.** Proteoma intracelular del mutante MT5-209 marcado con Cy5.



**Figura 44.** Proteoma intracelular del mutante MT5-245, marcado con Cy3. Proteínas sobreexpresadas en comparación con la cepa parental (○). Proteínas reprimidas en comparación con la cepa parental (□).



**Figura 45.** Proteoma intracelular del mutante MT5-257, marcado con Cy5. Proteínas sobreexpresadas en comparación con la cepa parental (○). Proteínas reprimidas en comparación con la cepa parental (□).



**Figura 46.** Perfiles de expresión atendiendo a los patrones presentados por las proteínas en la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes MT5-209, MT5-245 y MT5-257. Valor-q (q). Número de proteínas (n).

En la Tabla 19 se presenta la información resumida de cada una de las proteínas identificadas.

**Tabla 19.** Proteínas identificadas con diferencias en la expresión entre la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes MT5-209, MT5-245 y MT-257.

N°	Nombre*	Título	MT5-209/WT		MT5-245/WT		MT5-257/WT		ANOVA	Puntuación	Función
			Prueba-T	Ratio	Prueba-T	Ratio	Prueba-T	Ratio			
1	<b>Pc16g11070</b>	Strong similarity to mitochondrial heat shock protein Hsp60 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	0,1400	1,37	0,0190	2,07	0,0440	1,52	0,013	244	Procesamiento de la información genética
2	<b>Pc13g03420</b>	Strong similarity to PDI related protein A prpA - <i>Aspergillus niger</i> .	0,0680	1,34	0,0026	2,76	0,0170	1,76	0,00031	118	Procesamiento de la información genética
3	<b>Pc22g17870</b>	Strong similarity to hypothetical ECM33 homolog SPCC1223.12c - <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	0,9900	1,02	0,0330	-1,66	0,8100	-1,03	0,045	133	No clasificada
4	<b>pgkA</b>	Phosphoglycerate kinase ( <i>Penicillium citrinum</i> ).	0,2300	-1,17	0,5700	-1,08	0,0110	1,53	0,033	359	Metabolismo de carbohidratos.
5	<b>Pc12g05640</b>	Strong similarity to heat shock protein sspB - <i>Aspergillus niger</i> .	0,1400	-1,16	0,0004	-2,58	0,0029	-1,51	5,80E-005	222	Procesamiento de la información genética
6	<b>Pc21g16620</b>	Strong similarity to mediator of nitrogen metabolite repression nmrA - <i>Aspergillus nidulans</i> .	0,8500	1,08	0,0096	1,70	0,5800	1,06	0,031	130	No clasificada
7	<b>Pc20g04810</b>	Strong similarity to estrogen receptor-binding cyclophilin cypD - <i>Bosprimigenius taurus</i> .	0,9000	1,00	0,0002	1,87	0,0023	1,53	0,00026	224	Procesamiento de la información genética
8	<b>Pc13g09680</b>	Strong similarity to aspartyl proteinase candidapepsin - <i>Candida albicans</i> .	0,4000	1,10	0,0300	-1,89	0,8700	-1,01	0,013	127	Destino proteico
9	<b>Pc22g20490</b>	Strong similarity to cinnamyl-alcohol dehydrogenase CAD1 - <i>Eucalyptus gunnii</i> .	0,8300	-1,04	0,0180	-1,56	0,1100	-1,25	0,013	285	Metabolismo y energía
10	<b>Pc20g15580</b>	Strong similarity to NADPH-dependent aldehyde reductase - <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> .	0,0330	-1,28	0,0046	-1,59	0,3500	-1,12	0,015	335	Metabolismo y energía
11	<b>Pc12g10800</b>	Strong similarity to endo 1,5-alpha-arabinanase abnA - <i>Aspergillus niger</i> .	0,4400	-1,09	0,0120	-1,76	0,0270	-1,46	0,0038	267	No clasificada
12	<b>Pc20g07400</b>	Strong similarity to phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthase Ade1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	0,9500	1,02	0,0160	1,53	0,1400	1,32	0,042	225	Metabolismo de nucleótidos;
13	<b>Pc16g05650</b>	Strong similarity to aldo/keto reductase Gcy1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,9300	1,07	0,0005	2,84	0,0280	1,52	0,00066	211	Metabolismo y energía.
14	<b>Pc13g12400</b>	Strong similarity to spermidine synthase Spe3 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	0,5500	1,11	0,0003	2,08	0,0300	1,31	0,0009	188	Metabolismo de amino ácidos
15	<b>Pc21g16970</b>	Vacuolar serine protease (allergen Pen n 18) <i>Penicillium chrysogenum</i> .	0,3200	1,16	0,0013	-2,11	0,9500	-1,02	9,00E-005	300	Destino proteico
16	<b>Pc21g16970</b>	Vacuolar serine protease (allergen Pen n 18) <i>Penicillium chrysogenum</i> .	0,0840	1,36	0,0011	-1,95	0,8300	1,03	0,00011	368	Destino proteico
17	<b>Pc21g02360</b>	Strong similarity to GU4 nucleic-binding protein 1 Arc1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	0,3600	1,30	0,0190	-1,67	0,8700	1,11	0,045	94	Procesamiento de la información genética

Continuación Tabla 19.

N°	Nombre*	Título	MT5-209/WT		MT5-245/WT		MT5-257/WT		ANOVA	Puntuación	Función
			Prueba-T	Ratio	Prueba-T	Ratio	Prueba-T	Ratio			
18	Pc20g03160	Strong similarity to siroheme synthase cysG - <i>Escherichia coli</i> .	0,1900	1,24	0,0051	1,51	0,8600	-1,01	0,0098	269	Metabolismo de cofactores y vitaminas
19	TSTA_018690	Putative NADH-cytochrome b5 reductase ( <i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500)	0,7700	1,02	0,0002	-1,59	0,9000	1,01	1,20E-005	109	Metabolismo y energía.
20	Pc22g01260	Strong similarity to small G-protein Gsp1 - <i>Candida albicans</i> .	0,2200	1,16	0,0052	-2,00	0,5000	-1,08	0,0002	500	Procesamiento de la información genética
21	Pc22g19060	Strong similarity to cyclophilin cypB - <i>Aspergillus nidulans</i> .	0,9600	-1,05	0,0047	-3,79	0,0850	-2,05	0,0024	266	Procesamiento de la información genética
22	Pc18g05190	Strong similarity to cyclophilin-like peptidyl prolyl cis-trans isomerase cypA - <i>Aspergillus niger</i> .	0,6000	-1,09	0,0350	1,62	0,1500	1,21	0,036	91	Procesamiento de la información genética
23	Pc18g05190	Strong similarity to cyclophilin-like peptidyl prolyl cis-trans isomerase cypA - <i>Aspergillus niger</i> .	0,3600	-1,22	0,0280	1,80	0,3100	1,20	0,014	109	Procesamiento de la información genética
24	Pc18g05190	Strong similarity to cyclophilin-like peptidyl prolyl cis-trans isomerase cypA - <i>Aspergillus niger</i> .	0,1600	-1,40	0,0320	1,81	0,3100	1,18	0,0056	195	Procesamiento de la información genética
25	Pc16g13060	Strong similarity to cyclophilin cypB - <i>Aspergillus nidulans</i> .	0,7400	-1,07	0,0130	-1,99	0,0500	-1,48	0,007	155	Procesamiento de la información genética
26	Pc22g06700	Strong similarity to hypothetical protein 1342_scaffold_5.tfa_190wg - <i>Fusarium graminearum</i> .	0,2600	-1,26	0,0003	2,09	0,6200	-1,06	0,001	155	Procesamiento de la información genética
27	Pc21g15880	Strong similarity to nucleoside-diphosphate kinase NDK-1 - <i>Neurospora crassa</i> .	0,6700	1,10	0,0000	2,26	0,0600	1,13	2,60E-005	390	Metabolismo de nucleótidos
28	Pc21g15880	Strong similarity to nucleoside-diphosphate kinase NDK-1 - <i>Neurospora crassa</i> .	1,0000	-1,01	0,0071	2,42	0,4900	-1,16	0,0018	215	Metabolismo de nucleótidos
29	Pc21g15880	Strong similarity to nucleoside-diphosphate kinase NDK-1 - <i>Neurospora crassa</i> .	0,7600	-1,04	0,0002	2,28	0,4300	1,08	8,30E-006	595	Metabolismo de nucleótidos
30	Pc21g15880	Strong similarity to nucleoside-diphosphate kinase NDK-1 - <i>Neurospora crassa</i> .	0,4300	1,30	0,0013	2,56	0,3300	1,34	0,0086	409	Metabolismo de nucleótidos
31	Pc21g15880	Strong similarity to nucleoside-diphosphate kinase NDK-1 - <i>Neurospora crassa</i> .	0,4000	-1,22	0,0013	2,56	0,9700	-1,02	0,00011	435	Metabolismo de nucleótidos
32	Pc21g15880	Strong similarity to nucleoside-diphosphate kinase NDK-1 - <i>Neurospora crassa</i> .	0,5600	1,07	0,0023	1,67	0,1500	1,15	0,0026	331	Metabolismo de nucleótidos
33	NCU02289	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic (UBCc) domain ( <i>Neurospora crassa</i> OR74A)	0,3900	-1,16	0,0070	1,71	0,3800	1,12	0,002	258	Procesamiento de la información genética

\*Las proteínas de *P. roqueforti* que fueron identificadas en el estudio no habían sido nombradas y depositadas en bases de datos porque el nombre dado a cada una de ellas corresponde con el de la proteína con la que presentó mayor homología.

# **Discusión del Capítulo I**





## Discusión del Capítulo I

### 1. Optimización de la producción de andrastinas en *P. roqueforti* CECT 2905.

Las andrastinas son un grupo de compuestos que ha despertado gran interés debido a sus potencialidades como anticancerígenos (Omura *et al.*, 1996; Uchida *et al.*, 1996a, 1996b) y por su presencia en los quesos azules (Fernández-Bodega *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2005).

Omura *et al.*, (1996) evaluaron la producción de andrastina A de *Penicillium sp.* FO-3929 (posteriormente identificado como *Penicillium allii*) en medio líquido MAp en condiciones controladas de fermentador en un volumen de 30 litros de medio de cultivo. En este estudio los autores llevaron a cabo la fermentación a 27°C, con agitación de 250 rpm, pH de 6,5 y una aireación de 15 l/min. La producción de andrastina A fue evaluada hasta las 112 horas de fermentación, tiempo en el que se alcanzó el mayor nivel de producción (120 µg/ml). Sin embargo no existía información bibliográfica sobre las condiciones para la producción de este metabolito en *P. roqueforti*.

En un primer acercamiento a la producción de andrastina A por *P. roqueforti* CECT 2905, se evaluaron seis medios de cultivo líquidos usados de forma rutinaria para la producción de metabolitos secundarios por hongos filamentosos. En este experimento se incluyó el medio MAp utilizado por Omura *et al.*, 1996 para la producción de andrastina A en *P. allii*. Con el medio MAp se alcanzaron los mejores resultados atendiendo a los niveles de producción de andrastina A y a la reproducibilidad entre las diferentes réplicas del experimento (Figura 24).

En el presente estudio, la producción volumétrica de andrastina A por *P. roqueforti* CECT 2905 en medio MAp a las 144 h de incubación fue sólo de 22,2 µg/ml, cinco veces inferior que la producción obtenida por Omura *et al.*, (1996) en este mismo medio de cultivo con la cepa *Penicillium sp.* FO-3929 (120 µg/ml). Hay que tener en cuenta que, además de emplearse cepas diferentes, estos autores realizaron las fermentaciones en condiciones controladas en fermentadores, mientras que las fermentaciones de este estudio se realizaron a escala de laboratorio en matraz. Los parámetros de pH del medio, temperatura de incubación y agitación fueron similares, pero es posible que en fermentador trabajaran a pH controlado, lo cual se ha visto con frecuencia que mejora los niveles de producción.

El medio MAp es un medio complejo que se caracteriza por contener almidón soluble como principal fuente de hidratos de carbono en lugar de glucosa o sacarosa presentes en los demás medios ensayados. Además, este medio contiene harina de soja y levadura comercial como ingredientes complejos que aportan una gran variedad de compuestos químicos que pudieran potenciar la síntesis de andrastina A.

La optimización de las condiciones de cultivo es un aspecto muy importante en el campo de las fermentaciones para mejorar el rendimiento en la obtención de un producto dado y minimizar la variabilidad del proceso, así como reducir el tiempo de desarrollo y los costes totales (Mu *et al.*, 2009). Las técnicas de diseño de experimentos son empleadas frecuentemente para la optimización de las condiciones de producción de metabolitos de interés en diferentes especies de hongos del género *Penicillium* (Saxena y Saxena, 2004; Arora y Chandra, 2010; Maeda *et al.*, 2010). En los procesos fermentativos intervienen una gran cantidad de factores que pueden influir de forma independiente o interaccionando entre ellos, en la producción del metabolito deseado (Kennedy y Krouse, 1999).

Para la optimización de la producción volumétrica de andrastina A por *P. roqueforti* CECT 2905 en el medio MAp se tuvo en cuenta tres factores (pH del medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación). Se mantuvieron fijos la agitación, el tamaño del inóculo y la composición del medio de cultivo.

En el primer diseño “factorial 3<sup>3</sup>” se evaluaron rangos de temperatura (20-30°C), pH (5,0-7,0) y tiempo de incubación (3-8 días) en los que estaban comprendidos los valores usados por Omura *et al.*, (1996) para la producción de andrastina A en *Penicillium sp.* FO-3929 (temperatura 27°C, pH 6,5 y tiempo 4,7 días).

Al procesar y analizar los resultados obtenidos, se observó que no se obtenían las condiciones óptimas para la producción de andrastina A y que las predicciones indicaban que una disminución de los valores de pH y temperatura y un aumento del tiempo de incubación incrementaría la producción del metabolito de interés por *P. roqueforti* CECT 2905 en el medio MAp. En este diseño se logró multiplicar por 4 el valor de producción de andrastina A obtenido en los experimentos previos con el medio MAp.

En un segundo diseño “factorial 3<sup>3</sup>” se ensayaron los valores de los factores predichos por el modelo inicial, pero teniéndose en cuenta los límites fisiológicos que

podrían afectar el desarrollo del microorganismo y por tanto la viabilidad del experimento.

Las predicciones basadas en el modelo (Tabla 13) indicaban que la producción de andrastina A podría aumentar a valores de pH cercanos a 1, pero *P. roqueforti* no es capaz de desarrollarse a pH inferiores de 3 (Moreau, 1980). El crecimiento óptimo de *P. roqueforti* se produce a 24°C, pero puede crecer en un rango que va desde 5 a 35°C (Moreau, 1980; Pitt y Hocking, 2009).

Aunque en algunos de los experimentos del diseño del segundo “factorial 3<sup>3</sup>” se alcanzaron valores de la producción volumétrica de andrastina A superiores a 150 µg/ml, la modelación matemática estableció un rango de producción entre 116-134 µg/ml al utilizar un tiempo de incubación de 12 días, el pH del medio entre 4,3-5,1 y la temperatura entre 17-20°C. Las predicciones basadas en este modelo matemático indicaron que podría aumentarse de forma moderada la producción de este metabolito a mayor tiempo de incubación.

Con el empleo de las técnicas de diseño experimental se logró optimizar las condiciones de producción volumétrica de andrastina A, incrementado 7 veces el valor original, de 22,2 µg/ml a 150 µg/ml. Saxena y Saxena, (2004) incrementaron 2,4 veces la producción de la enzima tanino acil-hidrolasa en *Penicillium variable* optimizando las condiciones de cultivo. Para el diseño de experimentos, estos autores tuvieron en cuenta la concentración del sustrato, el pH, la concentración del inóculo, la agitación y el tiempo de incubación para la optimización.

Por otra parte Arora y Chandra, (2010) optimizaron en tres pasos las condiciones de producción de compuestos con actividad antioxidante en *Penicillium granulatum*. En el primer paso utilizaron el método clásico para evaluar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, luego un diseño Plackett-Burman para comprobar cómo afectaba a la producción cada uno de los componentes del medio y por último un análisis de superficie de respuesta para determinar los valores óptimos de concentración en el medio de sacarosa y NaNO<sub>3</sub> y temperatura de incubación.

## **2. Obtención de mutantes de *P. roqueforti* CECT 2905 afectados en la producción de andrastina A.**

Las mutaciones han jugado un importante papel en el desarrollo de la producción de antibióticos en hongos filamentosos. Tras observar las ventajas de la penicilina y

cefalosporina producidas en bajas concentraciones por las cepas silvestres de *Penicillium chrysogenum* y *Cephalosporium acremonium* (posteriormente clasificada como *Acremonium chrysogenum*) se hizo uso del potencial genético de las mutaciones para generar cepas comerciales superproductoras (Elander, 1967; Elander *et al.*, 1976). Las mutaciones también han sido importantes en otras áreas de la investigación como es el descubrimiento de la ruta biosintética de un antibiótico mediante el estudio de mutantes genéticamente bloqueados en la producción del metabolito objeto de estudio (Campos *et al.*, 2007).

En la mejora clásica se realizan mutaciones genéticas al azar usándose tradicionalmente dos tipos de mutágenos: físicos (radiación ultravioleta, rayos gamma y rayos X) y químicos (etil metano sulfonato, N -metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, mostazas nitrogenadas y ácido nitroso) (Campos *et al.*, 2007). La obtención de mutantes mediante la exposición a luz UV de esporas ha sido útil tanto en la mejora de la producción de penicilina como de cefalosporina. El mutante CW-19 de *A. chrysogenum* obtenido por exposición a luz ultravioleta fue capaz de producir el triple de cefalosporina C que la cepa progenitora; y una vez optimizadas las condiciones de fermentación, dicho incremento fue de hasta 15 veces (Elander *et al.*, 1976).

En esta misma línea el grupo de la Universidad de Wisconsin al investigar la mejora genética de hongos filamentosos mediante la selección de mutantes, observaron una correlación entre el incremento de la producción de antibiótico y la reducción en la esporulación y el crecimiento de las cepas productoras (Queener *et al.*, 1975; Elander *et al.*, 1976). De esta manera entre las cepas NEEL-1951 y Q-176, mutante obtenido por radiación con rayos X, hubo en este último una disminución en el crecimiento y la esporulación de un 60% unido a un incremento en la producción de penicilina G de 6 veces (Elander *et al.*, 1976).

A diferencia de los resultados observados por Elander *et al.*, (1976), en este estudio se observó una correlación positiva entre la esporulación y la producción de andrastina A en los mutantes obtenidos por exposición a luz ultravioleta. Los mutantes MT5-245 y MT5-257 presentaron la producción de andrastina A disminuida con respecto a la cepa parental al ser cultivados en medio MAp y CYA (Figura 33 y Figura 38) y a su vez presentaron una menor esporulación (Figura 39A). Por otra parte, la cepa MT5-209 tuvo mayor producción que *P. roqueforti* CECT 2905 (Figura 33 y Figura 38B) unido a una mayor esporulación (Figura 39A).

Los mutantes con producción de andrastina A disminuida (MT5-245 y MT5-257) no presentaron disminución en el crecimiento en las condiciones de producción de andrastina A en medio líquido MAp (Figura 37). Sin embargo sí se vio afectada la producción en peso seco de micelio al ser crecidos en medio sólido CYA (Figura 34) y la tasa de crecimiento apical en diferentes medios de cultivo sólido (Figura 35).

En los estudios previos para la optimización de las condiciones de producción de andrastina A (Apartado 1.1 de Resultados del Capítulo I) se observó que las esporas de *P. roqueforti* procedentes de cultivos en placas de PW2 iban acompañadas de andrastinas que eran eliminadas tras sucesivos lavados.

Al analizar la curva de producción y esporulación de andrastina A de la cepa *P. roqueforti* CECT 2905 (Figura 39) se observa correlación entre ambos procesos. El máximo nivel de producción de andrastina A está precedido de los mayores niveles de esporulación.

### **3. Estudio proteómico comparativo entre los mutantes afectados en la producción de andrastina A y la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905.**

Al analizar las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa parental *P. roqueforti* CECT 2905 y los mutantes se observan tres tipos de proteínas.

1) Chaperonas, proteínas de plegamiento (PDI: proteína disulfuro isomerasa) y proteínas de respuesta al estrés (ciclofilina).

Estas proteínas aparecen frecuentemente en todo tipo de mutantes como respuesta del daño producido a nivel de DNA y en consecuencia sobre los proteomas modificados. La función de estas proteínas es reparar el daño producido como consecuencia del proceso de mutación.

2) Proteínas del metabolismo primario.

La función de estas proteínas es proporcionar precursores esenciales para el metabolismo y el crecimiento. Entre estas proteínas se encuentran la proteína mediadora de la represión metabólica del nitrógeno *nmrA* y la fosforibosil-aminoimidazol-succinocarboxamida sintetasa (*Ade1*) implicada en la síntesis de las purinas. Estas proteínas sugieren que algunos de los mutantes están alterados en el metabolismo del nitrógeno y de la adenina, lo que afecta el crecimiento.

3) Posibles proteínas del metabolismo secundario. Entre ellas encontramos la espermidina sintetasa (SP3), la cinamil-alcohol deshidrogenasa y la NADPH-dependiente aldehído reductasa. La síntesis de espermidina es importante en el metabolismo secundario puesto que está demostrado, siendo la espermidina un importante regulador de la síntesis de la penicilinas y otros metabolitos secundarios en *P. chrysogenum* (Martín *et al.*, 2012).

La cinamil-alcohol deshidrogenasa es una enzima implicada en la biosíntesis de ácido cinámico que es un precursor (generalmente en forma de cinamil-CoA) de la biosíntesis de metabolitos secundarios de tipo flavonoide (Belsito *et al.*, 2007).

En general la variación de la mayor parte de las proteínas de la Tabla 19 es pequeña, lo que se correlaciona con el hecho de que estos mutantes no están totalmente bloqueados en la biosíntesis de andrastina A. Será por tanto preciso obtener mutantes bloqueados completamente para conseguir profundizar en la biosíntesis de las andrastinas y determinar cuáles son los enzimas implicadas en la ruta biosintética.

# Capítulo II

**Estudios moleculares de la biosíntesis de toxina PR  
en *Penicillium roqueforti***





## **Objetivos del Capítulo II**



## Objetivos del Capítulo II

1. Identificar la toxina PR mediante cromatografía y espectrometría de masas.
2. Estudiar la ruta biosintética de la toxina PR mediante silenciamiento génico de *P. roqueforti* ATCC 48936.
3. Comparar los metabolomas de los transformantes silenciados con la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936.
4. Evaluar fenotípicamente los transformantes silenciados.
5. Comparar fenotípicamente las cepas de referencia *P. roqueforti* CECT 2905 y *P. roqueforti* ATCC 48936.



## **Resultados del Capítulo II**



## Resultados del Capítulo II

### 1. Producción e identificación cromatográfica de la toxina PR.

La toxina PR es un compuesto de naturaleza sesquiterpenoide que fue purificado por primera vez en 1972 a partir de muestras de forrajes utilizados como alimento para ganado que estaban “contaminadas” con el hongo *P. roqueforti* (Wei *et al.*, 1973). Su estructura cristalina se conoce desde 1975 (Wei *et al.*, 1975).

La primera dificultad encontrada al trabajar con la toxina PR fue el hecho de no contar con compuesto patrón para su identificación y cuantificación. Al no ser posible adquirir el patrón de toxina PR a partir de casas comerciales, se siguió la estrategia de separar y recoger las posibles fracciones que contienen la toxina PR a través de cromatografía líquida de fase reversa, para posteriormente identificarlas por espectrometría de masas como parte de una colaboración con el Dr. Montero del “Centro para el Desarrollo de la Biotecnología” (CDB) del CSIC en Valladolid.

La toxina PR y el ácido micofenólico son compuestos que co-eluyen en carreras cromatográficas cortas de cromatografía en fase reversa debido a que tienen igual composición química ( $C_{17}H_{20}O_6$ ) y por tanto igual peso molecular (Nielsen *et al.*, 2006) así como similar hidrofobicidad. Se contaba con la ventaja de disponer del patrón de ácido micofenólico lo cual permitió hacer una separación cromatográfica en gradiente con una pendiente leve en la zona de elución de este compuesto, de modo que se lograra la separación de ambos compuestos (Apartado 6.7 de Materiales y Métodos).

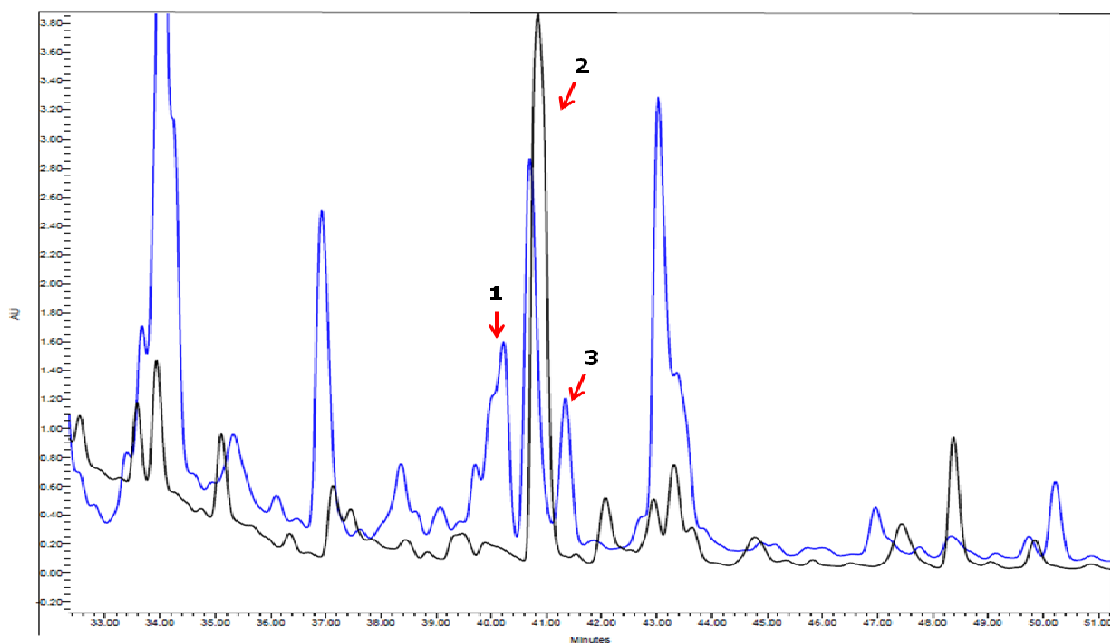
En un primer momento se realizaron cultivos de la cepa de referencia *P. roqueforti* CECT 2905 en medio YES. Los cultivos se incubaron durante 15 días a 24°C en estacionario. Al realizar la separación de los extractos crudos de *P. roqueforti* CECT 2905 en medio YES por cromatografía de fase reversa no se logró separar un pico que al ser analizado mediante espectrometría de masas correspondiera a la toxina PR. También se analizó el pico que correspondía con el ácido micofenólico para descartar que estuvieran co-eluyendo.

Tras varios intentos fallidos se llegó a la conclusión de que en estas condiciones *P. roqueforti* CECT 2905 no producía la toxina PR. Para identificar la toxina PR se trabajó en paralelo en dos estrategias distintas: modificando las condiciones de cultivo para intentar recuperar la producción de toxina PR en la cepa *P. roqueforti* CECT 2905

y evaluando la producción de toxina PR por una nueva cepa de referencia *P. roqueforti* ATCC 48936. Esta última, es citada por Chang *et al.*, (1991b) como una cepa de alta producción de toxina PR.

Se evaluó la producción de toxina PR de ambas cepas de referencia en medio YES suplementado con extracto de maíz (YESM) y medio arroz el cual se elabora hidratando y posteriormente esterilizando los granos de arroz. Ambos cultivos se incubaron en estacionario a 24°C durante 15 días.

En la Figura 47 se superponen los cromatogramas de los extractos crudos de las cepas de referencia *P. roqueforti* CECT 2905 y *P. roqueforti* ATCC 48936 cultivadas en medio arroz. En ambos casos el pico 2 coincidió con el tiempo de retención y el espectro de absorción del ácido micofenólico. En el cromatograma de *P. roqueforti* ATCC 48936 se observa cómo inmediatamente después del pico de ácido micofenólico aparece otro pico, nombrado como 3. Este pico era casi inexistente en *P. roqueforti* CECT 2905.



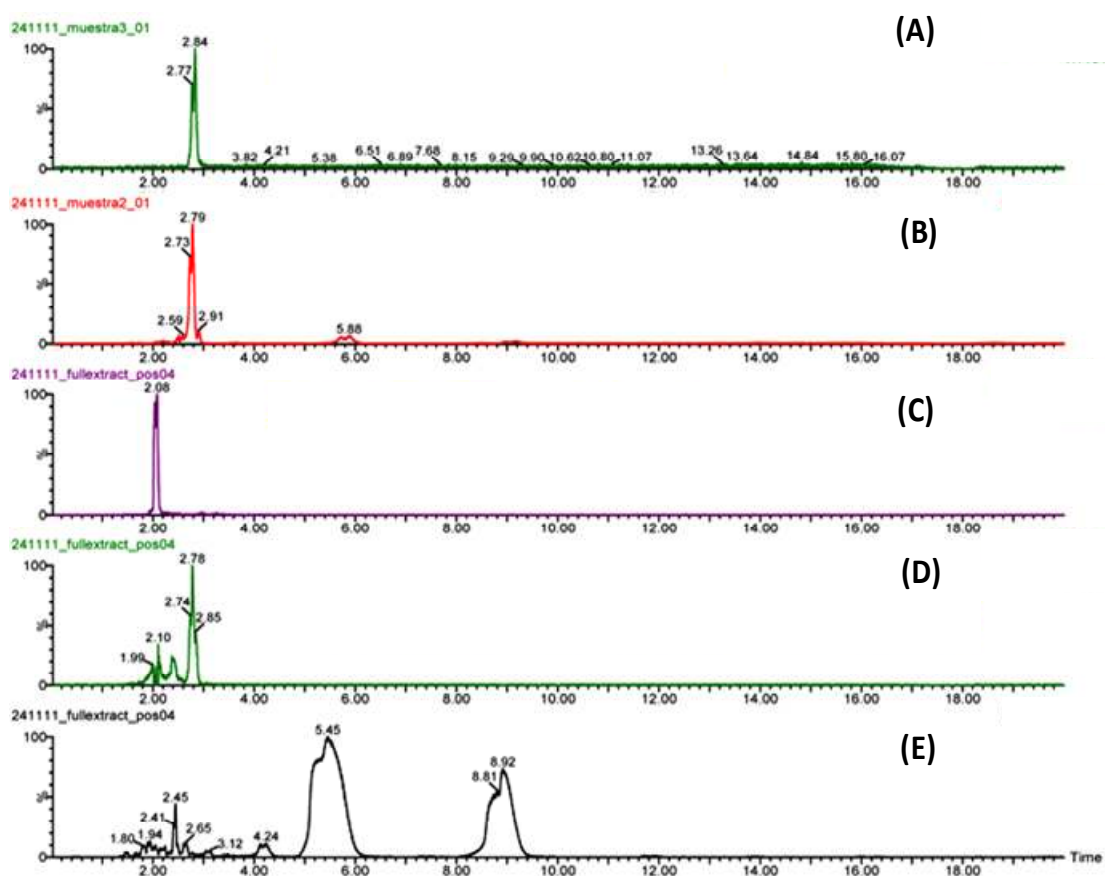
**Figura 47.** Cromatograma de los extractos crudos de *P. roqueforti* CECT 2905 (-) y *P. roqueforti* ATCC 48936 (-) cultivados en medio arroz.

Se recogieron las fracciones correspondientes a los picos cromatográficos 1, 2 y 3. Las fracciones y el extracto crudo de *P. roqueforti* ATCC 48936 fueron analizados



usando un sistema UPLC-QToF-MS compuesto por un Acquity™ UPLC System (Waters, Manchester, UK) y un espectrómetro de masas Synapt HDMS G2 con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de tiempo de vuelo (QToF) (Waters, Manchester, UK).

El cromatograma completo del extracto crudo es tomado como cromatograma base (Figura 48E). A partir de éste fueron extraídos los cromatogramas (CIE) para el valor  $m/z$  321,1322 (corresponde a ácido micofenólico y toxina PR) y  $m/z$  320,1596 (correspondiente a PR-imina) (Figura 48D y Figura 48C, respectivamente).

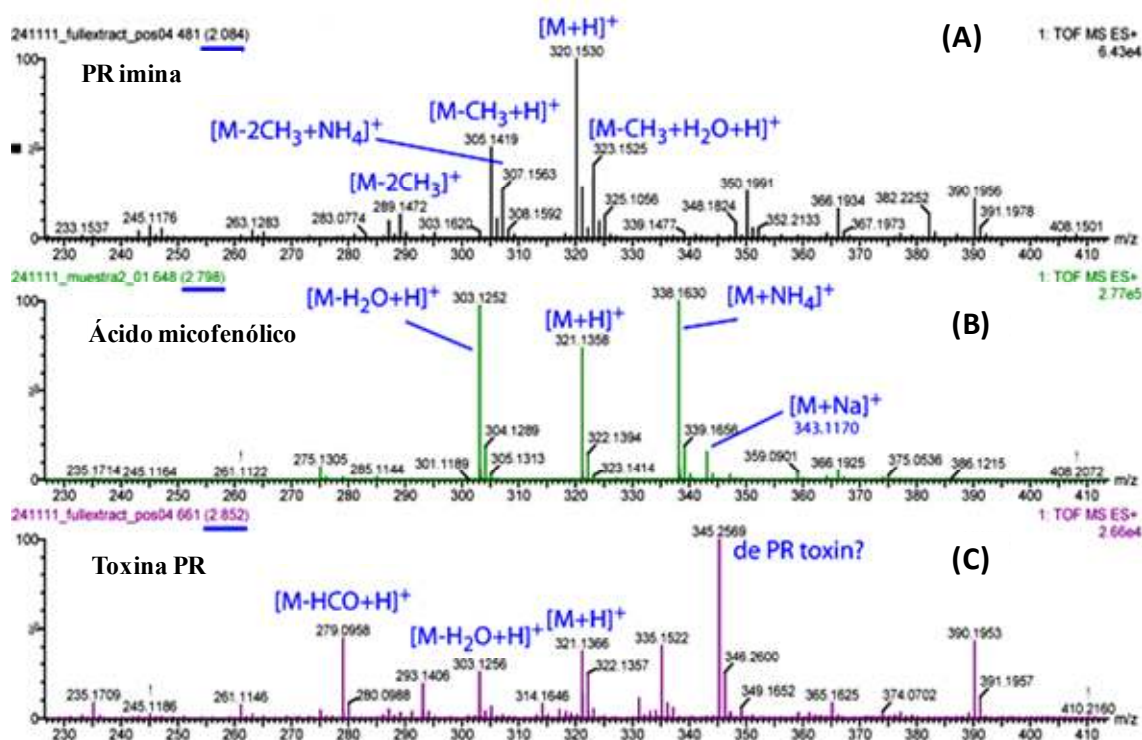


**Figura 48.** Cromatogramas en UPLC de extracto crudo de *P. roqueforti* ATCC 48936 y las fracciones colectadas. **(A)** Cromatograma de la fracción 3; **(B)** cromatograma de la fracción 2; **(C)** CIE del extracto crudo para  $m/z$  320,1498 correspondiente a la PR-imina; **(D)** CIE del extracto crudo para  $m/z$  321,1322 para ácido micofenólico y toxina PR; **(E)** cromatograma base de extracto crudo de *P. roqueforti* ATCC 48936.

El cromatograma de la fracción purificada 2 se representa en la Figura 48B. El tiempo de elución del compuesto mayoritario (2,79 min) de esta fracción coincide con uno de los picos cromatográficos observado en el cromatograma extraído para  $m/z$  231,1322 (Figura 48D) y es asumido como el correspondiente al ácido micofenólico. Esta asunción fue corroborada por el espectro de masas (Figura 49B). Pudieron ser identificados 4 iones a partir de este espectro de masas:  $m/z$  321.1358,  $m/z$  303.1252,  $m/z$  338.1630, y  $m/z$  343.1170 los cuales pueden ser adscritos a los iones  $[M+H]^+$ ,  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ , y  $[M+Na]^+$ , respectivamente. Estos iones permiten identificar inequívocamente a este pico como correspondiente al ácido micofenólico.

El espectro de masas del pico observado en la Figura 48C (tiempo de retención 2,08 min) se representa en la Figura 49A. Además del ion pseudo-molecular ( $[M+H]^+$ ) de  $m/z$  320.1530, que es atribuido a la PR-imina, un derivado de la toxina PR, ( $\Delta m/z = 3.2$  mDa), otros 4 iones explican la correspondencia con este compuesto (Figura 49A). Estos iones fueron  $m/z$  289.1472 ( $[M-2CH_3]^+$ ),  $m/z$  307.1563 ( $[M-2CH_3+NH_4]^+$ ),  $m/z$  305.1419 ( $[M-CH_3+H]^+$ ), y  $m/z$  323.1525 ( $[M-CH_3+H_2O+H]^+$ ). Un espectro de masas similar a este es reconocido en el cromatograma base (Figura 48E) a tiempo 2,08 min. Como consecuencia, el compuesto correspondiente a este pico en CIE de  $m/z$  320.1530 es identificado como la PR-imina.

En el espectro de masas del pico que eluye a 2,85 min (Figura 49C) fueron encontrados 3 iones que pueden ser adscritos a la toxina PR. Concretamente fueron  $m/z$  321,1366,  $m/z$  303,1256 y  $m/z$  279,0958 que se pudieran corresponder con  $[M+H]^+$ ,  $[M-H_2O+H]^+$ , y  $[M-HCO+H]^+$  respectivamente. El último ion (probablemente un aldehído HCO de la toxina PR) es particularmente interesante ya que no fue observado en el espectro de masas de su compuesto isobárico, ácido micofenólico. Este hecho permite la diferenciación entre estos dos compuestos. Por lo tanto, se asume que en estas condiciones cromatográficas la toxina PR eluye muy cerca (casi co-eluye) con el ácido micofenólico, pero las diferencias en los espectros de masas (Figura 49) indica que el pico 2 corresponde con el ácido micofenólico y el pico 3 con la toxina PR.



**Figura 49.** Espectros de masas. **(A)** Espectro de masas que corresponde al pico que eluye a 2,08 min en el cromatograma de la Figura 48D, identificado como PR-imina. **(B)** Espectro de masas que corresponde al pico que eluye a 2,79 min en el cromatograma de la Figura 48B, identificado como ácido micofenólico. **(C)** Espectro de masas que corresponde al pico que eluye a 2,85 min en el cromatograma de la Figura 48A, identificado como toxina PR.

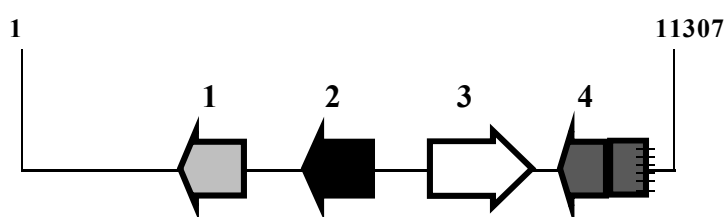
Toda esta información permitió identificar de forma categórica los compuestos químicos vinculados con las tres fracciones analizadas y localizar el pico correspondiente a la toxina PR y la PR-imina (compuesto derivado de la toxina PR) en el cromatograma de HPLC de fase reversa (Figura 47). El poder identificar el pico de la toxina PR permitió la cuantificación relativa de este metabolito en experimentos posteriores.

## 2. Estudio de la ruta biosintética de la toxina PR.

Varios autores proponen al aristoloqueno como posible precursor, tanto de la toxina PR como de otras toxinas de naturaleza sesquiterpenoide producidas por hongos filamentosos (Cane *et al.*, 1989; Cane y Kang, 2000; Demyttenaere *et al.*, 2003). A su vez, el aristoloqueno es sintetizado a partir del farnesildifosfato con la participación de la aristoloqueno sintasa. Esta enzima es una sesquiterpeno ciclasa codificada por el gen *ari1* en *P. roqueforti* (Proctor y Hohn, 1993).

Fernández-Bodega, (2010) utilizando la secuencia del gen *ari1* previamente publicada por Proctor y Hohn, (1993) diseñó una sonda de 1130 pb con la que rastreó la genoteca fágica de *P. roqueforti* CECT 2905. Como resultado de dicho rastreo aisló un fago positivo denominado  $\lambda$ Ari1 que presenta un inserto de 11 Kb que fue secuenciado, aunque no se continuó con su caracterización.

La comparación de la secuencia obtenida con las secuencias presentes en las bases de datos informáticas (NCBI) permitió la identificación de cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs) (Figura 50).



**Figura 50.** ORFs identificados como resultado del análisis de la secuencia correspondiente al inserto de 11307 pb del fago  $\lambda$ Ari1 y su comparación con las bases de datos informáticas.

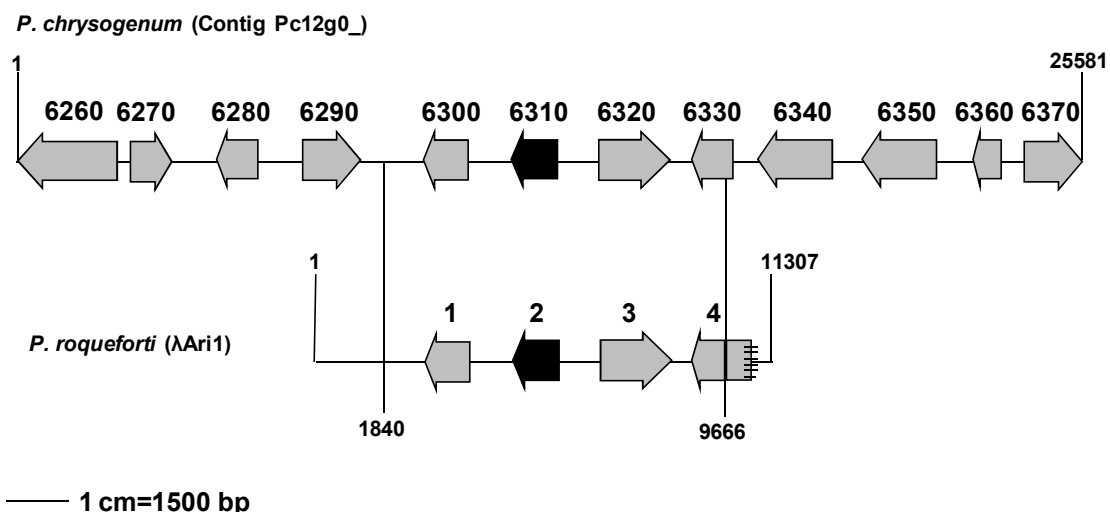
Los ORFs, tamaños y características fueron las siguientes:

- ORF1: 1072 pb. Identidad con oxidoreductasas de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta presentes en distintas especies del género *Aspergillus*.
- ORF2: 1129 pb. Gen *ari1* de *P. roqueforti* (Proctor y Hohn, 1993).
- ORF3: 1716 pb. Con alta similitud con hidroxiquinona oxidasa *mcrA* de *Streptomyces lavendulae* (August *et al.*, 1994) y 6-hidroxi-D-nicotina oxidasa de *Arthrobacter oxidans* (Sandu *et al.*, 2003).
- ORF4: 804 pb. Similar con una hipotética alcohol deshidrogenasa de cadena corta, pertenecientes a la familia de oxidoreductasas, identificadas en distintas especies del género *Aspergillus*.

## 2.1 Rectificación de secuencia del ORF4 y establecimiento de los intrones de los ORFs del *cluster* biosintético de la toxina PR.

Al realizar el Blast en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se observó que había una alta homología del  $\lambda$ Ari1 con la secuencia

depositada de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (*contig* Pc12g0), (Figura 51), excepto los 83 primeros aminoácidos del ORF4 que tenía una alta homología con el gen que codifica para la proteína Pc21g19870, el cual está localizado en otro *contig* de *P. chrysogenum*. Este hecho hizo suponer que existía una reorganización durante la construcción de la genoteca fágica de *P. roqueforti* en el fago  $\lambda$ Ari1 al contener el inserto dos regiones génicas dispares.



**Figura 51.** Comparación entre las regiones génicas de *P. chrysogenum* y *P. roqueforti* que contienen el gen *ari1*.

Nos propusimos completar la secuencia del ORF4 mediante la realización de PCRs y posterior secuenciación. Se diseñó el oligonucleótido reverso OL4-R (5'-CGTATCCAGTCGCACTAGCA-3'), el cual se localiza en la zona correcta del ORF4 de *P. roqueforti* CECT 2905 con homología con el gen que codifica para la proteína Pc12g06330 de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Además se diseñaron tres oligos directos que se encontraban en zonas altamente conservadas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y que al hacer pareja con OL4-R flanqueaban al gen que codifica para la proteína Pc12g06330: OL4-F1 (5'-GAGATATAGGGCGGCCTGAC-3'), OL4-F2 (5'-ACCCTGATCCAACACTCAGC-3') y OL4-F3 (5'-AGGCACACCGAAATGACTTG-3').

Se realizaron reacciones de PCR utilizándose como molde el ADN genómico de *P. roqueforti* ATCC 48936 y como cebadores las parejas de oligonucleótidos: OL4-F1, OL4-R; OL4-F2, OL4-R y OL4-F3, OL4-R.

Se logró obtener la banda de amplificación esperada con la PCR en la que se utilizaron como cebadores los oligos OL4-F2, OL4-R. La banda amplificada de 1000 pb se extrajo del gel de agarosa y fue secuenciada. La secuencia obtenida confirmó que existía una reorganización en el ORF4 del fago  $\lambda$ Ari1. La secuencia correcta ha sido depositada y se encuentra disponible en GenBank con número de depósito KC013363.

Considerando que el aristoloqueno es el precursor de la toxina PR y que en hongos filamentosos es frecuente que los genes involucrados en la síntesis de un compuesto se encuentren agrupados formando *clusters*, se decidió nombrar al grupo de genes que acompañan al gen *ari1* como “*cluster* biosintético de la toxina PR”

Los estudios de comparación en la base de datos bioinformática (NCBI) hacía suponer la presencia de un intrón en el ORF1 y tres en ORF3, además de los dos intrones que posee el gen *ari1*. Para establecer exactamente la posición de los intrones del ORF1 y ORF3 y así establecer los respectivos marcos de lectura, se realizaron reacciones de RT-PCR. Para dichas reacciones se diseñaron oligos que flanquearon a los posibles intrones que aparecen reflejados en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Oligonucleótidos diseñados para realizar las RT-PCR para definir la posición de los intrones del ORF1, ORF2 y ORF3.

Oligonucleótidos	Intrones
INT1-1F (GGCCAATCCGCTCATTAGTA) INT1-1R (CCGGGTTCAAGTATCTCTGC)	Intrón 1 de ORF1 (42 pb)
INT3-1y2F (AATACCAAAGTTGAAAGAACCG) INT3-1y2R (TTCATCTTAGCCAGGGTCTT)	Intrón 1 y 2 de ORF3
INT3-3F (GCTGTTCCGTTGAGAACTT) INT3-3R (TTTCTTCGACGTGATTGCAG)	Intrón 3 de ORF3

Al comparar la secuencia del ADN complementario (ADNc) obtenido en las diferentes RT-PCR con la del ADN genómico nos permitió definir cada uno de los intrones y los marcos de lectura de las regiones exónicas de los diferentes ORFs del *cluster* biosintético de la toxina PR. Las secuencias del ORF1 y ORF3 fueron depositadas y están disponibles en GenBank con números de depósito KC013361 y KC013362 respectivamente.

## 2.2 Estrategia de silenciamiento del cluster de biosíntesis de la toxina PR en *P. roqueforti* ATCC 48936.

En hongos filamentosos es frecuente que los genes que participan en la síntesis de un mismo metabolismo secundario se encuentren en el genoma formando agrupaciones génicas. Partiendo de este principio se planteó el objetivo de caracterizar al gen *ari1* y los tres ORFs que lo acompañan como posibles responsable de la síntesis de la toxina PR en *P. roqueforti* ATCC 48936. Se escogió esta cepa ya que con ella se obtuvo mayores niveles de producción, en las condiciones estudiadas, que con la cepa de referencia *P. roqueforti* CECT 2905 que apenas produce toxina PR (Figura 47).

En los laboratorios del Instituto de Biotecnología de la Universidad de León se ha desarrollado un sistema que ha permitido el silenciamiento génico en hongos filamentosos, como es el caso de *P. chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum* (Kosalková et al., 2009; Ullán et al., 2008). Este sistema se basa en el plásmido pJL43RNAi (Figura 21 del Apartado 2 de Materiales y Métodos). Este plásmido presenta un sitio único de corte para la enzima *NcoI*, en medio de dos promotores enfrentados: el promotor del gen *gpd* de *Aspergillus nidulans* y el promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*. Este sitio de corte permite la clonación de un pequeño fragmento exónico (300-500 pb) del gen cuya expresión se pretende silenciar. Como resultado de la transcripción del inserto clonado a partir de los dos promotores enfrentados, se forma una molécula de ARN de doble cadena (dsRNA). El dsRNA es procesado por una ARNasa (Dicer) perteneciente a la familia de nucleasas III, dando lugar a pequeñas moléculas (21-26 nucleótidos) de ARN de doble cadena, denominadas siRNAs. Los siRNAs se unen, por un lado, al ARN mensajero del que son complementarios, es decir, al del gen que se desea silenciar, y por otro lado al complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). El complejo RISC se encargará finalmente de degradar dicho ARN, silenciando por tanto la expresión del gen diana que lo codifica (Tuschl et al., 1999; Hammond et al., 2000; Nicolás et al., 2007).

El primer paso para llevar a cabo el silenciamiento de los ORFs objeto de estudio fue diseñar oligonucleótidos que permitieran la amplificación mediante PCR de regiones exónicas de cada una de ellas (Tabla 21). A los diferentes oligonucleótidos se les agregó en su extremo 5' un sitio de corte con la endonucleasa de restricción *NcoI*, excepto en el oligo ATORF4-F debido a que la región exónica del ORF4 amplificada presentaba un sitio de corte para esta enzima.

**Tabla 21.** Secuencias nucleotídicas de las parejas de oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos exónicos de los ORFs del *cluster* de biosíntesis de la toxina PR. Se muestran los tamaños de los productos de PCR para cada pareja de oligos.

Oligo	Secuencia	Producto de PCR
ATORF1F	5'-CCATGCCATGGCCCAGAGGCGAAGACAGTG	447 pb
ATORF1R	5'-CCATGCCATGGTTACCAAGTGCAGCCGTTATG	
ATORF2F	5'-CCATGCCATGGCGGACCGAACCAAGCCAGGAAGA	470 pb
ATORF2R	5'-CCATGCCATGGGACTCCTCCGCCAGAACCT	
ATORF3F	5'-CCATGCCATGGAGCTGTCTCCGATTTCTACTCCA	422 pb
ATORF3R	5'-CCATGCCATGGAATGCGCAACAGAACTCCGACTT	
ATORF4F	5'-GTCAAATTGTGCGCCCGTTCC	528 pb
ATORF4R	5'-CCATGCCATGGGACATTGCCGTGGCCAAC	

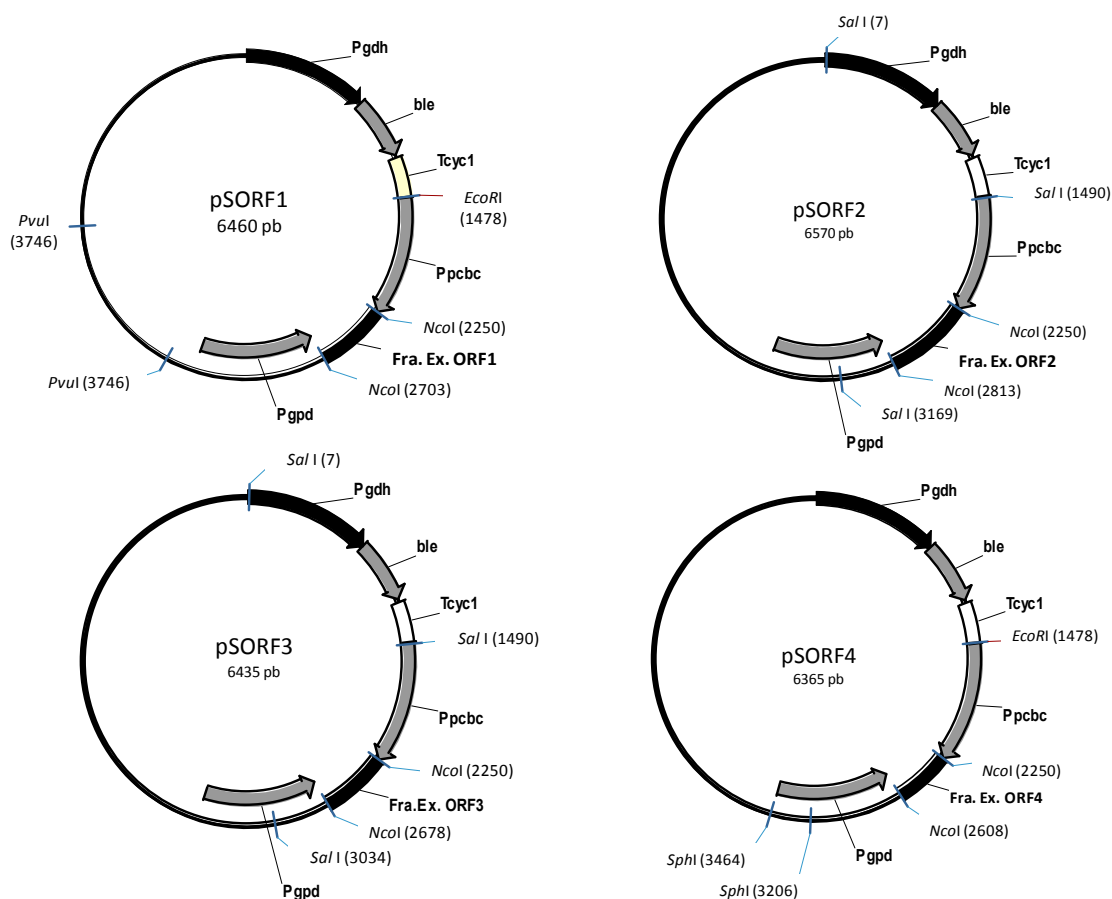
Los fragmentos de ADN obtenidos, de cada una de las PCR realizadas usando como molde el ADN genómico de *P. roqueforti* ATCC 48936 y las parejas de cebadores, fueron digeridos con la enzima *Nco*I. Al hacer la digestión *Nco*I en el fragmento exónico del ORF4 se obtuvo una banda de 343 pb debido al sitio de corte *Nco*I que portaba internamente dicho fragmento.

Cada uno de los fragmentos de ADN se ligó en el sitio de corte *Nco*I del vector pJL43RNAi. Los productos de las ligaciones se transformaron en células competentes de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Apartado 9.2). El ADN plasmídico extraído a partir de las colonias transformantes se digirió con *Nco*I y se seleccionaron los clones que portaban los plásmidos de silenciamiento (Figura 52). Concretamente se utilizaron aquellos en los que, como resultado de la digestión *Nco*I, se obtuvieron los fragmentos correspondientes al inserto amplificado por PCR y al vector pJL43RNAi. Adicionalmente se realizaron otras digestiones de comprobación con al menos dos enzimas de restricción.

Los plásmidos de silenciamiento se usaron para transformar protoplastos obtenidos a partir de micelio de *P. roqueforti* ATCC 48936. Fue necesario optimizar el protocolo de obtención de protoplastos, ya que debido a las características de la cepa de estudio, en los primeros ensayos, no se liberaban los protoplastos. Se ensayaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *P. roqueforti* ATCC 48936, de forma tal que el micelio no formara agregaciones y que no hubiera producción de esporas. También fue importante, que tras los diferentes lavados previos al tratamiento con enzimas líticas, el micelio no se recogiera por filtración y seicara comprimiendo con papeles de filtros, ya que de esta forma se producían agregados de micelio. Este



procedimiento fue sustituido por sedimentación del micelio mediante centrifugaciones. El protocolo de obtención de protoplastos desarrollado en la presente memoria se describe en el Apartado 13.1 de Materiales y Métodos.



**Figura 52.** Esquemas de los plásmidos usados en el silenciamiento de los ORFs de la región  $\lambda$ Ari1. Fra. Ex.: (fragmento exónico).

Los protoplastos de la cepa *P. roqueforti* ATCC 48936 fueron transformados con los plásmidos pSORF1, pSORF2, pSORF3 y pSORF4 por separado siguiendo el citado protocolo. La fleomicina se empleó como marcador de selección, ya que el vector pJL43RNAi contiene el casete de resistencia a este antibiótico, permitiendo la selección de los transformantes.

Los transformantes seleccionados crecieron a una concentración de fleomicina (7  $\mu$ g/ml), concentración que inhibió el crecimiento de los protoplastos no transformados y que por tanto no portaban el vector de silenciamiento.

### 2.2.1 Comprobación de la integración de los plásmidos de silenciamiento en los transformantes obtenidos para cada ORF de la región $\lambda$ Ari1.

La comprobación de la integración del plásmido de silenciamiento en el genoma de los transformantes seleccionados para cada uno de los ORFs se realizó primeramente mediante una PCR de comprobación.

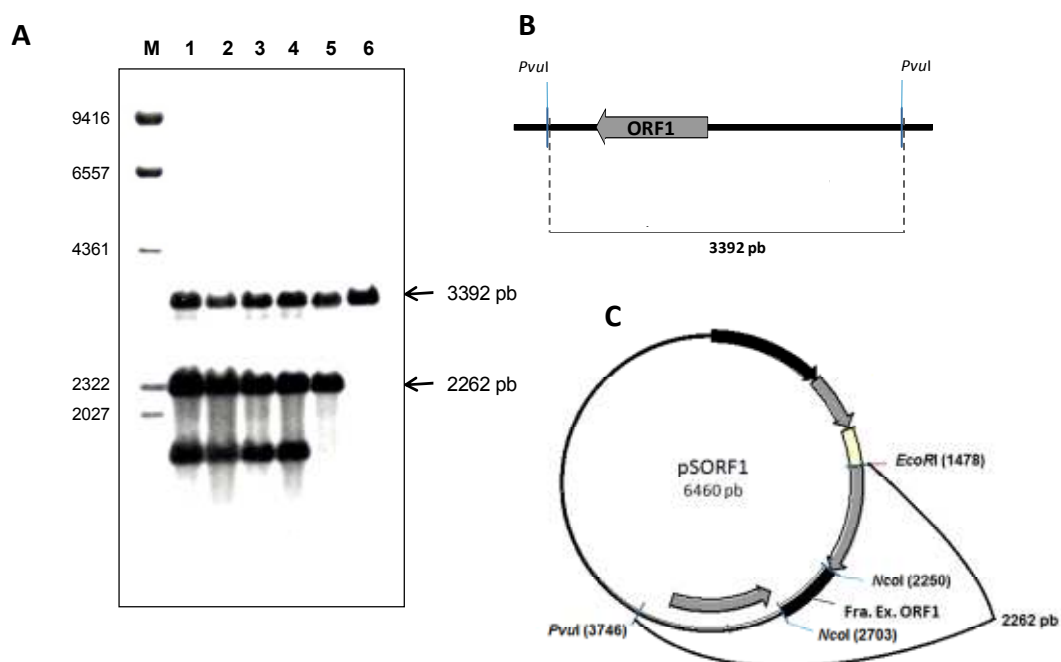
Para la PCR de comprobación se utilizaron como cebadores los siguientes oligonucleótidos FPpcbC (5'-CGGAGAGACGGACGGACGCA) y RPgpda (5'-GCATGCTGCATCGGGAAATCC) los cuales no están presentes en el genoma de *P. roqueforti*. Estos oligonucleótidos permitieron la amplificación de un fragmento que incluye parte de los promotores PpcbC y Pgpda presentes en el vector pJL43RNAi y el fragmento de ADN clonado entre ellos.

En cada réplica de las PCRs se incluyó como control positivo el plásmido de silenciamiento usado en cada caso, y como control negativo el ADN genómico de la cepa parental ATCC 48936. La PCR a partir de cada uno de los plásmidos permitió comprobar el tamaño de la banda correctamente integrada en el genoma. Para los transformantes del ORF1 (Tabla 22) el tamaño esperado fue de 2041 pb (1594pb de los fragmentos de los promotores del plásmido + 447 del inserto exónico del ORF1). Para el resto de los transformantes (Tabla 22) los tamaños esperados fueron de 2064 pb para los tSORF2s y 2016 pb para los tSORF3s. Finalmente en el caso de los tSORF4s el tamaño fue de 1937 pb.

**Tabla 22.** Resultados de las PCRs de comprobación, indicándose el tamaño esperado para las PCR de comprobación de cada ORF del *cluster* de biosíntesis de la toxina PR.

ORF	Tamaño esperado	Transformantes positivos
ORF1	2041 pb (1594 pb pJL43RNAi + 447 pb Fra.Ex.ORF1)	tSORF1-01, tSORF1-02, tSORF1-03, tSORF1-04 y tSORF1-10.
ORF2	2064 pb (1594 pb pJL43RNAi + 470 pb Fra.Ex.ORF2)	tSORF2-01, tSORF2-04, tSORF2-05, tSORF2-07 y tSORF2-13.
ORF3	2016 pb (1594 pb pJL43RNAi + 422 pb Fra.Ex.ORF3)	tSORF3-03, tSORF3-04, tSORF3-08, tSORF3-13, tSORF3-17 y tSORF3-19.
ORF4	1937 pb (1594 pb pJL43RNAi + 343 pb Fra.Ex.ORF4)	tSORF4-01, tSORF4-02, tSORF4-03, tSORF4-04, tSORF4-05, tSORF4-06, tSORF4-07, tSORF4-08 y tSORF4-09, tSORF4-10.

Con los transformantes positivos indicados en la Tabla 22 se realizó un análisis de hibridación de *Southern* para comprobar la correcta integración de los casetes de silenciamiento de los diferentes genes en el genoma de *P. roqueforti*. El ADN genómico fue digerido con las enzimas de restricción que en cada caso permitieron la liberación tanto del ORF endógeno como del inserto integrado en el correspondiente plásmido de silenciamiento. El producto de cada una de las digestiones se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Posteriormente el ADN fue transferido mediante vacío a un filtro de nailon y se fijó al mismo irradiándolo con luz ultravioleta (Apartado 10 de Materiales y Métodos). El ADN ya transferido y fijado a la membrana de nailon se hibridó con una sonda (marcada con digoxigenina) correspondiente al mismo fragmento exónico empleado en la construcción del casete de expresión de ARNs (Figura 52C).



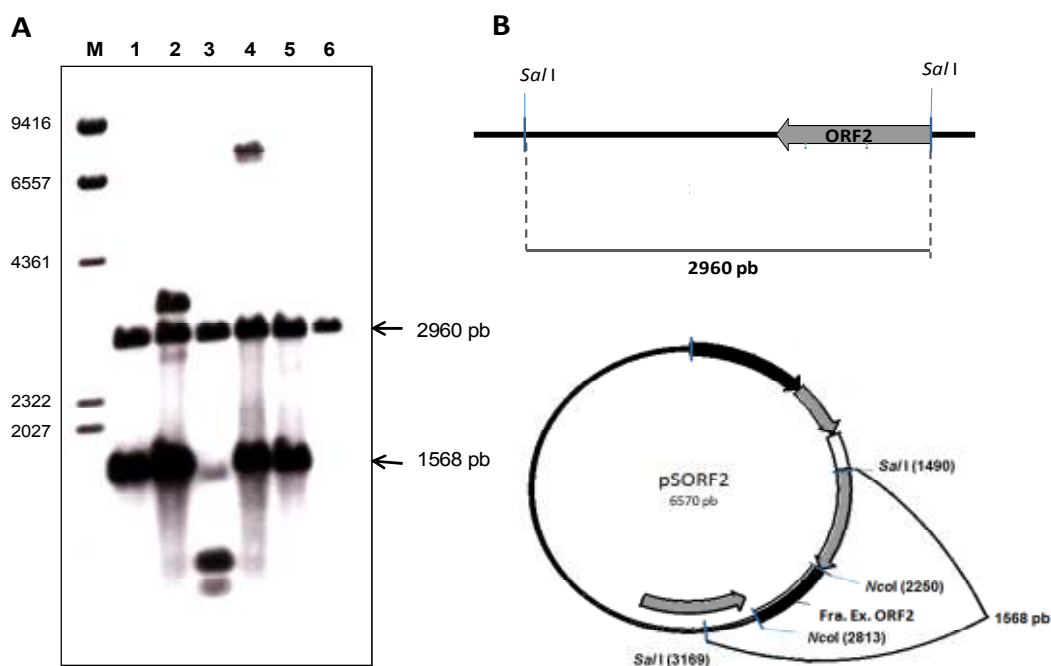
**Figura 53.** Análisis mediante hibridación de *Southern* de los transformantes positivos silenciados en el ORF1. **(A)** Hibridación del ADN total de los 5 transformantes silenciados y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 con el fragmento exónico del ORF1 de 447 pb. M: marcador de peso molecular lambda *Hind*III marcado con digoxigenina; carril 1: tSORF1-01; carril 2: tSORF1-02; carril 3: tSORF1-03; carril 4: tSORF1-04; carril 5: tSORF1-10; carril 6: *P. roqueforti* ATCC 48936. **(B)** Esquema de la región del genoma que contiene el ORF1. **(C)** Esquema del plásmido pSORF1 mostrando los sitios de restricción *Nco*I que libera la sonda de 447 pb y *Pvu*I y *Eco*RI, que liberan el casete de silenciamiento del ORF1.

La digestión de los transformantes silenciados en el ORF1 se realizó con las enzimas *Pvu*I y *Eco*RI. El resultado de la hibridación de *Southern* mostró que la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 presenta una única banda de hibridación de

aproximadamente 3392 pb (Figura 53A, carril 6), correspondiente al gen endógeno tras la digestión con PvuI (Figura 53B). La misma banda de hibridación aparece en todos los transformantes analizados, lo que indica que en estos el gen endógeno correspondiente al ORF1 se mantiene intacto. Además, en estos transformantes (Figura 53A, carriles del 1 al 5) aparece una banda de hibridación adicional de 2262 pb que corresponde a la correcta integración del casete de expresión de ARNs del ORF1 sin reorganización alguna (Figura 53C).

Todos los transformantes silenciados en el ORF1 a los que se les realizó el análisis de hibridación de *Southern* resultaron positivos.

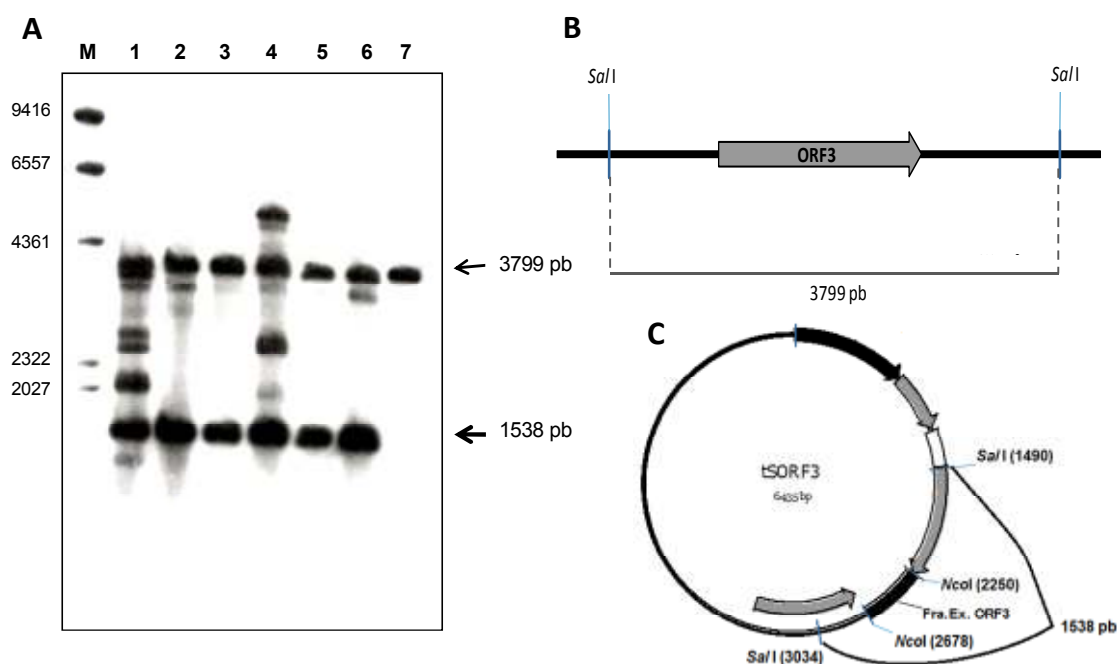
En la misma línea los 5 transformantes del ORF2 positivos a la PCR de comprobación junto con la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 fueron digeridas con la enzima de restricción *SalI* y se siguió el protocolo descrito en el Apartado 11 de Materiales y Métodos. El fragmento exónico del ORF2, usado en la construcción del plásmido, se marcó con digoxigenina y fue usado como sonda en la hibridación de *Southern*.



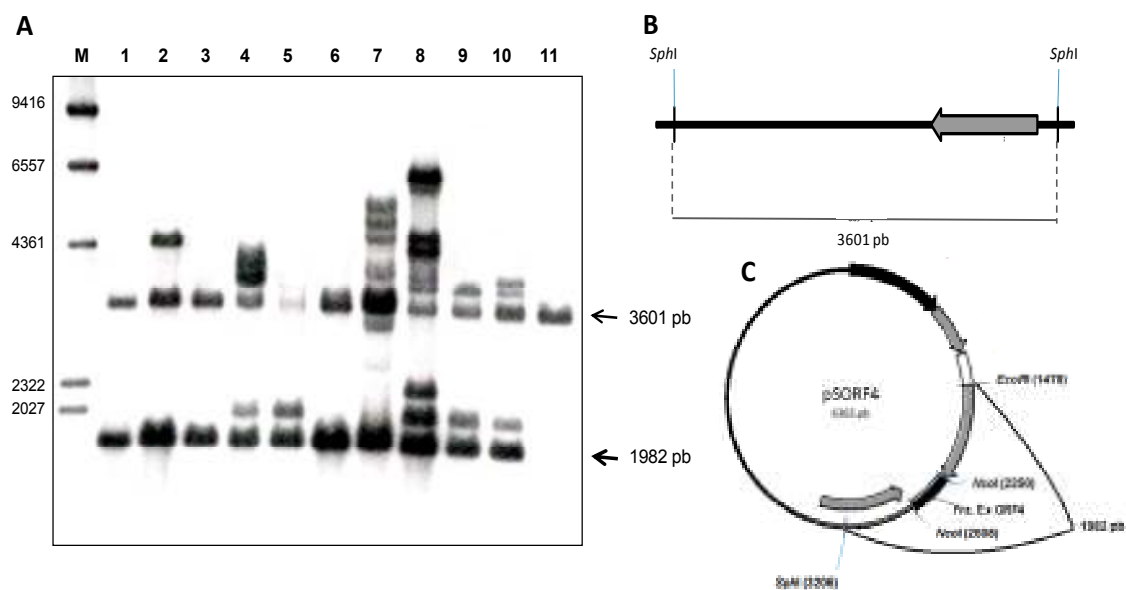
**Figura 54.** Análisis mediante hibridación de *Southern* de los transformantes positivos silenciados en el ORF2. **(A)** Hibridación del ADN total de los 5 transformantes silenciados en el ORF2 y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 con el fragmento exónico del ORF2 de 470 pb. M: marcador de peso molecular lambda *HindIII* marcado con digoxigenina; carril 1: tSORF2-01; carril 2: tSORF2-04; carril 3: tSORF2-05; carril 4: tSORF2-07; carril 5: tSORF2-13; carril 6: *P. roqueforti* ATCC 48936. **(B)** Esquema de la región del genoma que contiene al ORF2. **(C)** Esquema del plásmido pSORF2 mostrando los sitios de restricción *NcoI* que libera la sonda de 470 pb y *SalI*, que libera el casete de silenciamiento del ORF2.

Los resultados de la hibridación muestran una banda de 2960 pb correspondiente al gen endógeno (Figura 54B), que apareció en solitario en la cepa parental (Figura 54A carril 6). La banda de hibridación que indica la correcta integración del casete de expresión de ARNs del ORF2 (Figura 54C), en los transformantes silenciados en la expresión del ORF2, tiene un tamaño de 1568 pb. Todos los transformantes resultaron positivos (Figura 54A, carriles 1, 2, 4 y 5) salvo el transformante tSORF2-05 (Figura 54A, carril 3) cuyas bandas adicionales indican que la integración del casete de silenciamiento es incorrecta.

En el caso del silenciamiento del ORF3 (Figura 55) los ADNs genómicos de los transformantes y la cepa parental fueron digeridos con la enzima de restricción *SalI*. Tras la hibridación de *Southern* la banda de hibridación correspondiente al gen endógeno de 3799 pb (Figura 55B) aparece en la cepa parental (Figura 55A, carril 7) y en todos los transformantes silenciados (Figura 55A, carriles del 1 al 6). La banda de hibridación correspondiente a la correcta integración del casete de silenciamiento del ORF3 (Figura 55C) apareció en todos los transformantes evaluados (Figura 55A, carriles del 1 al 6).



**Figura 55.** Análisis mediante hibridación de *Southern* de los transformantes positivos silenciados en el ORF3. **(A)** Hibridación del ADN total de los transformantes silenciados en el ORF3 y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 con el fragmento exónico del ORF3 de 422 pb. M: marcador de peso molecular lambda *HindIII* marcado con digoxigenina; carril 1: tSORF3-03; carril 2: tSORF3-04; carril 3: tSORF3-08; carril 4: tSORF3-13; carril 5: tSORF3-17; carril 6: tSORF3-19; carril 7: *P. roqueforti* ATCC 48936. **(B)** Esquema de la región del genoma que contiene al ORF3. **(C)** Esquema del plásmido pSORF3 mostrando los sitios de restricción *NcoI* que libera la sonda de 422 pb y *SalI*, que libera el casete de silenciamiento del ORF3.



**Figura 56.** Análisis mediante hibridación de *Southern* de los transformantes positivos silenciados en el ORF4. **(A)** Hibridación del ADN total de los transformantes silenciados en el ORF4 y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 con el fragmento exónico del ORF4 de 343 pb. M: marcador de peso molecular lambda *Hind*III marcado con digoxigenina; carril 1: tSORF4-01; carril 2: tSORF4-02; carril 3: tSORF4-03; carril 4: tSORF4-04; carril 5: tSORF4-05; carril 6: tSORF4-06; carril 7: tSORF4-07; carril 8: tSORF4-08; carril 9: tSORF4-09; carril 10: tSORF4-10; carril 11: *P. roqueforti* ATCC 48936. **(B)** Esquema de la región del genoma que contiene al ORF4. **(C)** Esquema del plásmido pSORF4 mostrando los sitios de restricción *Nco*I que libera la sonda de 343 pb y *Sph*I y *Eco*RI, que liberan el casete de silenciamiento del ORF4.

Finalmente en el proceso de silenciamiento del ORF4, al transformar los protoplastos de *P. roqueforti* ATCC 48936 con el plásmido pSORF4, se obtuvieron 10 cepas resistentes al marcador de selección, que a su vez dieron positivo a la PCR de comprobación de la integración del casete de silenciamiento del OR4.

Para el análisis de hibridación de *Southern* los transformantes junto con la cepa parental se digirieron con las enzimas *Sph*I y *Eco*RI. En la cepa parental (Figura 56A, carril 11) aparece una única banda de hibridación de aproximadamente 3,6 Kb la cual se corresponde con el gen endógeno (Figura 56B). En los transformantes silenciados, además de la banda del gen endógeno, aparece una banda de hibridación de aproximadamente 1982 pb (Figura 56A, carril 1 al 10), la cual se corresponde con la correcta integración del casete de silenciamiento del ORF4 (Figura 56C).

### 2.3 Estudio de expresión de los ORFs del cluster de biosíntesis de la toxina PR en los transformantes silenciados.

Para comprobar el silenciamiento de los ORFs del *cluster* de biosíntesis de la toxina PR en los transformantes se realizaron estudios de RT-PCR semicuantitativa (Apartado 15.3 de Materiales y Métodos) con los ARNs extraídos de dos transformantes seleccionados al azar de cada ORF y de la cepa parental. Como control se utilizó el gen *actA* que tiene una expresión constitutiva en *P. roqueforti*.

El ARN total se extrajo a partir de cultivos de 13 días de incubación en medio arroz (Apartado 15.1 de Materiales y Métodos) medio con el que se evaluó la producción de toxina PR. La extracción de ARN presentó la dificultad de que el hongo crece sobre los granos de arroz, siendo imposible la separación del micelio para la extracción de ARN. Por tanto la extracción de ARN se realizó de una mezcla de los granos de arroz, el micelio del microorganismo y sus esporas. Las concentraciones de ARN obtenidas eran bajas y con alta contaminación con ADN, razón por que se requirió hacer un doble tratamiento con ADNsas (Apartado 15.2 de Materiales y Métodos)

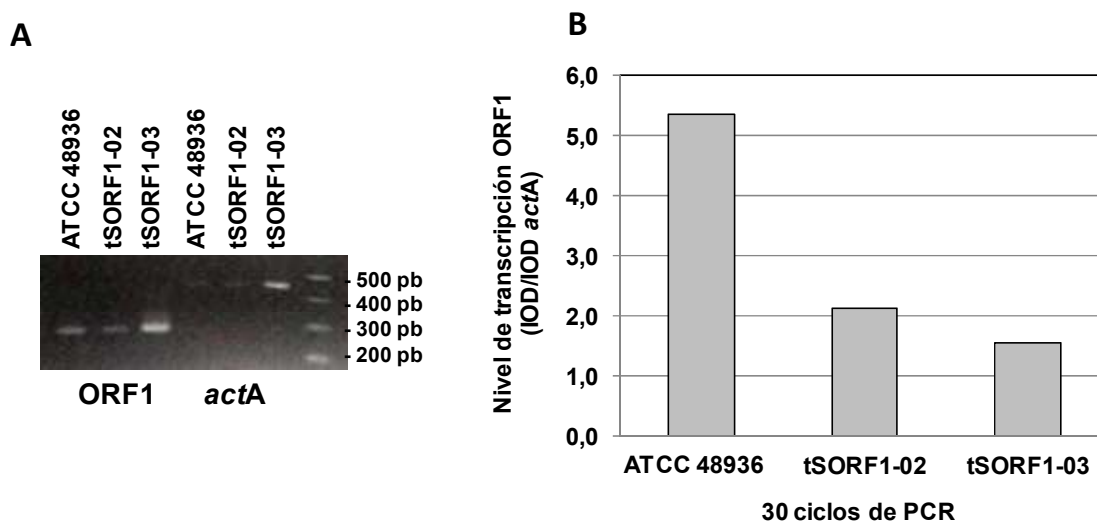
Se realizaron varias RT-PCRs para determinar en cuál de los ciclos de amplificación se podían observar diferencias significativas de expresión de los ORFs de interés (partiendo de la misma concentración de ARN total) entre los transformantes y la cepa parental pero sin saturar la PCR. Finalmente se establecieron 30 ciclos para el ORF1, ORF3 y ORF4 y 35 para el ORF2.

Los oligonucleótidos usados para la realización de las RT-PCRs así como los tamaños de bandas de ADNc esperados se muestran en la Tabla 23.

Los productos de la RT-PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las bandas de ADNc se visualizaron tiñéndose los geles con bromuro de etidio y fueron fotografiados. Las señales resultantes de la RT-PCR fueron cuantificadas por densitometría usando el programa *Gel-Pro Analyzer 3.1* y normalizado con los valores obtenidos de la expresión del gen constitutivo *actA* (sometiéndolo al mismo número de ciclos de PCR).

**Tabla 23.** Oligonucleótidos empleados en el análisis mediante RT-PCR de los ORFs del *cluster* de biosíntesis de toxina PR en los transformantes silenciados. Se muestra el tamaño de la banda tras la amplificación del ADN y del ADNc por PCR.

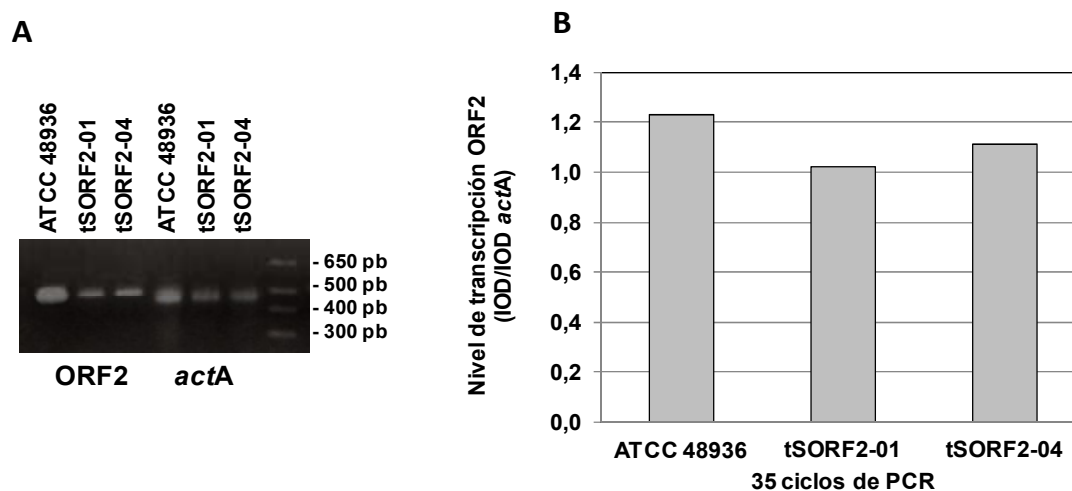
ORF analizada	Oligonucleótidos	Tamaño amplificado de ADN por PCR	Tamaño amplificado de ADNc por PCR
<i>actA</i>	RT/ <i>actA</i> -F RT/ <i>actA</i> -R	526 pb	457 pb
ORF1	INT01-1F INT01-1R	335 pb	293 pb
ORF2	INT02-1F INT02-1R	548 pb	498 pb
ORF3	INT03-3F INT03-3R	401 pb	351 pb
ORF4	ATORF4F ATORF4R	502 pb	502 pb



**Figura 57.** RT-PCR semicuantitativa de la expresión del ORF1 en los transformantes tSORF1-02, tSORF1-03 y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz. **(A)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR del ORF1 y del gen *actA* de los transformantes silenciados y la cepa parental. **(B)** Cuantificación de la expresión del ORF1 en las cepas ATCC 48936, tSORF1-02 y tSORF1-03 normalizado con la expresión del gen *actA* en cada uno de ellos.

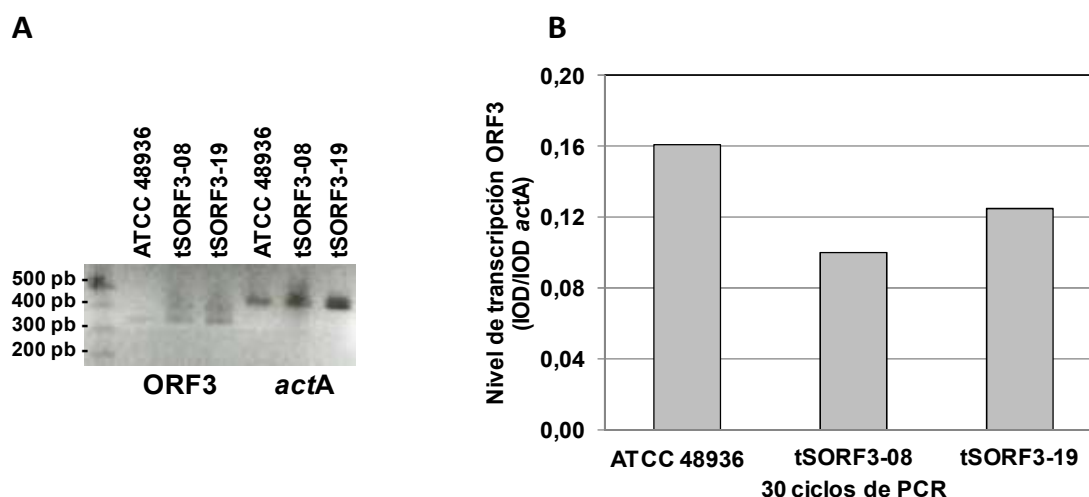
La expresión del ORF1 en los transformantes tSORF1-02 y tSORF1-03 se ve disminuida en un 60% y 71% respectivamente con respecto a la expresión en la cepa parental (Figura 57B). Sin embargo, en los transformantes silenciados en el ORF2 (Figura 58) la reducción de la expresión fue de 17% en tSORF2-01 y de sólo un 10% en tSORF2-04 (Figura 58B).





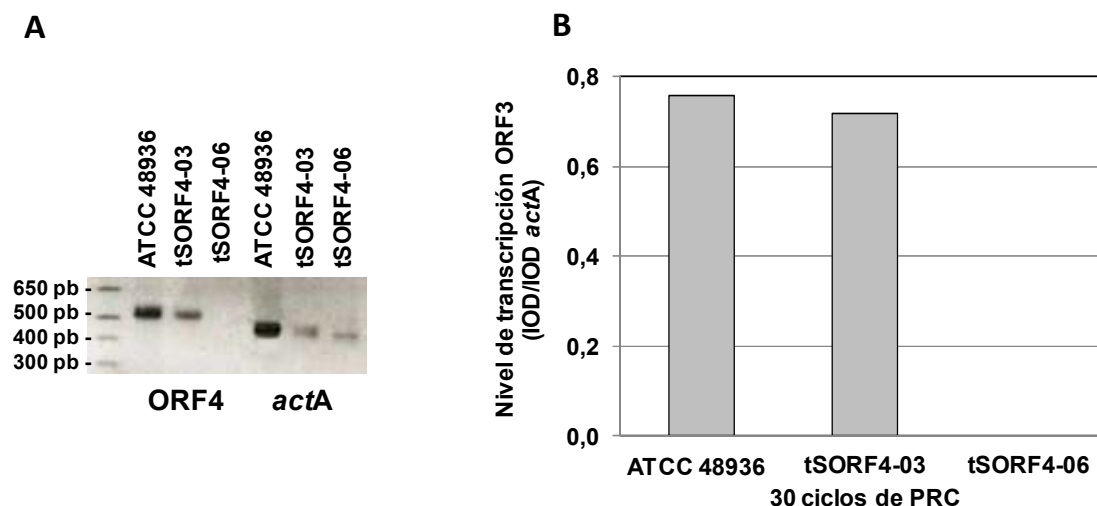
**Figura 58.** Estudio de la expresión del ORF2 mediante RT-PCR semicuantitativa en los transformantes tSORF2-01, tSORF2-04 y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz. **(A)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR del ORF2 y del gen *actA* de los transformantes silenciados y la cepa parental. **(B)** Cuantificación de la expresión del ORF2 en las cepas ATCC 48936, tSORF2-01 y tSORF2-04 normalizado con la expresión del gen *actA* en cada uno de ellos.

En el caso de los transformantes tSORF3-08 y tSORF3-19 la reducción de la expresión del ORF3 con respecto a la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936, es de un 37% y 22% respectivamente (Figura 59).



**Figura 59.** Estudio de la expresión del ORF3 mediante RT-PCR semicuantitativa en los transformantes tSORF3-08, tSORF3-19 y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz. **(A)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR del ORF3 y del gen *actA* de los transformantes silenciados y la cepa parental. **(B)** Cuantificación de la expresión del ORF3 en las cepas ATCC 48936, tSORF3-08 y tSORF3-19 normalizado con la expresión del gen *actA* en cada uno de ellos.

Finalmente el estudio del nivel de silenciamiento del ORF4 muestra que en el transformante tSORF4-03 la reducción en la expresión fue sólo de un 5%. Sin embargo en el tSORF4-06 no se observó expresión alguna de la ORF4, siendo por tanto la reducción de un 100% (Figura 60).



**Figura 60.** Estudio de la expresión del ORF4 mediante RT-PCR semicuantitativa en los transformantes tSORF4-03, tSORF4-06 y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 a los 13 días de incubación en medio arroz. **(A)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR del ORF4 y del gen *actA* de los transformantes silenciados y la cepa parental. **(B)** Cuantificación de la expresión del ORF4 en las cepas ATCC 48936, tSORF4-03 y tSORF4-06 normalizado con la expresión del gen *actA* en cada uno de ellos.

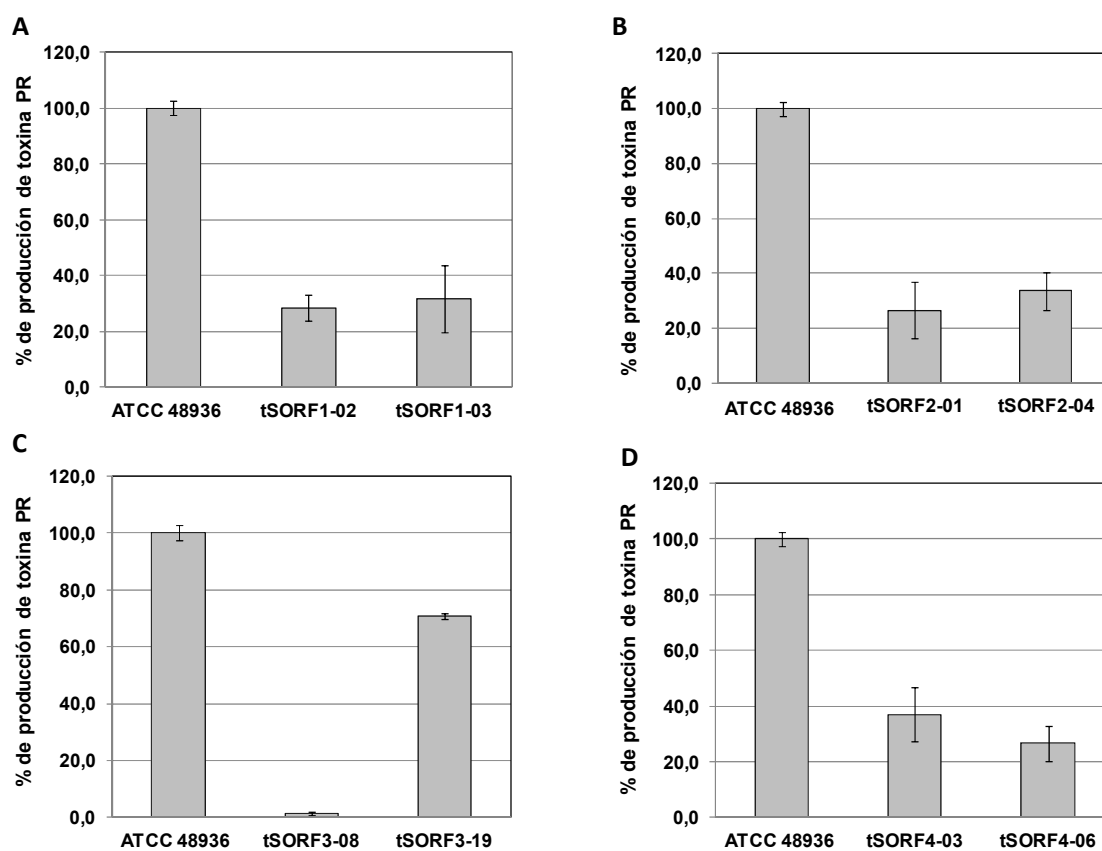
#### 2.4 Evaluación de la producción de toxina PR y ácido micofenólico de la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 y los transformantes silenciados en el ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4.

La falta de patrón de toxina PR llevó a cuantificar la producción de los transformantes silenciados normalizándola con respecto a los valores de producción de la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936. Los cultivos se realizaron en medio de arroz a 24°C durante 15 días con dos experimentos de tres replicas cada uno. Se calculó el tanto porcentaje que representa el área de pico de toxina PR de cada réplica tomado como 100% la media de las áreas de los pico de toxina PR de *P. roqueforti* ATCC 48936 en cada experimento.

La producción relativa de toxina PR en los transformantes silenciados en el ORF1, ORF2 y ORF4 se comportó de forma homogénea produciéndose, en todos los casos,

una reducción entre el 65% y el 75% con respecto a la cepa parental (Figura 61A, B y D).

Los transformantes silenciados en el ORF3 mostraron un comportamiento desigual. En ambos transformantes hay una reducción de la producción con respecto a *P. roqueforti* ATCC 48936, pero mientras en la cepa tSORF3-19 la reducción fue de un 30%, en tSORF3-08 la producción de toxina PR fue casi nula con una reducción media del 99% (Figura 61D).



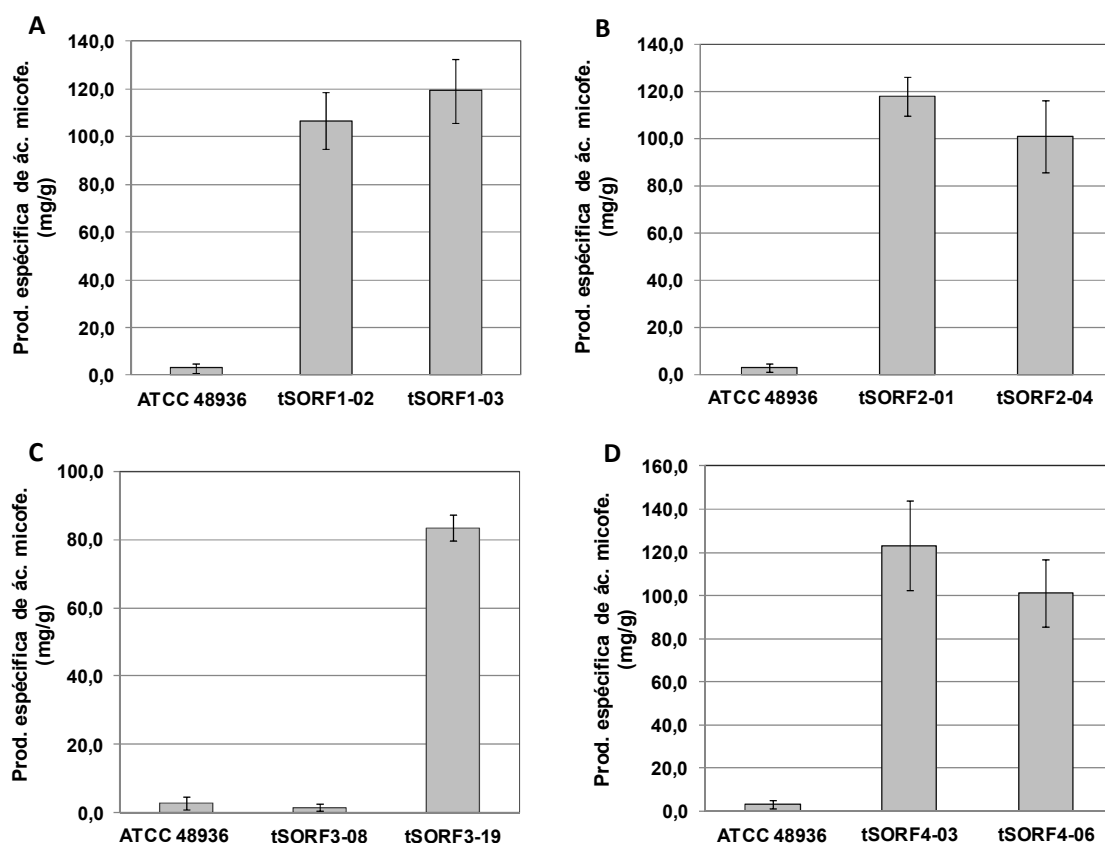
**Figura 61.** Producción relativa de toxina PR de los transformantes silenciados en el ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4 con respecto a la cepa *P. roqueforti* ATCC 48936. **(A)** Producción relativa de toxina PR de tSORF1-02 y tSORF1-03; **(B)** tSORF2-01 y tSORF2-04; **(C)** tSORF3-08 y tSORF3-19 y **(D)** tSORF4-03 y tSORF4-06.

Además de la producción de toxina PR, se decidió evaluar la producción específica de ácido micofenólico debido al significativo incremento de su producción en los transformantes silenciados en cada una de los ORFs y a la importancia que tiene este metabolito secundario tal y como se indicó en la introducción.

La producción específica de ácido micofenólico, al igual que la producción de toxina PR, se comportó de forma relativamente homogénea en los transformantes

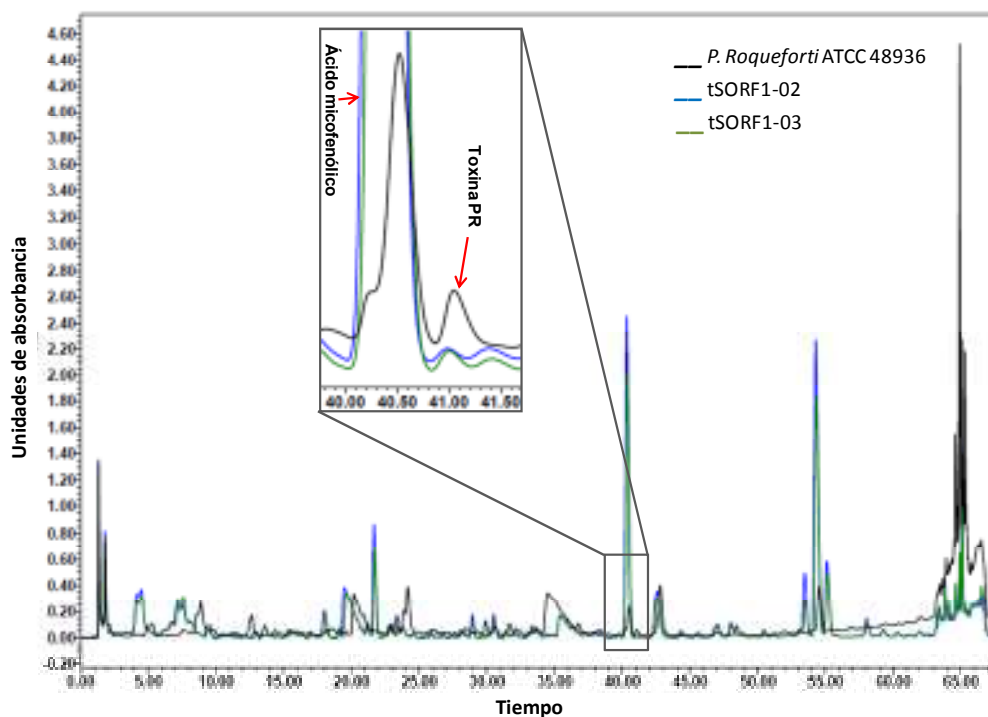
silenciados en el ORF1, ORF2 y ORF4 (Figura 62A, B y D). El incremento en la producción específica en los transformantes fue de 30 a 40 veces con respecto a la producción de la cepa control *P. roqueforti* ATCC 48936.

En los transformantes silenciados en el ORF3 la producción de ácido micofenólico también se comportó de forma diferente (Figura 62C). Mientras en la cepa tSORF3-08 la producción se redujo a la mitad, la producción en tSORF3-19 fue 28 veces superior a la producción de la cepa parental.

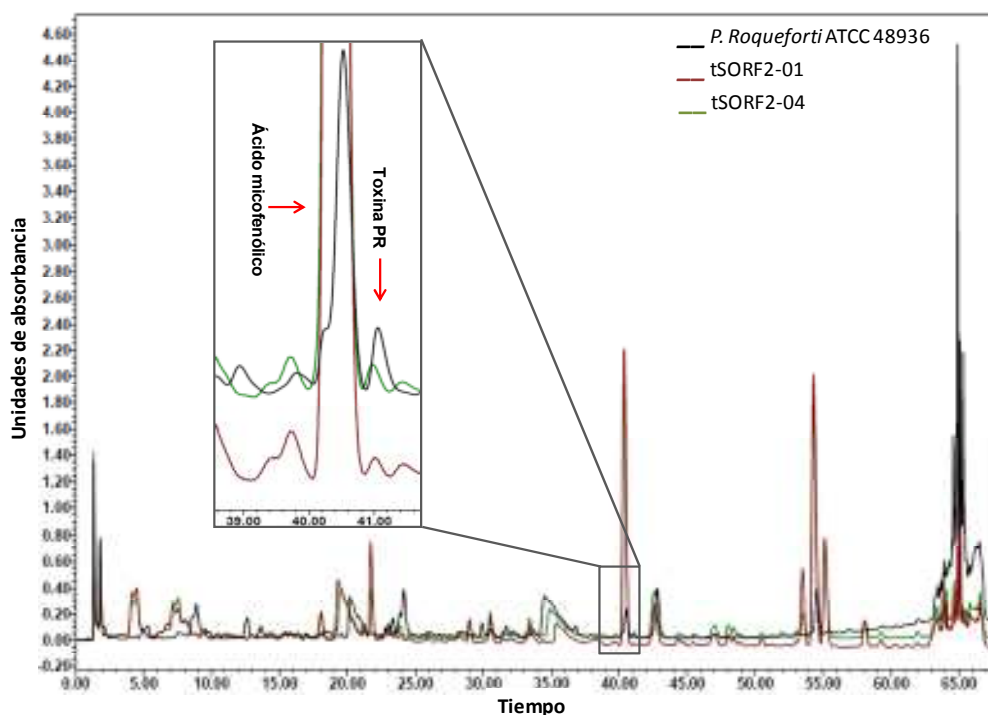


**Figura 62.** Producción específica de ácido micofenólico en la cepa parental *P. roqueforti* CECT ATCC 48936 y en los transformantes silenciados en el ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4. **(A)** Producción específica de ácido micofenólico en tSORF1-02 y tSORF1-03; **(B)** tSORF2-01 y tSORF2-04; **(C)** tSORF3-08 y tSORF3-19 y **(D)** tSORF4-03 y tSORF4-06.

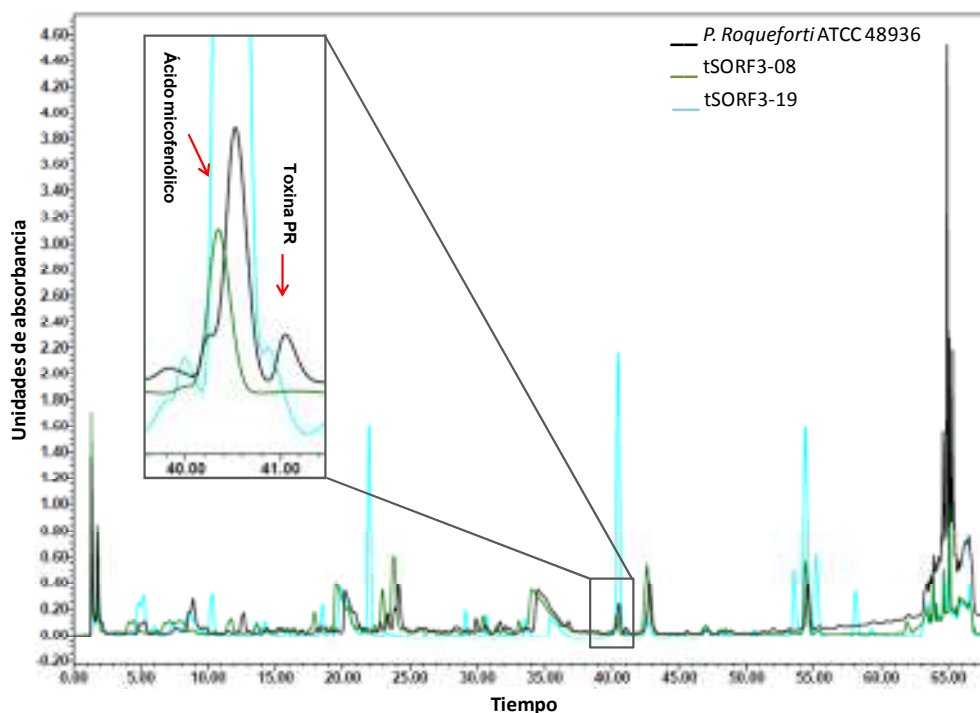
En las Figura 63 a la 67 se muestran las comparativas de los cromatogramas realizados a los extractos crudos de los transformantes silenciados en cada ORF de la agrupación génica de biosíntesis de toxina PR. Se amplía la zona en que eluyen el ácido micofenólico y la toxina PR.



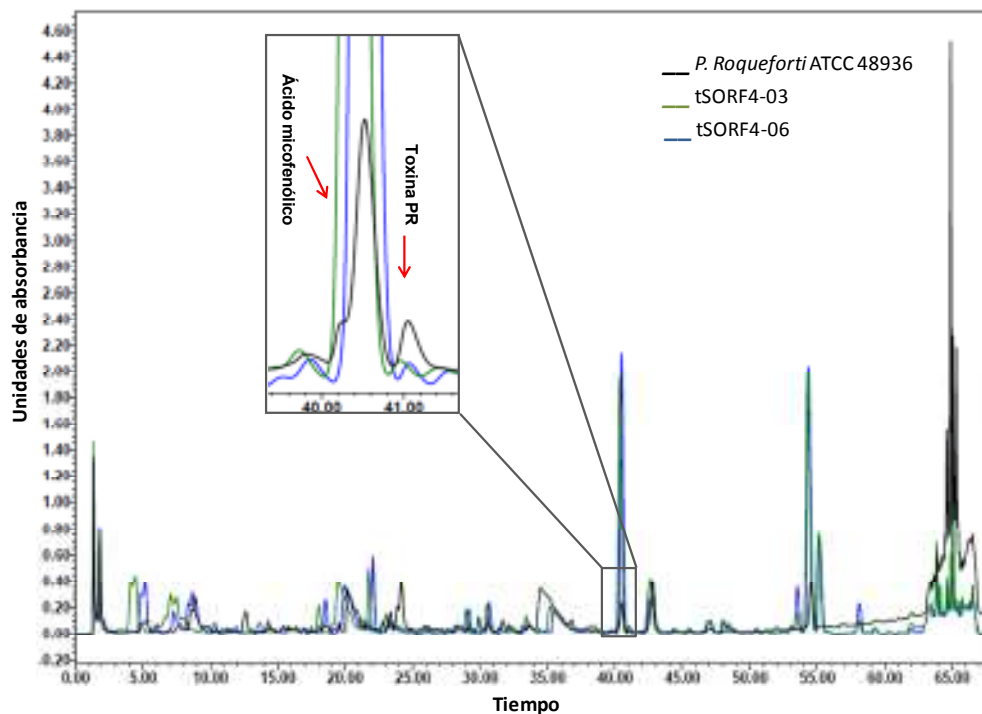
**Figura 63.** Cromatograma de los extractos crudos de *P. roqueforti* ATCC 48936 (-) y los transformantes tSORF1-02 (-) y tSORF1-03 (-) cultivados en medio arroz.



**Figura 64.** Cromatograma de los extractos crudos de *P. roqueforti* ATCC 48936 (-) y los transformantes tSORF2-01 (-) y tSORF2-04 (-) cultivados en medio arroz.



**Figura 65.** Cromatograma de los extractos crudos de *P. roqueforti* ATCC 48936 (-) y los transformantes tSORF3-08 (-) y tSORF3-19 (-) cultivados en medio arroz.



**Figura 66.** Cromatograma de los extractos crudos de *P. roqueforti* ATCC 48936 (-) y los transformantes tSORF4-03 (-) y tSORF4-06 (-) cultivados en medio arroz.

### 3. Estudio comparativo del metaboloma de *P. roqueforti* ATCC 48936 y los transformantes tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08 y tSORF4-03.

Además de estudiar la producción de los metabolitos secundarios toxina PR y ácido micofenólico en los transformantes silenciados y en la cepa parental mediante HPLC de fase reversa, se seleccionó al azar una cepa silenciada en cada una de los ORF y la cepa *P. roqueforti* ATCC 48936 para realizar un estudio comparativo del metaboloma mediante UPLC-QtoF-MS.

Para el estudio comparativo de los mutantes seleccionados y la cepa parental la separación cromatográfica se utilizó una columna de fase reversa, tipo HSS T3 con 1,8  $\mu\text{m}$  diámetro de partícula y dimensiones de 2,1 x 100 mm. La composición y el gradiente de la fase móvil se describen en la Tabla 24. El flujo fue de 0,3 ml/min en modo isocrático a. Cada muestra se analizó con ionización en positivo (ESI+) (Figura 67) y en negativo (ESI-) (Figura 68).

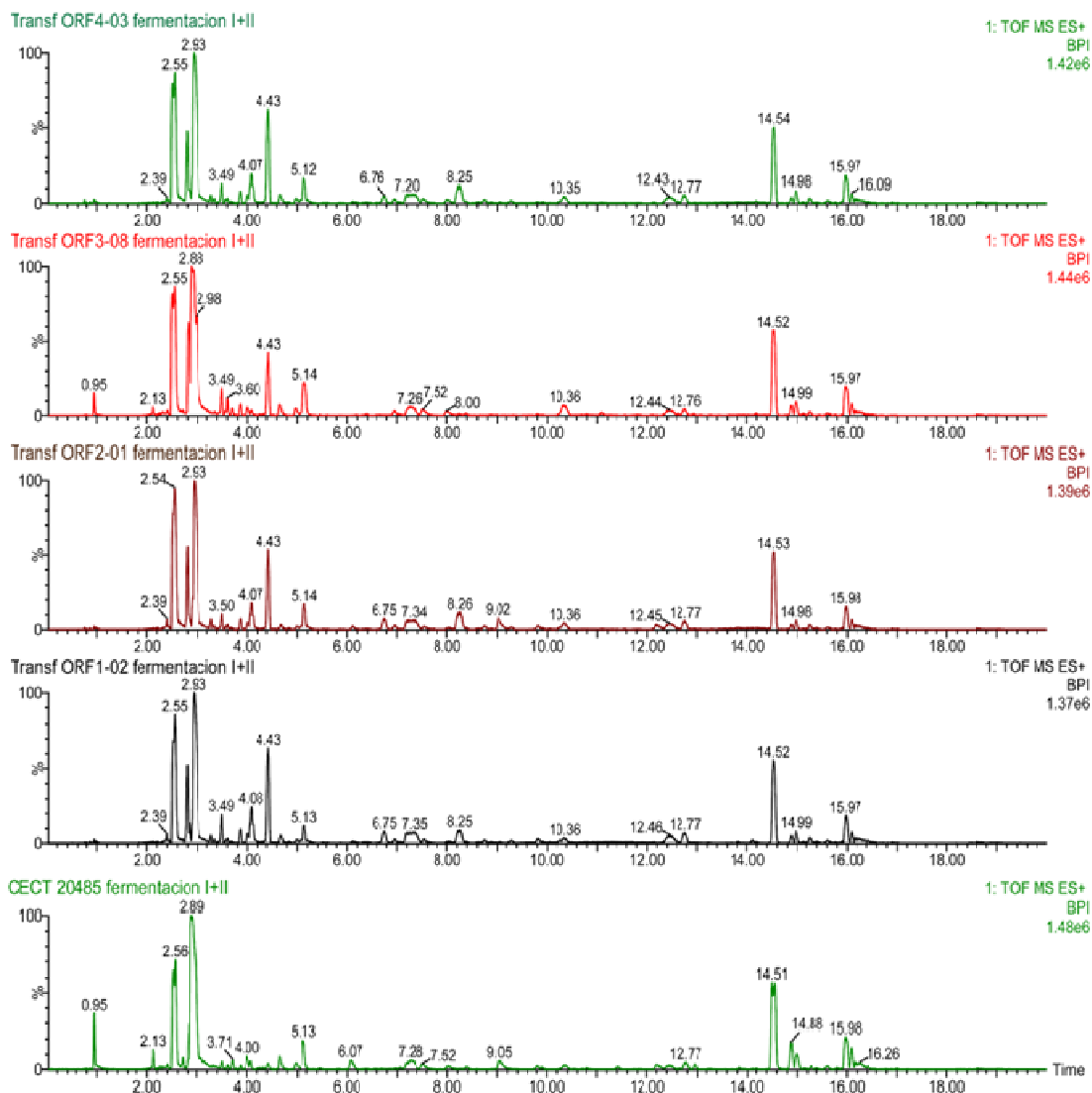
**Tabla 24.** Gradiente de elución utilizado en el análisis de las muestras por UPLC.

Tiempo	% Solvente A	% Solvente B
0	95	5
0,42	95	5
2,02	50	50
16,50	2	98
17,50	2	98
19,00	95	5
20,00	95	5

**Nota:** Como solvente A se utilizó 0,1% de ácido fórmico en H<sub>2</sub>O calidad milli-Q y como solvente B acetonitrilo al 100%.

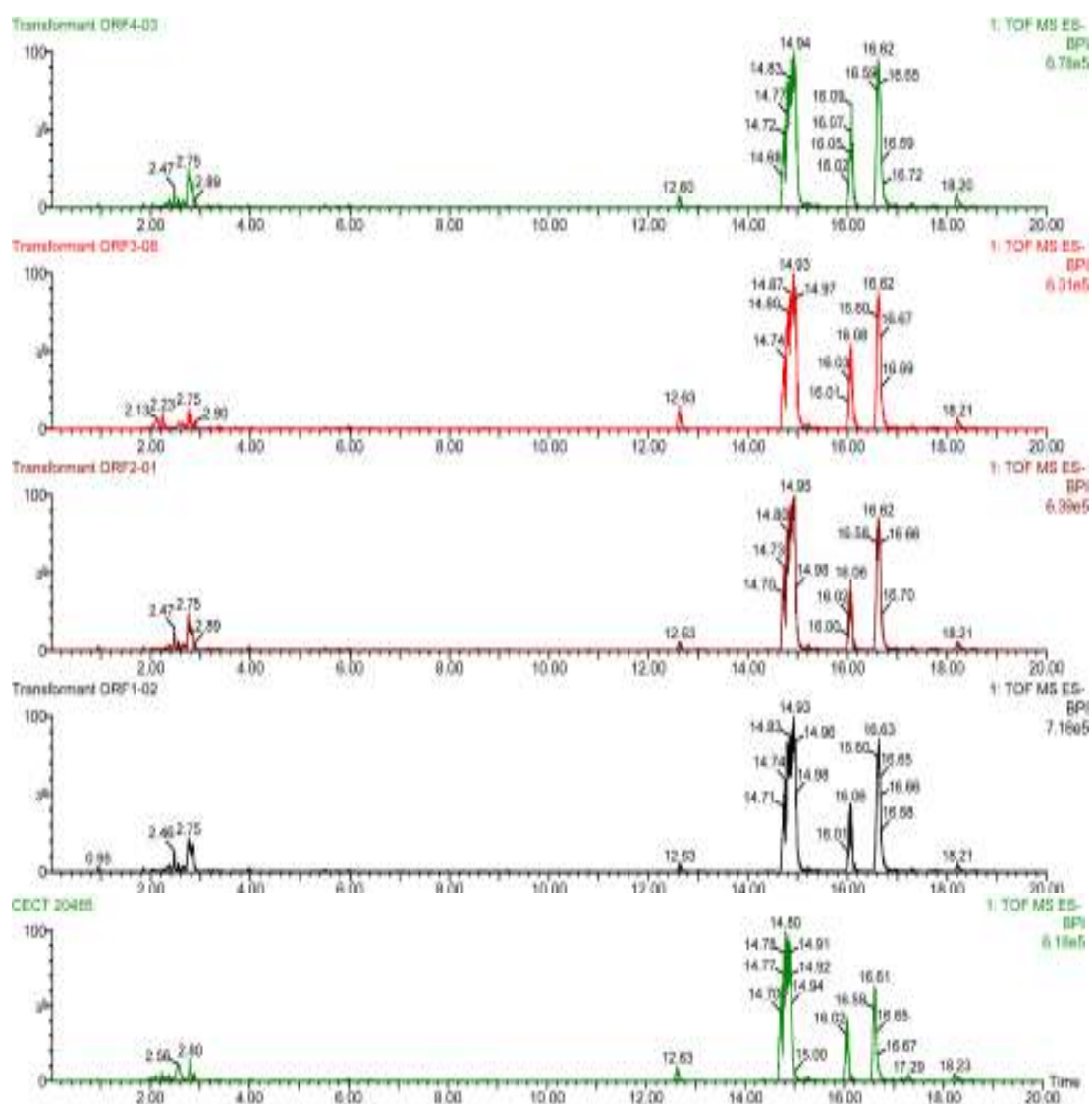
Se realizó un análisis por componentes principales (PCA) de los datos obtenidos con un método con ionización en positivo de las muestras, un rango de masas de 100-700 Da y hasta 17 min, sin embargo no se logró la separación de las muestras. Al realizar un análisis discriminante basado en el método de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se lograron separar las muestras según las variables latentes 1 y 6

(Figura 69A). Con componentes 2-6 y 3-6 también se logran separar, pero con más dispersión de las réplicas. Al variar las condiciones del método de análisis limitando las masas a 500 Da y 9,5 min se obtienen similares resultados: no se logran separar las muestras realizando análisis de PCA y sí con PLS-DA (Figura 69B).



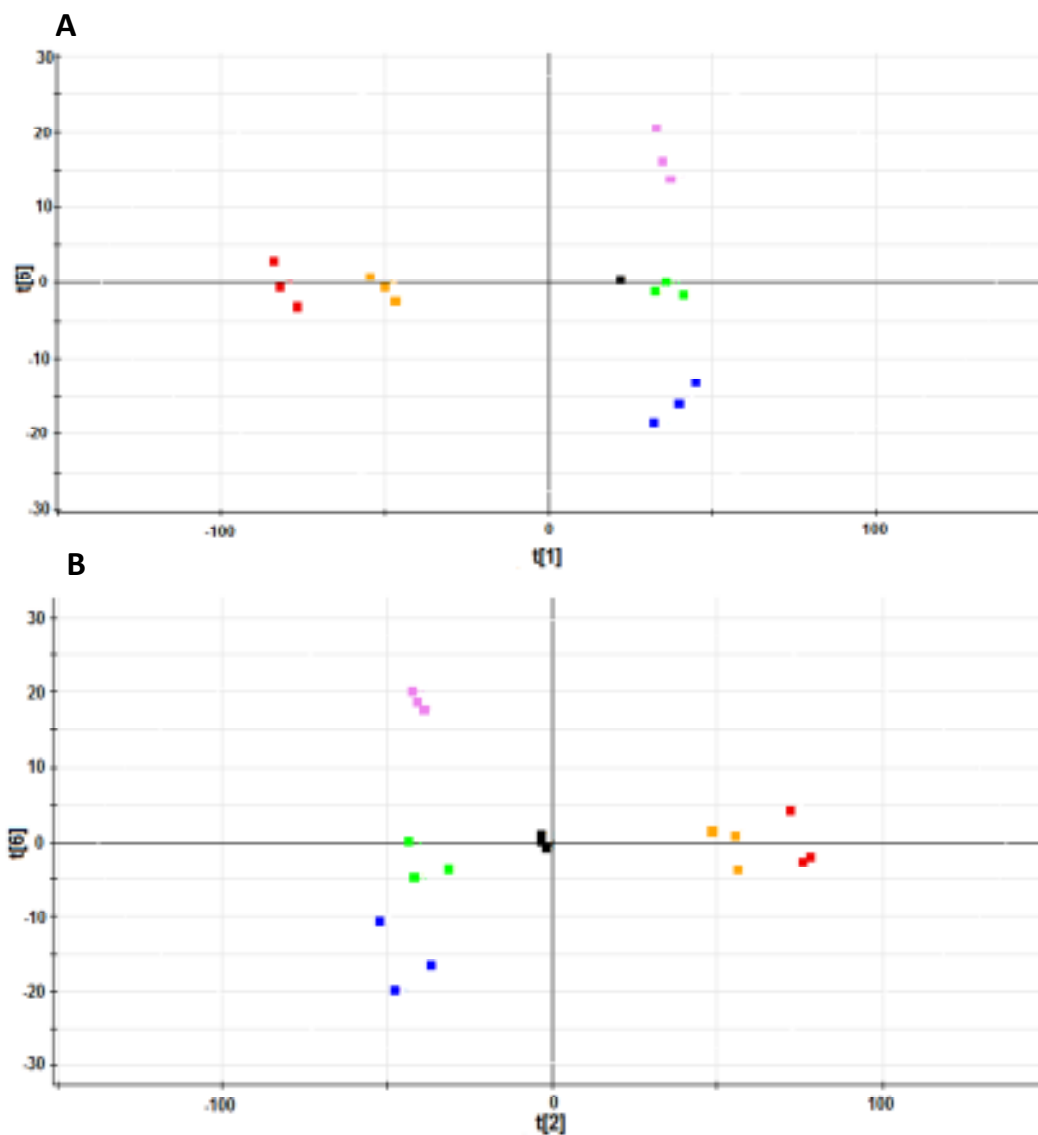
**Figura 67.** Cromatogramas tipo para cada muestra analizada con ionización en positivo. De abajo hacia arriba: *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08, tSORF4-03.





**Figura 68.** Cromatogramas tipo para cada muestra analizada con ionización en negativo. De abajo hacia arriba: *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08, tSORF4-03.

Los extractos procedentes de la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 y del transformante tSORF3-08 se diferencian de los demás por la componente horizontal, mientras que las diferencias entre los extractos de tSORF1-02, tSORF2-01 y tSORF4-03 se establecen a través de la componente vertical.



**Figura 69.** Análisis discriminante basado en mínimos cuadrados parciales (PSL-DA) **(A)** Método en positivo, con masas entre 100-700 Da y tiempo entre 0-17 min. **(B)** Método en positivo, con masas entre 0-500 Da y tiempo entre 0-9,5 min. *P. roqueforti* ATCC 48936 (■), tSORF1-02 (■), tSORF2-01 (■), tSORF3-08 (■), tSORF4-03 (■), blanco (■)

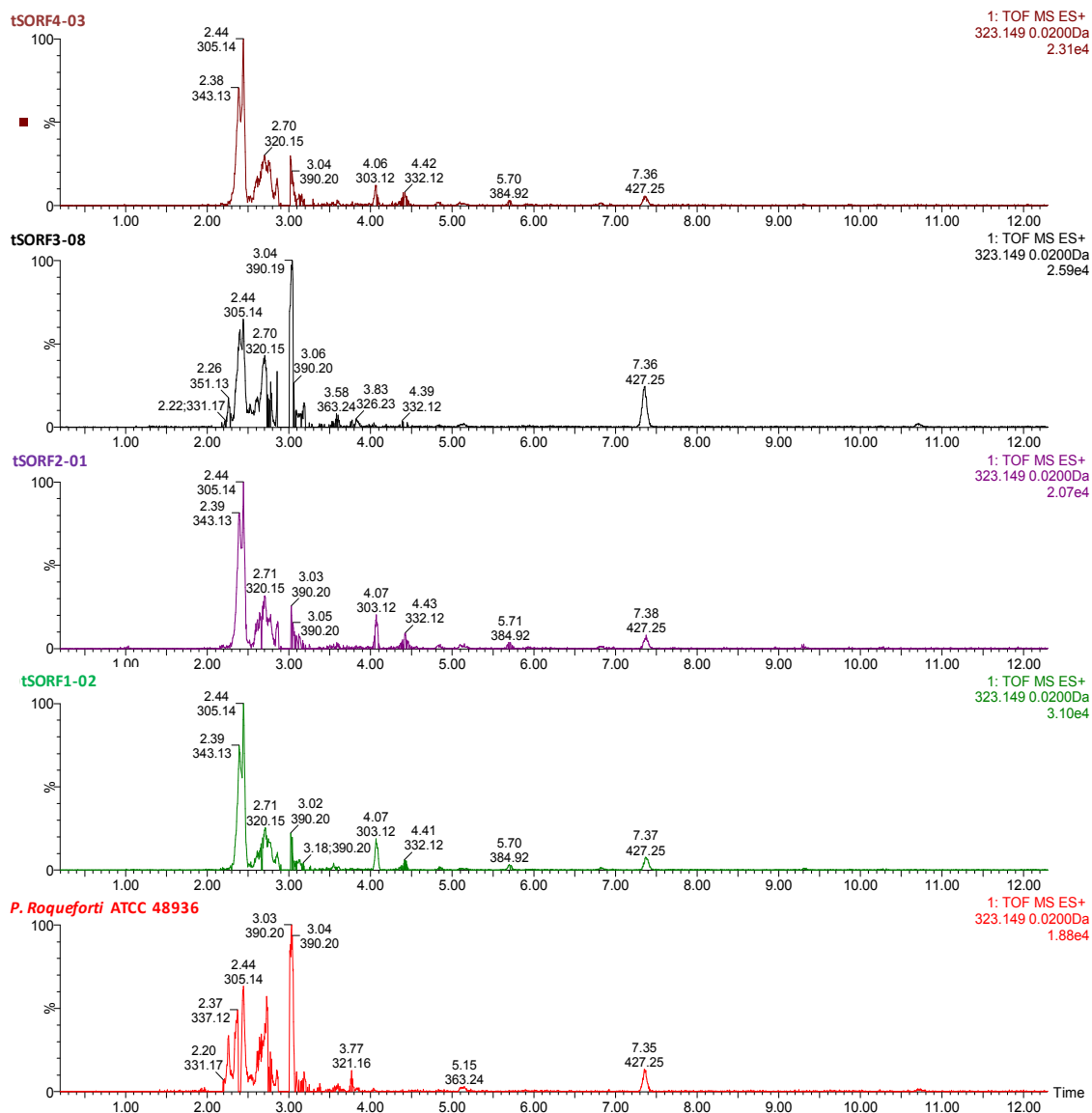
Además del estudio comparativo del metaboloma de los transformantes silenciados y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936, se identificaron y se comparó la producción de los compuestos intermedios de la toxina PR (Tabla 25).

**Tabla 25.** Datos de los compuestos intermediarios de la biosíntesis de la toxina PR.

Compuesto	Composición elemental	Masa exacta	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
Aristologueno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,1878	205,1956	227,1776
Eremofortina B	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	248,1412	249,1491	271,1320
DAC-Eremofortina A	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264,1362	265,1440	287,1259
Eremofortina A	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	306,1467	307,1545	329,1365
Eremofortina C	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	322,1416	323,1495	345,1314
Toxina PR	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	320,1260	321,1358	343,1158

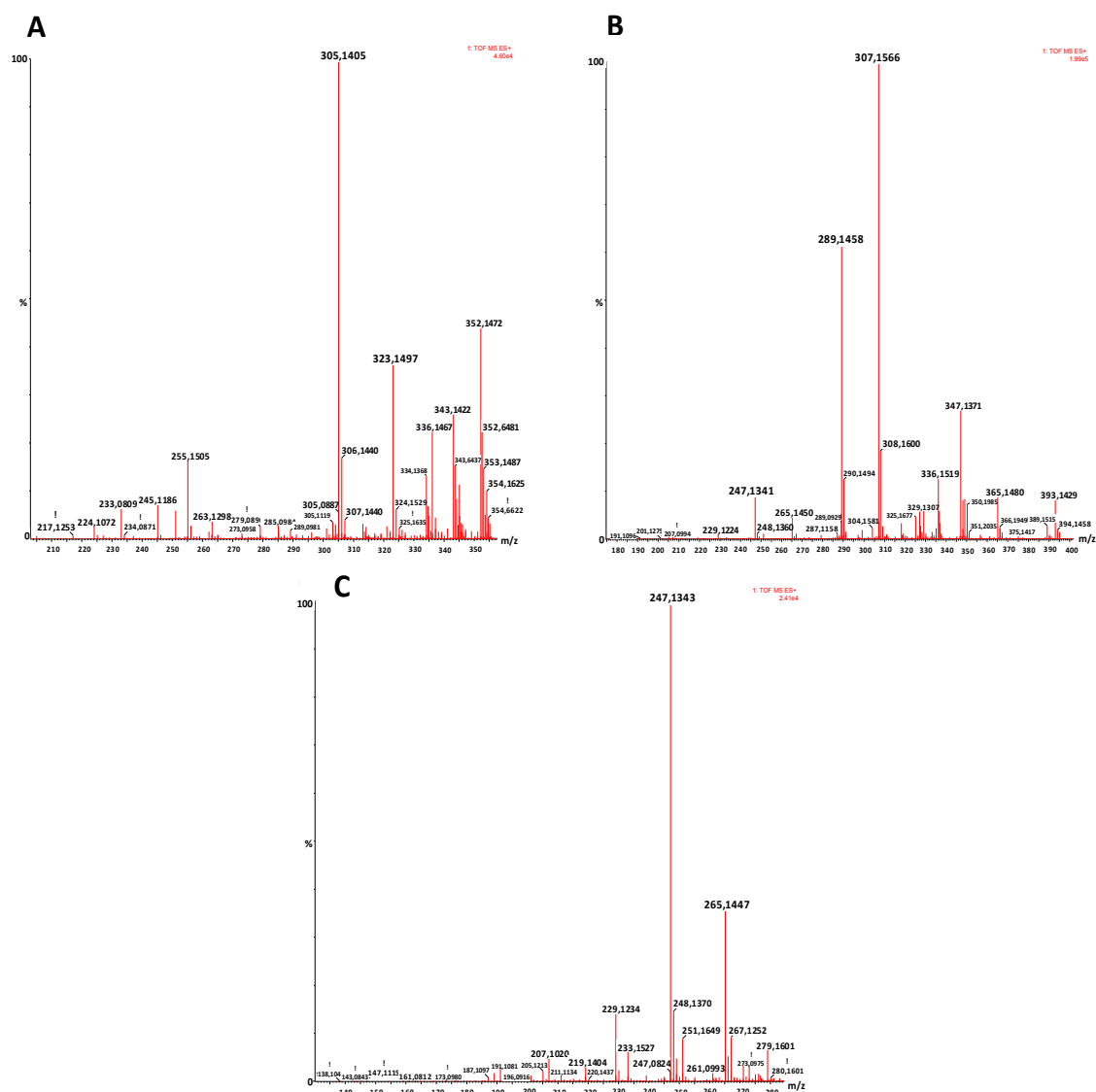
De los compuestos intermediarios de la ruta biosintética de toxina PR, la Eremofortina C (m/z 323,1495 para [M+H]<sup>+</sup>) y la Eremofortina A (m/z 307,1545 para [M+H]<sup>+</sup>) se lograron identificar de forma más clara. Para el resto de los compuestos hay ciertas dudas en cuanto a su identificación, aunque en todos los casos se comprobó que el patrón isotópico del correspondiente pico, es decir, la proporción relativa de los picos M, M+1 y M+2, se ajustaba a la composición elemental esperada. Dado que en la mayoría de los casos no aparecía un pico cromatográfico bien definido, la cuantificación de la abundancia relativa se hizo en función de la altura del pico de masa nominal (M) en el espectro de masas (I) cuando fue posible.

Para identificar la Eremofortina C (EC) se analizó un cromatograma extraído a un valor m/z 323,1495 de cada uno de los extractos de los cultivos de la cepa parental y los transformantes silenciados (Figura 70). En ninguna de las muestras se obtuvo un pico cromatográfico bien definido, sino un grupo de picos a veces superpuestos dando lugar a una banda; no obstante en todas las extractos excepto el de *P. roqueforti* ATCC 48936 y tSORF3-08 se observaba un pico predominante a un tiempo de retención de 2,44 min, cuyo espectro de masas se presenta en la Figura 71A. Los valores m/z observados en las distintas muestras variaron entre 323,1497 ( $\Delta$  -0,8 mDa, -2,5 ppm) y 323,1508 ( $\Delta$  -1,3 mDa, 4,0 ppm), todos ellos compatibles con la composición elemental C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub> (Tabla 25). Además se observó un pico de m/z 305,1405 compatible con C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub> ( $\Delta$  1,6 mDa, 5,2 ppm) que podría corresponderse a [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>.



**Figura 70.** Cromatogramas extraídos de cada una de los diferentes muestras para el valor  $m/z$  323,1495, el cual corresponde con el de la Eremofortina C. De abajo hacia arriba: *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08, tSORF4-03.

Las intensidades de los picos  $[M+H]^+$  para las muestras de *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08 y tSORF4-03, respectivamente, fueron  $8,84 \times 10^4$ ,  $2,14 \times 10^5$ ,  $1,15 \times 10^5$ ,  $1,05 \times 10^5$  y  $1,34 \times 10^5$ . En la cepa parental se observa una disminución marcada de la intensidad del pico característico de la EC, mientras que entre los extractos de los transformantes silenciados hay poca variación.



**Figura 71.** (A) Espectro de masas característico del pico cromatográfico a tiempo de retención 2,44 min para extracto del cultivo de tSORF4-03 que se corresponde con la Eremofortina C. (B) Espectro de masas característico del pico cromatográfico a tiempo de retención 2,89 min para un extracto del cultivo de tSORF4-03 que se corresponde con la Eremofortina A. (C) Espectro de masas característico del pico cromatográfico a tiempo de retención 2,90 min para la muestra de tSORF1-02 que se corresponde con la DAC-Eremofortina A.

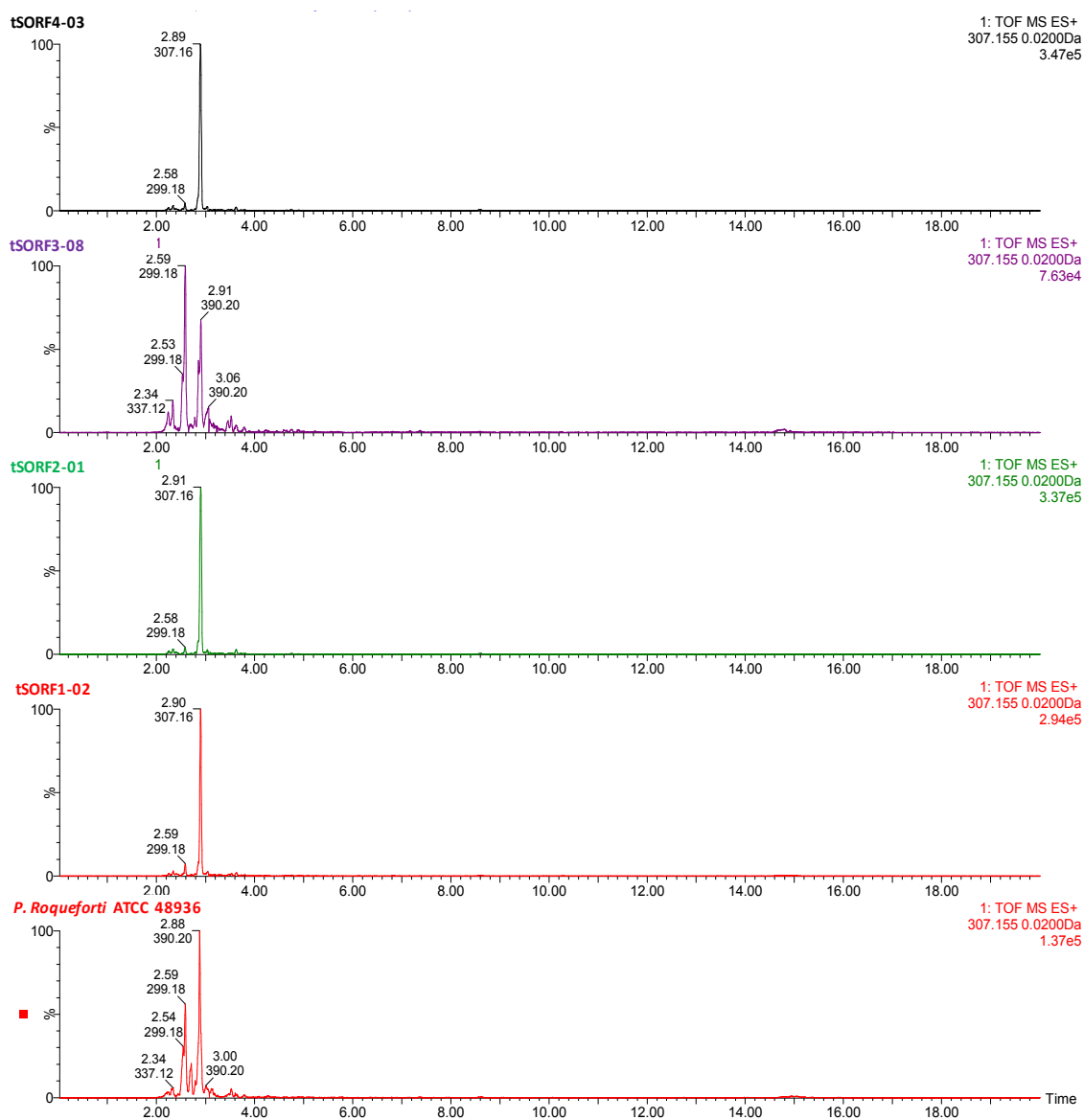
En el caso de la Eremofortina A (EA) los cromatogramas fueron extraídos para un valor de  $m/z$  307,1545. En todas las muestras se obtuvo un pico cromatográfico bien definido con una tiempo de elución entre los 2,88-2,91 min, aunque en las muestras de *P. roqueforti* ATCC 48936 y tSORF3-08 aparece también un pico a 2,59 min (Figura 72). En el espectro de masas del pico cromatográfico a 2,88-2,91 min (Figura 71B) se

observa un valor  $m/z$  307,1566 predominante compatible con  $C_{17}H_{23}O_5$  ( $\Delta$  0,6 mDa, 2,0 ppm); también están presentes los picos de  $m/z$  289,1457, compatible con  $C_{17}H_{21}O_4$  ( $\Delta$  1,7 mDa, 5,9 ppm) para  $[M-H_2O+H]^+$ , y  $m/z$  247,1343, compatible con  $C_{15}H_{19}O_3$  ( $\Delta$  0,9 mDa, 3,6 ppm) para  $[M-H_2O-C_2H_3O+2H]^+$ , el cual podría generarse a partir de la pérdida de una molécula de agua y del grupo acetato ( $CH_3COO^-$ ) con adición de una molécula de agua al carbono correspondiente y posterior pérdida de un protón, resultando un grupo hidroxilo. En el espectro de masas del pico cromatográfico que aparece a 2,59 min se observa un  $m/z$  307,1567 junto con  $m/z$  289,1458 (datos no mostrados), ambos compatibles también con Eremofortina A y el ión deshidratado, pero a mucha menor intensidad, por lo que se considera que podrían ser isómeros *cis* de los anteriores (tiempo de retención 2,88-2,91), ya que este isómero eluye generalmente antes que el *trans*.

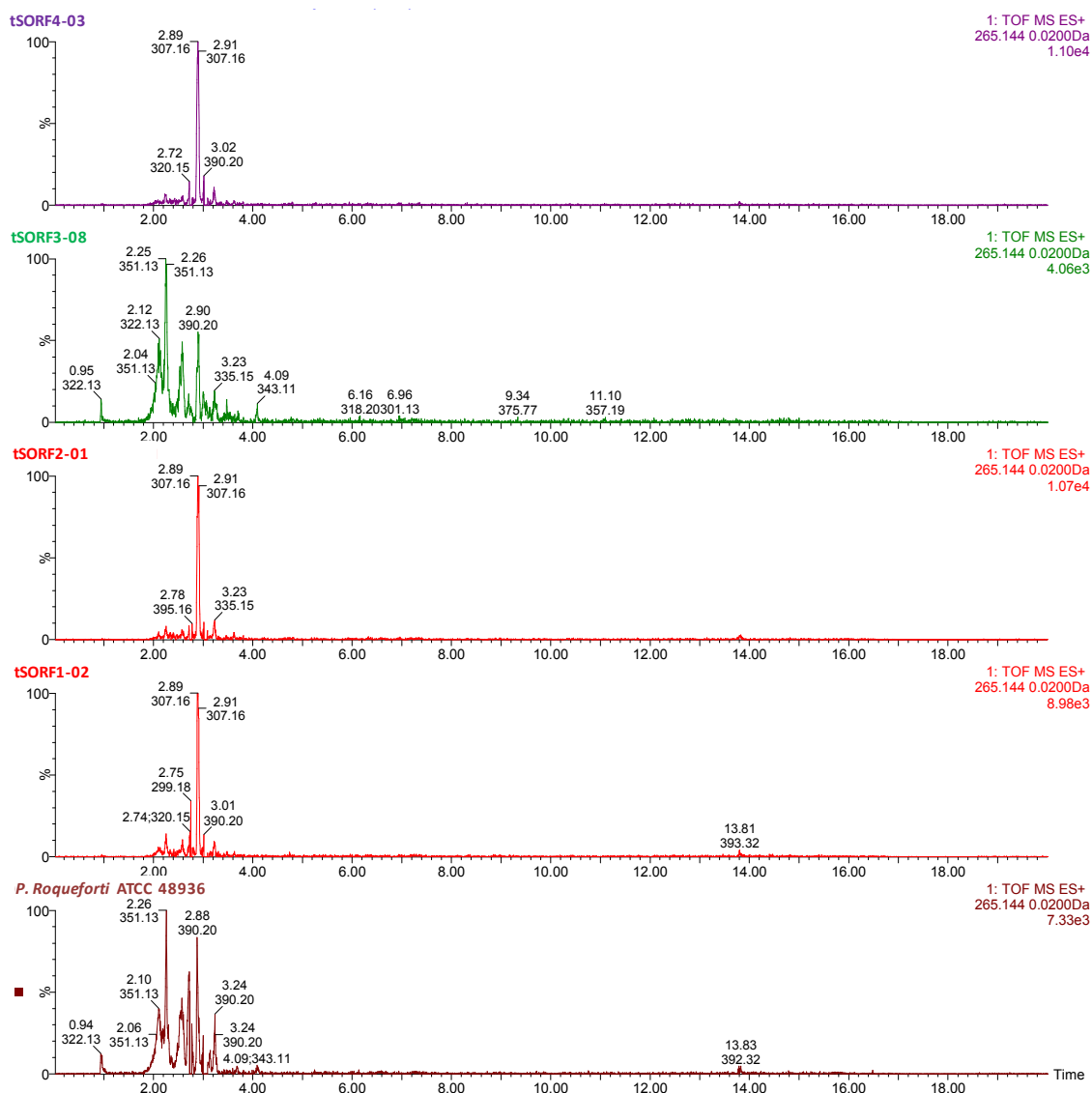
Las intensidades del pico  $[M+H]^+$  que corresponde a las muestras de *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tORF2-01, tSORF3-08 y tSORF4-03, respectivamente, fueron  $7,74 \times 10^5$ ,  $2,38 \times 10^6$ ,  $2,89 \times 10^6$ ,  $3,51 \times 10^5$  y  $3,14 \times 10^5$ . Se observa una mayor abundancia de este metabolito en los extractos de los transformantes silenciados en la ORF1 y la ORF2, siendo un valor 10 veces mayor en la cepa parental y en los transformantes silenciados en la ORF3 y ORF4. No se ha considerado la posible contribución del isómero *cis*.

En los cromatogramas extraídos a  $m/z$  265,1440 para la identificación de la DAC-Eremofortina A se obtuvo un pico cromatográfico bien definido en los transformantes tSORF1-02, tSORF2-01 y tSORF4-03 a 2,89 min; mientras que en *P. roqueforti* ATCC 48936 y tSORF3-08 se obtuvo un conjunto de picos (Figura 72), entre ellos uno a 2,89 min. De acuerdo con estos datos, se puede suponer que este compuesto co-eluye con Eremofortina A ( $m/z$  307,1545). En la Figura 73 se observa  $m/z$  265,1447, compatible con  $C_{15}H_{21}O_4$  ( $\Delta$  0,7 mDa, 2,6 ppm), y  $m/z$  247,1343, compatible con  $C_{15}H_{19}O_3$  ( $\Delta$  0,9 mDa, 3,6 ppm) para  $[M-H_2O+H]^+$ . Este fragmento es más abundante que el ión parental, por lo que se deduce que no sólo contribuye el ión  $m/z$  265,1440, sino también el ión  $m/z$  307,1545. El hecho de que co-eluya este compuesto con Eremofortina A a pesar de tener un oxígeno menos, y ser por tanto ligeramente menos

polar, puede explicarse por el aporte de un grupo metilo del grupo acetato ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) en este último compuesto, así como por la ligera mayor polaridad que comporta el grupo hidroxilo.



**Figura 72.** Cromatogramas extraídos de cada una de las muestras para el valor  $m/z$  307,1545, el cual corresponde con el de la Eremofortina A. De abajo hacia arriba: *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08, ORF4-03.



**Figura 73.** Cromatogramas extraídos de cada una de las muestras para el valor  $m/z$  265,1440, el cual se corresponde con el de la DAC-Eremofortina A. De abajo hacia arriba: *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08, tSORF4-03.

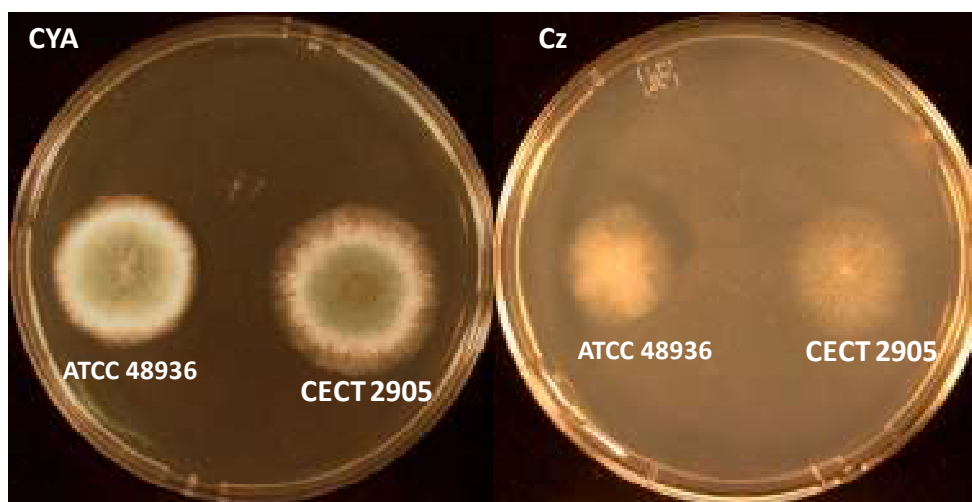
Las intensidades del pico  $[M+H]^+$  para las muestras de *P. roqueforti* ATCC 48936, tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08 y tSORF4-03, respectivamente, fueron  $2,91 \times 10^4$ ,  $8,41 \times 10^4$ ,  $1,11 \times 10^5$ ,  $1,87 \times 10^4$  y  $1,05 \times 10^5$ . Destaca la mayor presencia en los transformantes tSORF2-01 y tSORF4-03. No se ha considerado la posible presencia y contribución del isómero *cis*.

Por otra parte, fue imposible identificar los compuestos Eremofortina B y Aristoloqueno.



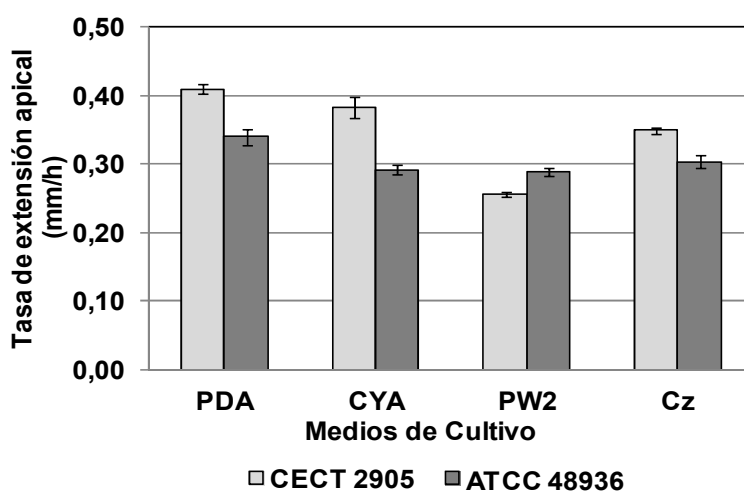
#### 4. Comparación fenotípica de las cepas referencias *P. roqueforti* CECT 2905 y *P. roqueforti* ATCC 48936.

Se realizó un estudio comparativo entre las cepas de referencia de *P. roqueforti* CECT 2905 y ATCC 48936 empleadas como control y cepa parental para la obtención de mutantes y transformantes respectivamente en la realización de la presente memoria.



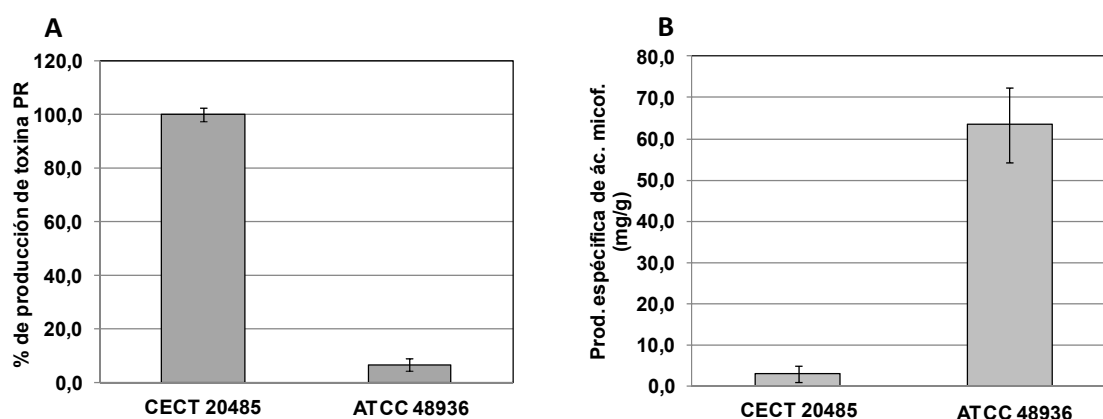
**Figura 74.** Morfología de las colonias de *P. roqueforti* ATCC 48936 y *P. roqueforti* CECT 2905 en los medios de cultivo *Czapek Yeast Extract* (CYA) y *Czapek* (Cz) a los 4 días de incubación.

En la Figura 75 se muestra la tasa de crecimiento apical de las dos cepas de referencia incubadas a 28°C durante 7 días en los medios de cultivo sólido *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Czapek Yeast Extract* (CYA), *Power 2* (PW2) y *Czapek* (Cz).



**Figura 75.** Tasa de crecimiento apical de las cepas de referencia *P. roqueforti* CECT 2905 y *P. roqueforti* ATCC 48936 en los medios de cultivo sólido *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Czapek Yeast Extract* (CYA), *Power 2* (PW2) y *Czapek* (Cz).

La producción de los metabolitos secundarios toxina PR y ácido micofenólico también se comportó de forma diferente en las dos cepas de referencia. En la Figura 76A se observa la producción relativa de toxina PR de ambas cepas. La producción de toxina PR de *P. roqueforti* CECT 2905 representó sólo el 6,7% de la producción de *P. roqueforti* ATCC 48936 (100%). Sin embargo, la producción de ácido micofenólico en la cepa *P. roqueforti* CECT 2905 resultó ser 23 veces mayor que la producción de la cepa *P. roqueforti* ATCC 48936.



**Figura 76.** Producción de los metabolitos secundarios toxina PR y ácido micofenólico en las cepas de referencia *P. roqueforti* ATCC 48936 y CECT 2905. **(A)** Producción relativa de toxina PR en *P. roqueforti* ATCC 48936 y CECT 2905. **(B)** Producción específica de ácido micofenólico en *P. roqueforti* ATCC 48936 y CECT 2905.

La diferencia en la producción de los mismos metabolitos por cepas aisladas de hábitats diferentes, aunque pertenezcan a una misma especie, es un fenómeno bien conocido y se debe, a nivel molecular, al distinto grado de expresión de los genes biosintéticos.

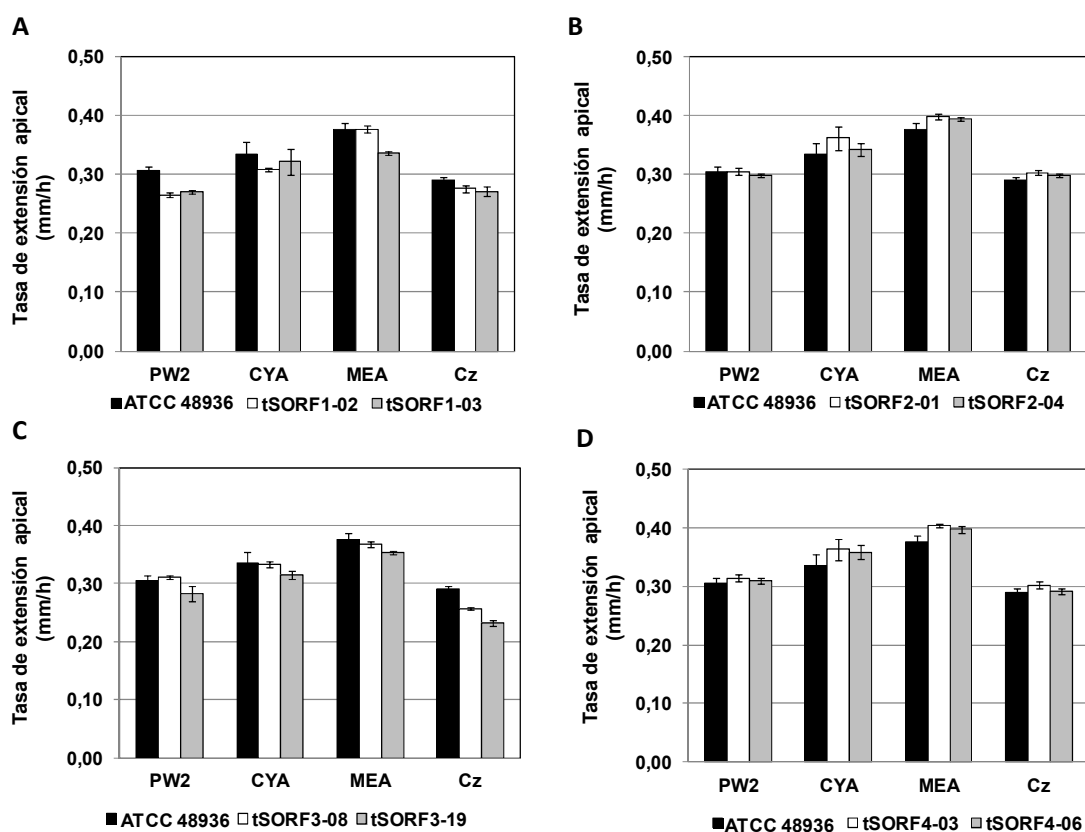
##### 5. Estudio fenotípico de los transformantes silenciados en los ORFs del *cluster* de biosíntesis de la toxina PR y la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936.

Se estudió la tasa de extensión radial (apical) de los transformantes silenciados en los cuatro ORFs en diferentes medios de cultivo sólido. Este experimento tiene como objetivo comprobar si el proceso de transformación había afectado al crecimiento y desarrollo de las cepas silenciadas en los diferentes ORFs de la agrupación génica Ari1.

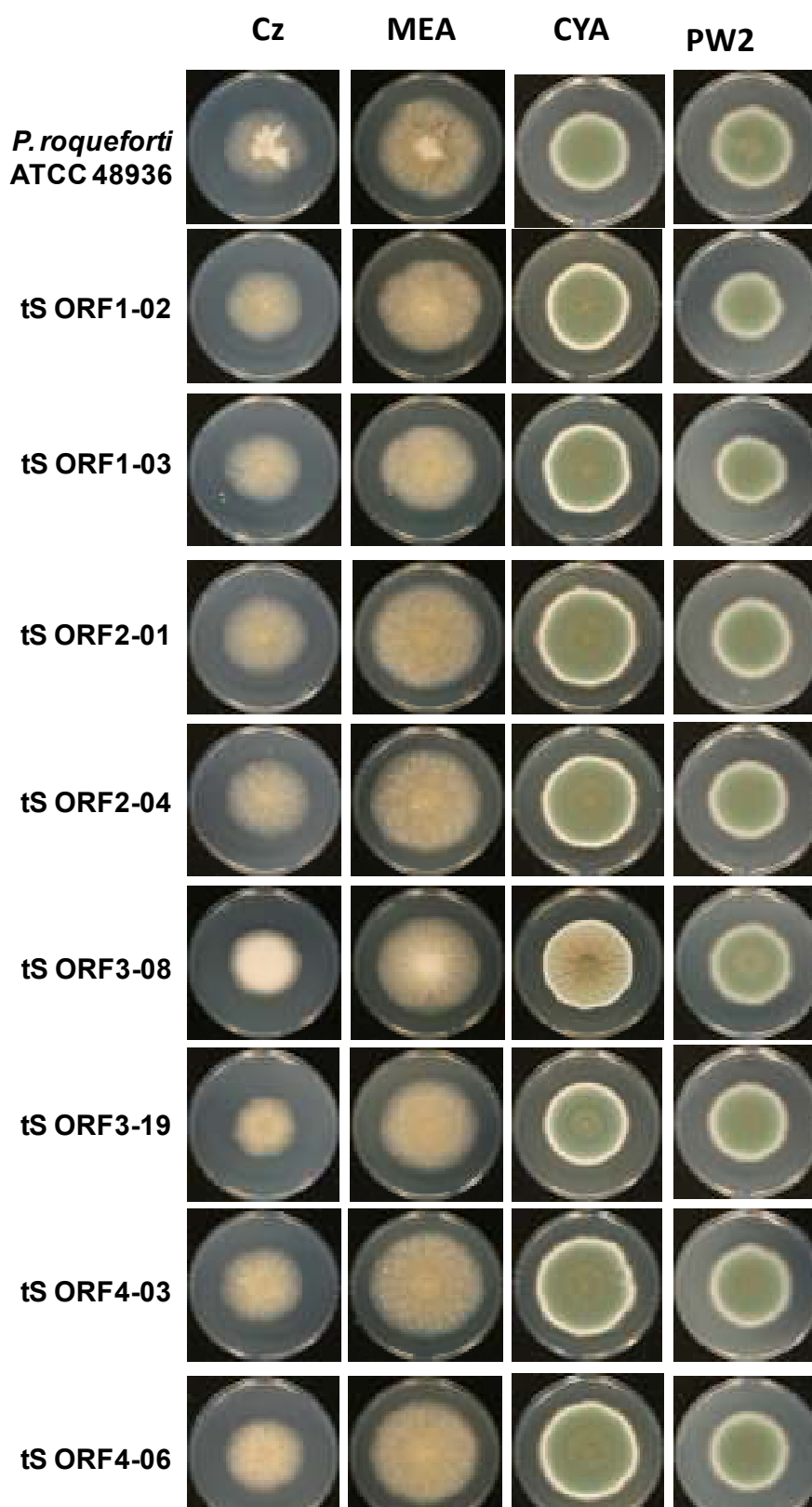
Las cepas transformadas y la cepa parental se cultivaron en los medios de cultivos sólidos *Power 2* (PW2), *Czapek Yeast Extract* (CYA), *Malt Extract Agar* (MEA) y *Czapek* (Cz) siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 14.1 de Materiales y Métodos. Las placas inoculadas se incubaron durante 7 días a una temperatura de 28°C. La tasa de extensión radial (apical) se expresó en mm por hora de incubación (mm/h).

No se encontraron grandes diferencias en las tasas de extensión radial (apical) de ninguno de los transformantes al compararse con la cepa parental en cada uno de los medios de cultivos ensayados (Figura 77).

Además de la tasa de extensión radial (apical), se evaluó la morfología de las colonias de los transformantes (Figura 77). Se observaron diferencias en el tamaño y la morfología de las colonias entre los diferentes medios de cultivos, pero no entre los transformantes y la cepa parental, lo cual indica que en los transformantes no está alterado el crecimiento ni el desarrollo tras el proceso de transformación.



**Figura 77.** Tasa de extensión radial de los transformantes silenciados en los cuatro ORFs en los medios de cultivo sólido: *Power 2* (PW2), *Czapek Yeast Extract* (CYA), *Malt Extract Agar* (MEA) y *Czapek* (Cz). (A) tSORF1-02 y tSORF1-03; (B) tSORF2-01 y tSORF2-04; (C) tSORF3-08 y tSORF3-19; (D) tSORF4-03 y tSORF4-06.



**Figura 78** Morfología de las colonias de los transformantes silenciados a los 7 días de crecimiento en los medios de cultivo ensayados: Czapek (Cz), Malt Extract Agar (MEA), Czapek Yeast Extract (CYA) y Power 2 (PW2).

## **Discusión del Capítulo II**



## Discusión del Capítulo II

### 1. Producción e identificación cromatográfica de la toxina PR.

En un primer intento para identificar el pico cromatográfico correspondiente a la toxina PR, se analizaron extractos crudos de cultivos de *P. roqueforti* CECT 2905 previamente crecida en medio YES a 24°C durante 15 días sin agitación. Se utilizó cromatografía líquida de fase reversa para la separación cromatográfica del extracto crudo y se recogieron fracciones que fueron analizadas por espectrometría de masas al igual que el extracto crudo. No se logró identificar la toxina PR en de las fracciones recogidas, ni en el extracto crudo. Wei y Liu, (1978) y Siemens y Zawistowski, (1992) habían utilizado esta cepa en iguales condiciones para la producción de toxina PR.

La utilización de *P. roqueforti* CECT 2905, perteneciente a la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT), estuvo respaldada por varios estudios que la describían como una cepa productora de toxina PR (Wei et al., 1973, 1975; Wei and Liu, 1978; Moreau et al., 1980; Siemens and Zawistowski, 1992). *P. roqueforti* CECT 2905 tiene correspondencia con los depósitos *P. roqueforti* NRRL 849 de la *Agriculture Research Service Culture Collection* (más conocida como NRRL) y *P. roqueforti* ATCC 10110 de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

*P. roqueforti* NRRL 849 fue cultivada en medio YES por Wei et al., (1973) para aislar y caracterizar a la toxina PR. El cultivo de esta cepa de referencia también ha sido utilizado por otros autores para identificar, cuantificar y estudiar la ruta metabólica y otros aspectos referentes a la toxina PR (Wei et al., 1975; Wei y Liu, 1978; Moreau et al., 1980; Siemens y Zawistowski, 1992). Wei y Liu, (1978) evaluaron cualitativamente la producción de toxina PR mediante cromatografía en capa fina en varias cepas de referencia de *P. roqueforti*, entre las se encontraba *P. roqueforti* ATCC 10110 (CECT 2905) la cual dio positivo para la producción de esta micotoxina. Años después, Siemens y Zawistowski, (1992) también identificaron y cuantificaron la producción de toxina PR de esta cepa en medio YES, pero esta vez mediante la técnica de HPLC.

La toxina PR ha sido objeto de estudio de trabajos publicados por varios grupos de investigación. Al analizar la producción de este metabolito por *P. roqueforti* en medio YES observamos que los valores máximos están entre 82 y 770 µg/ml (Wei et al., 1973; Scott et al., 1977; Wei and Liu, 1978; Moreau et al., 1980; Chang et al., 1991b).

Estos resultados indican que la habilidad de producción de toxina PR pudiera tender a disminuir debido a las repetidas transferencias de las cepas en medios sintéticos o ser almacenadas por varios años a bajas temperaturas o liofilizadas. Por otra parte Frisvad *et al.*, (2004) observaron variabilidad en la producción de toxina PR en medio YES vinculándola al tipo de extracto de levadura utilizado en este medio de cultivo.

Para conseguir identificar el pico cromatográfico de la toxina PR se trazaron dos estrategias: la utilización de medios de cultivo que pudieran potenciar la producción de este metabolito y la búsqueda de otra cepa de referencia de *P. roqueforti* con una mayor producción de toxina PR. En este trabajo se consiguió niveles de producción de toxina PR suficientes para recoger un pico bien definido, utilizando cromatografía líquida de fase reversa para posteriormente identificarlo por espectrometría de masas, cultivando *P. roqueforti* ATCC 48936 en medio arroz a 24°C durante 14 días en estacionario.

La toxina PR ha sido aislada fundamentalmente de cereales almacenados y residuos de origen vegetales contaminados con *P. roqueforti* (Rundberget *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2010, 2011) siendo evidente que éstos brindan los nutrientes ideales para el desarrollo de *P. roqueforti* y la producción de este compuesto. Varios autores han utilizado con éxito la adición al medio de cultivo de cereales o extractos elaborados con éstos para potenciar la producción de toxina PR en *P. roqueforti* (Li *et al.*, 1985; Chang *et al.*, 1991a, 1996). El medio arroz para la producción de toxina PR ya había sido descrito por Chang *et al.*, (1991b), aprovechado la habilidad que tiene *P. roqueforti* para crecer y producir metabolitos secundarios en medios sólidos, además de ser los cereales una fuente importante de nutrientes que estimula la producción de toxina PR (Rundberget *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2006).

*P. roqueforti* ATCC 48936 se corresponde con el depósito *P. roqueforti* CECT 20485 y fue utilizada en varios estudios relacionados con la toxina PR (Chang *et al.*, 1993, 1996, 1998, 2004) y descrita como productora de cantidades importantes de este metabolito (Chang *et al.*, 1991b).

La toxina PR y el ácido micofenólico presentaron tiempos de retención muy parecidos al realizar la separación del extracto crudo mediante cromatografía líquida de fase reversa. Rasmussen *et al.*, (2011) observaron claramente la co-elución de estos dos compuestos. La muestra de partida consistió en extractos crudos de cultivos en agar YES de cepas de *P. roqueforti* aisladas de maíz contaminado por hongos. La



separación cromatográfica se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta definición con un detector Diode-Array (HPLC-DAD) y con una columna Luna C18 (3  $\mu\text{m}$ , 2,0-100 mm) y fase móvil acetonitrilo-agua en gradiente. Estos autores no lograron separar los picos cromatográficos de la toxina PR y el ácido micofenólico, eluyendo aproximadamente a los 9 minutos. Nielsen *et al.*, (2006) analizaron los extractos crudos de cultivos *P. roqueforti* aislados de hierba ensilada utilizando un equipo de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas. En este estudio se logra una mejor separación de la toxina PR y el ácido micofenólico, pero no una completa resolución de los picos cromatográficos.

El ácido micofenólico y la toxina PR presentan igual composición química ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ) y por tanto igual masa molecular. Además muestran similar polaridad a pesar de presentar una conformación espacial diferente (Nielsen *et al.*, 2006). Estas características hacen que tiendan a co-eluir al ser analizados mediante cromatografía de fase reversa ya que este método de separación se basa en interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de la fase estacionaria y la fase móvil con los compuestos a separar.

La realización de una separación cromatográfica más larga, con un gradiente más leve permitió una completa resolución de los picos correspondientes al ácido micofenólico y la toxina PR. El hecho de que estos dos compuestos salgan uno a continuación del otro facilitó la recogida de las fracciones para la identificación de la toxina PR.

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que los compuestos de una muestra son ionizados, separados por su relación masa/carga ( $m/z$ ) y posteriormente detectados y registrados (Niessen, 2006). Esta técnica brinda una alta especificidad en la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito (Hauschild *et al.*, 2007). El análisis mediante espectrometría de masas de las fracciones recogidas en HPLC permitió la identificación inequívoca del ácido micofenólico, la toxina PR y de metabolitos involucrados en la ruta biosintética de este último.

## 2. Estudio de la ruta biosintética de la toxina PR.

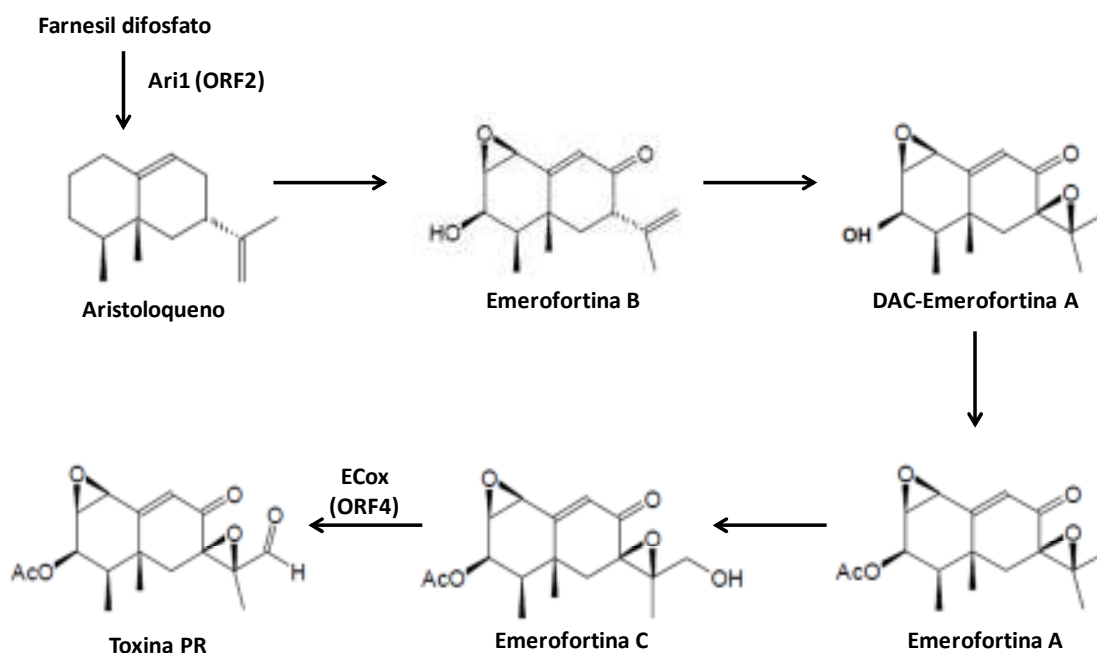
El aristoloqueno es un compuesto perteneciente al grupo de los eremofilanos y es considerado por muchos autores como precursor de las micotoxinas sesquiterpenoides en los hongos filamentosos (Zeringue *et al.*, 1993; Jelén *et al.*, 1995; Pasanen *et al.*, 1996) y por tanto posible precursor de la toxina PR. Proctor y Hohn, (1993) aislaron y caracterizaron en *P. roqueforti* el gen (*ari1*) que codifica para la enzima aristoloqueno sintasa la cual es responsable de la ciclación del farnesil difosfato necesario para la formación del aristoloqueno. Contar con la secuencia de este gen permitió el estudio de los ORFs contiguos, ya que en bacterias y hongos es frecuente que los genes involucrados en la síntesis y secreción de un metabolito secundario se encuentren físicamente agrupados en “clusters” (Martín y Liras, 1989; Keller y Hohn, 1997; García-Estrada *et al.*, 2011).

El silenciamiento génico se ha convertido en una alternativa a la interrupción génica en hongos filamentosos, la cual muestra una baja eficacia a causa de la reducida tasa de recombinación homóloga exhibida por estos organismos debido a la alta frecuencia de integraciones aleatorias ectópica producidas en la transformación de ADN (Hoskins *et al.*, 1990; Casqueiro *et al.*, 1999). El silenciamiento génico ha sido utilizado con éxito para investigar el papel que juegan genes específicos en el metabolismo de otras especies de hongos filamentosos como *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* (Janus *et al.*, 2007; Ullán *et al.*, 2008; García-Estrada *et al.*, 2011).

La obtención, en este trabajo, de transformantes silenciados en los 4 ORFs del *cluster* de biosíntesis de la toxina PR cuya producción de toxina PR está afectada, indica que esta agrupación génica está involucrada en la síntesis de este metabolito secundario.

Además de las diferencias en la producción de toxina PR se observaron variaciones en el metaboloma al comparar de forma integral cada transformante silenciado (tSORF1-02, tSORF2-01, tSORF3-08 y tSORF4-03) con el de la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 (Apartado 4 de Resultados del Capítulo II). Estas diferencias permitieron separar cada una de las muestras, analizadas mediante espectrometría de masas, utilizando el análisis discriminante basado en mínimos cuadrados parciales (PSL-DA) (Figura 69). Estos resultados corroboran que el silenciamiento de estos genes trajo consigo diferencias en el metabolismo secundario de *P. roqueforti*.

En la Figura 79 se esquematiza la posible ruta biosintética de la toxina PR. En esta propuesta se hacen modificaciones a la ruta descrita por Moreau *et al.*, (1980) incluyendo al aristoloqueno como molécula precursora de la toxina PR y la desacetil Eremofortina A (DAC-Eremofortina A) como paso intermedio entre la EB y la EA. Además se indica el papel que pudieran jugar las proteínas codificadas por cada una de los ORFs estudiados atendiendo a la homología presentada.



**Figura 79.** Esquema de la ruta biosintética propuesta para la toxina PR. Se indican algunas de las proteínas resultantes de los ORFs del *cluster* de biosíntesis de la toxina PR en el paso correspondiente.

La formación de aristoloqueno como resultado de la ciclación del farnesil difosfato es el primer paso representado en este esquema. Esta reacción es catalizada por la enzima aristoloqueno sintasa (Ari1) la cual es codificada por el gen *ari1* (Proctor y Hohn, 1993) y corresponde con la ORF2 de la región génica estudiada. La obtención de transformantes silenciados en el gen *ari1* con disminución en la producción de toxina PR confirma la hipótesis de que el aristoloqueno es el precursor de la toxina PR. Proctor y Hohn, (1993) observaron que la actividad de la enzima Ari1 está presente en la fase estacionaria de crecimiento de *P. roqueforti* coincidiendo con la expresión del gen *ari1* y la producción de toxina PR (Polonelli et al., 1978; Wei and Liu, 1978). El silenciamiento del ORF2 produjo un 17% de disminución de la expresión génica en el transformante tSORF2-01 y de un 10% en tSORF2-04 con respecto a la cepa parental *P. roqueforti* 20485 tras ser analizada mediante la técnica RT-PCR semicuantitativa.

En este trabajo no se logró realizar la identificación y cuantificación del farnesil difosfato y aristoloqueno, compuesto inicial y final de la reacción catalizada por la enzima aristoloqueno sintasa. El silenciamiento del gen que codifica para esta enzima provocó una marcada disminución de la producción de la toxina PR de 73,4% y 66,5% en los transformantes tSORF2-01 y tSORF2-04 respectivamente.

En *Aspergillus terreus* fue aislado y caracterizado el gen responsable de la aristoloqueno sintasa con una identidad nucleotídica y aminoacídica de un 66% de y un 70% respectivamente con aristoloqueno sintasa de *P. roqueforti* (Cane y Kang, 2000). La aristoloqueno sintasa de *A. terreus* al ciclar el farnesil difosfato sólo produce aristoloqueno, a diferencia de la aristoloqueno sintasa de *P. roqueforti* en el que se obtiene una mezcla de aristoloqueno, germacreno y valenceno a proporción de 94:4:2 (Felicetti y Cane, 2004). Estos autores obtuvieron mutantes con disminución en la proporción de aristoloqueno con respecto a los otros dos compuestos al realizar mutaciones dirigidas en residuos de aminoácidos de dos dominios de unión a Mg<sup>2+</sup> altamente conservados. La aristoloqueno sintasa obtenida en algunos de los mutantes no fue funcional.

En el caso de la ORF4, su silenciamiento provocó una reducción de la producción de toxina PR de 63% en tSORF4-03 y 73% en el tSORF4-06. La proteína resultante de esta ORF tiene homología con alcohol deshidrogenasas por lo que pudiera ser compatible con la enzima encargada de la transformación de EC a toxina PR. La transformación de EC a toxina PR se produce por la oxidación del grupo OH (alcohol primario) del carbono de la posición 12. Li *et al.*, (1985) realizaron una reproducción *in vitro* de la reacción de oxidación de la EC a toxina PR utilizando agentes con actividad oxidante leve, obteniendo los mejores resultados empleando el complejo anhídrido-piridina.

Chang *et al.*, (1985) aislaron a partir de caldo de cultivos y de micelio de *P. roqueforti* una enzima, la cual era capaz de oxidar el C12 de la EC dando como resultado toxina PR, por lo que la nombraron EC oxidasa. La EC oxidasa alcanzó su máxima actividad a los 13 días de incubación y se estimó su masa molecular en 40 kDa. Este cálculo se realizó comparando los tiempos de retención de la EC oxidasa con el de otras proteínas de masa molecular conocida al hacerlas pasar por un sistema cromatográfico de HPLC con una columna I-250 para proteínas. En este trabajo se dedujo la masa molecular de la secuencia de aminoácidos del ARNm del ORF4 utilizando el programa informático disponible en la web ExpASY. Se pudiera

considerar que se trata de la misma proteína si se tiene en cuenta que la masa molecular determinada por Chang *et al.*, (1985) fue un calculada de forma indirecta y aproximada.

Otro dato que respalda la hipótesis que la proteína codificada por el ORF4 es la responsable de la transformación de la EC a toxina PR, es que los valores de abundancia de EC en el transformante tSORF4-03 es 1,5 veces mayor que la observada en la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936, lo que indica que el intermediario EC se acumula en este mutante al verse bloqueada la ruta metabólica.

La adición del grupo acetilo en el carbono de la posición tres es otro de los pasos importantes en la ruta biosintética de la toxina PR. En este estudio se propone que esta reacción se produce a partir de DAC-Eremofortina A. En los extractos crudos de *P. roqueforti*, utilizando espectrometría de masas, fue identificado un compuesto con una relación masa/carga de 265,1440 que pudiera ser compatible con la DAC-Eremofortina A. La EA sería el producto de esta reacción y estaría catalizada por una enzima del grupo de las acetiltransferasas. Ninguno de los productos proteicos de los 4 ORFs silenciados presentó homología con las acetiltransferasas. En el contig Pc12g0 de *P. chrysogenum*, el cual tienen homología con nuestro *cluster*, se encontró la proteína Pc12g06370 (Figura 51) la cual es compatible con una acetiltransferasa. Uno de los objetivos de futuros trabajos estaría encaminado a secuenciar y estudiar el papel de otros de ORFs contiguos al *cluster* caracterizado en este estudio.

Las restantes transformaciones de la ruta biosintética propuesta para la toxina PR consisten en reacciones de oxidoreducción con la introducción de grupos epoxi, hidroxilo y cetona. Estas reacciones son realizadas por enzimas oxidoreductasas con las cuales tienen homología los productos proteicos del ORF1 y el ORF3. Los transformantes silenciados en ambos ORFs presentaron una disminución en la producción de toxina PR por lo que están implicados en esta ruta biosintética, pero su localización en el esquema de la Figura 79 es inexacto por el momento.

La transformación de aristoloqueno a EB pudiera ocurrir en varios pasos con reacciones catalizadas por enzimas diferentes, aunque no se han logrado aislar los compuestos intermediarios. Las modificaciones corresponden a la introducción de un grupo epoxido en el doble enlace existente entre los carbonos de la posición 1 y 2, un grupo hidroxilo en el C3 así como un grupo carbonilo en el C8 con la eliminación del doble enlace entre el C9 y C10.

En este esquema se propone la enzima eremofortina B sintasa (EBs), producto de traducción del ORF3, como la responsable de la transformación de aristoloqueno a EB. Esta reacción consiste en una oxidación, la cual pudiera ser compatible con la ORF3 que tiene homología con oxidoreductasas. La reducción de la expresión con respecto a la parental fue de 37% en tSORF3-08 y 22% en tSORF3-19. Para el transformante tSORF3-08 la producción de toxina PR fue casi nula, mientras en tSORF3-19 fue de tan sólo un 30%.

El ORF3 tiene homología con el gen *mcrA* de *Streptomyces lavendulae* el cual le confiere resistencia para la mitomicina C, probablemente debido a una modificación de la mitomicina (August *et al.*, 1994). También tiene similitud con la 6-hidroxi-D-nicotina oxidasa que interviene en el catabolismo de la nicotina en *Arthrobacter nicotinovorans*, catalizando la oxidación de dos electrones del anillo pirrolidina D-6-hidroxinicotina (Sandu *et al.*, 2003; Koetter y Schulz, 2005).

Resultó interesante observar cómo en los transformantes silenciados en los diferentes ORFs se produjo, unido a la disminución de la producción en toxina PR, un incremento en la producción de ácido micofenólico entre 30 y 40 veces al compararse con la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936. Sólo en el transformante tSORF3-08 no se produjo este incremento.

La producción de ácido micofenólico en *P. roqueforti* ATCC 48936 fue de 2,97 mg/kg de medio arroz, producción similar a la obtenida por Alani *et al.*, (2009) en este mismo medio con *P. brevicompactum* ATCC 16024 (2,5 g/kg). Estos autores además del arroz, evaluaron la producción en otros medios sólidos como cebada, salvado de trigo y avena con diferentes grados de hidratación. Los mejores resultados fueron obtenidos con la avena.

El ácido micofenólico y la toxina PR comparten al farnesil difosfato como compuestos intermediario. El ácido micofenólico es un compuesto meroterpenoide con un núcleo ftalida y una cadena lateral de naturaleza terpenoide. Regueira *et al.*, (2011) plantearon que la cadena lateral se debe a la adición de farnesil difosfato al intermediario ftalidico, reacción que es catalizada por una preniltransferasa (Figura 20). Por otra parte, la ciclación de farnesil difosfato por la enzima aristoloqueno sintasa da como producto el aristoloqueno (Proctor y Hohn, 1993), compuesto precursor de la toxina PR.

El silenciamiento del gen *ari1* provoca una menor expresión de este gen, menor cantidad de la enzima aristoloqueno sintasa y por tanto una acumulación de farnesil difosfato. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten plantear la hipótesis de que el farnesildifosfato pudiera ser un compuesto limitante en la síntesis de ácido micofenólico y que al existir una mayor disponibilidad es desviado hacia la ruta sintética del ácido micofenólico.

En los transformantes silenciados en los demás ORFs también se produjo un incremento de la producción de ácido micofenólico. En este trabajo se propone que estos ORFs codifican para enzimas que intervienen en la ruta biosintética de toxina PR y son responsables de reacciones de transformación posteriores a la formación de aristoloqueno. El silenciamiento de cada ORF produce una menor producción de su enzima y por tanto una acumulación del sustrato que transforma. Es frecuente la existencia de un mecanismo de inhibición por exceso de producto, en el cual el metabolito acumulado inhibe la actividad de la enzima encargada de su síntesis. La existencia de este tipo de mecanismo explica el aumento de la producción de ácido micofenólico.

El ácido micofenólico es producido por varias especies del género *Penicillium*, siendo *P. brevicompactum* el más utilizado para su producción (Sadhukhan *et al.*, 1999; Alani *et al.*, 2009; Regueira *et al.*, 2011). Aunque en la actualidad el ácido micofenólico es poco utilizado en la práctica médica como inmunosupresor debido a su alta toxicidad, sigue siendo de gran importancia debido a que se utiliza como base para la síntesis de micofenolato de mofetilo y micofenolato sódico, compuestos semisintéticos con mejor biodisponibilidad, menor toxicidad y semejantes propiedades inmunosupresoras (Bardsley-Elliot *et al.*, 1999; Bentley, 2000; Zolezzi, 2005; Cooper *et al.*, 2012).





# **Conclusiones**



## Conclusiones

1. La producción de andrastina A por *P. roqueforti* CECT 2905 en medio MAp se incrementó 6,75 veces al optimizar las condiciones de fermentación iniciales descritas en la bibliografía, utilizando la metodología de diseño de experimentos.
2. La producción de andrastina A por *P. roqueforti* está correlacionada positivamente con el nivel de esporulación.
3. La mutación mediante luz ultravioleta de esporas de *P. roqueforti* CECT 2905 permitió obtener los mutantes MT5-245 y MT5-257 con la producción de andrastina A disminuida en un 58,6% y 40,3% respectivamente y el mutante MT5-209 con un incremento en su producción de un 47,9%.
4. La comparación del proteoma de los mutantes de *P. roqueforti* CECT 2905 afectados en la producción de andrastina A mediante electroforesis diferencial en gel (DIGE) permitió identificar proteínas expresadas de forma diferencial en los mutantes con respecto a la cepa parental. No obstante, no se pudieron identificar enzimas involucradas en la biosíntesis de andrastina A.
5. El análisis mediante espectrometría de masas de los picos recogidos a partir de separaciones cromatográficas en fase reversa procedentes de cultivos de *P. roqueforti* ATCC 48936 permitió llevar a cabo la identificación tanto de la toxina PR, como de compuestos relacionados con su biosíntesis.
6. Se identificaron 4 genes (ORF1, *ari1*, ORF3 y ORF4) en *P. roqueforti* formando parte de una agrupación génica que incluye al gen *ari1* descrito como responsable de la biosíntesis de aristoloqueno, un hipotético precursor de la toxina PR.
7. La obtención de transformantes afectados en la producción de toxina PR en *P. roqueforti* ATCC 48936 mediante el silenciamiento del gen *ari1*, confirmó la hipótesis de que en *P. roqueforti* el aristoloqueno, sintetizado por la aristoloqueno sintasa Ari1, es la molécula precursora de la toxina PR.

8. La obtención de transformantes afectados en la producción de toxina PR en *P. roqueforti* ATCC 48936 por silenciamiento en los ORF1, ORF3 y ORF4, confirmó la hipótesis de que en *P. roqueforti* los genes que acompañan al *ari1* de la agrupación génica también están involucrados en la síntesis de toxina PR.
9. Los metabolomas de los transformantes silenciados en cada uno de los 4 ORFs del *cluster* biosintético de la toxina PR se diferenciaron entre sí y con el de la cepa parental *P. roqueforti* ATCC 48936 al realizar un análisis discriminante basado en mínimos cuadrados parciales (PSL-DA).
10. El silenciamiento de los genes de la agrupación génica de biosíntesis de la toxina PR en *P. roqueforti* ATCC 48936 incrementa hasta 40 veces la producción de ácido micofenólico en los transformantes.
11. Las cepas de referencia *P. roqueforti* CECT 2905 y *P. roqueforti* ATCC48936 presentan perfiles diferentes en cuanto a la producción de metabolitos secundarios.

## **Referencias Bibliográficas**



## Referencias Bibliográficas

- Alani F, Grove JA, Anderson, WA, Moo-Young M (2009). Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 44:106–110.
- Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I (2003). A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3:36–44.
- Alsberg C, Black O (1913). Contributions to the study of maize deterioration. *USDA Agr. Bur. Plant. Ind. Bull.* 270:7–48.
- Amand S, Langenfeld A, Blond A, Dupont J, Nay B, Prado S (2012). Guaiane sesquiterpenes from *Biscogniauxia nummularia* featuring potent antigerminative activity. *J. Nat. Prod.* 75:798–801.
- Anné J (1977). Somatic hybridization between *Penicillium* species alter induced fusion of their protoplasts. *Agricultura* 25:1–117.
- Arnoux B, Pascard C, Moreau S (1977). Eremofortin D, a valencane-class sesquiterpene. *Acta Cryst.* 33:2930–2932.
- Arora DS, Chandra P (2010). Optimization of antioxidant potential of *Aspergillus terreus* through different statistical approaches. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 57:77–86.
- August PR, Flickinger MC, Sherman DH (1994). Cloning and analysis of a locus (*mcr*) involved in mitomycin C resistance in *Streptomyces lavendulae*. *J. Bacteriol.* 176:4448–4454.
- Austin B, Hall RM, Tyler BM (1990). Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene* 93:157–162.
- Back K, Chappell J (1995). Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to related terpene cyclases. *J. Biol. Chem.* 270:7375–7381.
- Baker R, Coles HR, Edwards M, Evans DA, Howse PE, Walmsley S (1981). Chemical composition of the frontal gland secretion of *Syntermes soldiers* (Isoptera, Termitidae). *J. Chem. Ecol.* 7:135–145.

- Bardsley-Elliot A, Noble S, Foster RH (1999). Mycophenolate mofetil: a review of its use in the management of solid organ transplantation. *BioDrugs* 12:363–410.
- Barros J, Becerra J, González C, Martínez M (2012). Antibacterial metabolites synthesized by psychrotrophic bacteria isolated from cold-freshwater environments. *Folia Microbiol.* 1–7.
- Bentley R (2000). Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem. Rev.* 100:3801–3826.
- Belsito D, Bickers D, Bruze M, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, Sipes IG, Tagami H (2007). A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 45:S1–23.
- Berbee M, Yoshimura A, Sugiyama J, Taylor J (1995). Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 87:210–222.
- Berdy J (1980). Bleomycin-type antibiotics. En: Amino acid and peptide antibiotics. Handbook of antibiotic compounds, (CRC Press; Boca Ratón), pp. 459–491.
- Van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen AJM, Garcia-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WHM, *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* 26:1161–1168.
- Bisby F, Roskov Y, Orrell T, Nicolson D, Paglinawan L, Bailly N, Kirk, P, Bourgoin T, Baillargeon G, Ouvrard D (2012). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 30th May 2012.
- Blomquist G, Andersson B, Andersson K, Brondz I (1992). A new method for characterization of molds. *J. Microb. Methods* 16:59–68.
- Borroto-Esoda K, Myrick F, Feng J, Jeffrey J, Furman P (2004). *In vitro* combination of amdoxovir and the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitors mycophenolic acid and ribavirin demonstrates potent activity against wild-type and drug-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4387–4394.
- Bos JL (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49:4682–4689.
- Box G, Hunter J (1978). Statistics for Experimenters: An introduction to design, data analysis and model building. (Wiley; New York).



- Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L (1996). Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology* 142:541–549.
- Boysen ME, Jacobsson KG, Schnürer J (2000). Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1523–1526.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Calvert MJ, Ashton PR, Allemann RK (2002). Germacrene A is a product of the aristolochene synthase-mediated conversion of farnesylpyrophosphate to aristolochene. *J. Am. Chem. Soc.* 124:11636–11641.
- Campos C, Cuadra T, Rodríguez G, Fernández F (2007). Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49:88–89.
- Cane D, Prabhakaran E, Salaski E, Harrison P, Noguchi H, Rawlings BJ (1989). Aristolochene biosynthesis and enzymatic cyclization of farnesyl pyrophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 111:8914–8916.
- Cane D., Kang I (2000). Aristolochene synthase: purification, molecular cloning, high-level expression in *Escherichia coli*, and characterization of the *Aspergillus terreus* cyclase. *Arch. Biochem. Biophys.* 376:354–364.
- Cane DE, Rawlings BJ, Yang CC (1987). Isolation of (-)-gamma-cadinene and aristolochene from *Aspergillus terreus*. *J. Antibiot.* 40:1331–1334.
- Cane DE, Wu Z, Proctor RH, Hohn TM (1993). Overexpression in *Escherichia coli* of soluble aristolochene synthase from *Penicillium roqueforti*. *Arch. Biochem. Biophys.* 304:415–419.
- Cantoral JM, Díez B, Barredo L, Alvarez E, Martín JF (1987). High-frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* 5:494–497.
- De Carli L, Larizza L (1988). Griseofulvin. *Mutat. Res.* 195:91–126.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday G (2001). *The fungi* 2<sup>nd</sup> ed (Academic Press, San Diego).
- Caruthers JM, Kang I, Rynkiewicz MJ, Cane DE, Christianson DW (2000). Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *J. Biol. Chem.* 275:25533–25539.

- Casqueiro J, Gutiérrez 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.
- Chang SC, Tsai DL, Wei HY (1998). Isolation, purification, and characterization of the PR oxidase from *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:5012–5015.
- Chang SC, Ho C, Cheng M (2004). Isolation, purification and characterization of the PR-amide synthetase from *Penicillium roqueforti*. *Fung. Sci.* 19:117–123.
- Chang SC, Lu CY, Li SY, Wei YH (1991a). Potentiation effect of corn extract on the production of eremofortin C, EC oxidase, and PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B* 15:153–159.
- Chang SC, Lu KL, Yeh SF (1993). Secondary metabolites resulting from degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:981–986.
- Chang SC, Wei YH, Liu ML, Wei RD (1985). Isolation and some properties of the enzyme that transforms Eremofortin C to PR toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1455–1460.
- Chang SC, Wei YH, Wei DL, Chen YY, Jong SC (1991b). Factors affecting the production of eremofortin C and PR toxin in *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2581–2585.
- Chang SC, Yeh SF, Li SY, Lei WY, Chen MY (1996). A novel secondary metabolite relative to the degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Curr. Microbiol.* 32:141–146.
- Chen FC, Chen CF, Wei RD (1982). Acute toxicity of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Toxicon* 20:433–441.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156–159.
- Clutterbuck PW, Oxford AE, Raistrick H, Smith G (1932). Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochem. J.* 26:1441–1458.
- Cobb G (1998). Introduction to design and analysis of experiments (Springer, New York).
- Collis CM, Hall RM (1985). Identification of a Tn5 determinant conferring resistance to phleomycins, bleomycins, and tallysomycins. *Plasmid* 14:143–151.
- Cooper M, Salvadori M, Budde K, Oppenheimer F, Sollinger H, Zeier M (2012). Enteric-coated mycophenolate sodium immunosuppression in renal transplant patients: efficacy and dosing. *Transplant. Rev. (Orlando)* 26:233–240.

- Crawford JM, Townsend CA (2010). New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:879–889.
- Demyttenaere JCR, Adams A, Van Belleghem K, De Kimpe N, König WA, Tkachev AV (2002). De novo production of (+)-aristolochene by sporulated surface cultures of *Penicillium roqueforti*. *Phytochemistry* 59:597–602.
- Demyttenaere JCR, Moraña RM, Sandra P (2003). Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *J. Chromatogr. A.* 985:127–135.
- Devi SB, Devi TS, Ningshen R, Devi KR, Singh TB, Singh, NB (2009). *Penicillium morneffeii*, an emerging AIDS-related pathogen--a RIMS study. *J. Indian. Med. Assoc.* 107:208–210.
- Diamond MS, Zachariah M, Harris E (2002). Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304:211–221.
- Drocourt D, Calmels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G (1990). Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 18:4009.
- Duraipandiyar V, Al-Harbi NA, Ignacimuthu S, Muthukumar C (2012). Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex.Retz.) Sm. *BMC Complement Altern. Med.* 12:13.
- Elander R (1967). Enhanced penicillin biosynthesis in mutant and recombinant strains of *Penicillium chrysogenum*. In: *Induced Mutations and Their Utilization*, (Academie-Verlag, Berlin), pp. 403–423.
- Elander R, Corum J, DeValeria H, Wilgus R (1976). Ultraviolet mutagenesis and cephalosporin biosynthesis in strains of *Cephalosporium acremonium*. In: *Genetics of Industrial Microorganisms*, (Academic Press, New York and London), pp. 253–271.
- Epinette WW, Parker CM, Jones EL, Greist MC (1987). Mycophenolic acid for psoriasis. A review of pharmacology, long-term efficacy, and safety. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17:962–971.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6–13.
- Felicetti B, Cane DE (2004). Aristolochene synthase: mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* 126:7212–7221.

- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, Camafeita E, López JA, Cantoral JM, Jorrín J (2006). Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* 6:S88–96.
- Fernández-Bodega MA (2010). Aislamiento y caracterización de cepas de *Penicillium roqueforti* a partir de distintas variedades de queso azul. Análisis de la actividad proteolítica y eliminación de la producción de micotoxinas. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Fernández-Bodega MA, Mauriz E, Gómez A, Martín JF (2009). Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 136:18–25.
- Fink-Gremmels J (2008a). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food. Addit. Contam. A* 25:172–180.
- Fink-Gremmels J (2008b). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet. J.* 176:84–92.
- Finoli C, Vecchio A, Galli A, Dragoni I (2001). Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J. Food Prot.* 64:246–251.
- Fleming A (1929). On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10:226–236.
- Fraga BM (2011). Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 28:1580–1610.
- Frisvad F, Smedsgaard J, Larsen T, Samson R (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 49:201–242.
- Frisvad JC (1981). Physiological criteria and mycotoxin production as AIDS in identification of common asymmetric penicillia. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:568–579.
- García-Estrada C, Ullán RV, Albillos SM, Fernández-Bodega MA, Durek P, Von Döhren H, Martín JF (2011). A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* 18:1499–1512.
- Genilloud O, Garrido MC, Moreno F (1984). The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene* 32:225–233.
- Gock MA, Hocking AD, Pitt JI, Poulos PG (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 81:11–19.

- Goldblatt LA (1972). Implications of mycotoxins. *Clin. Toxicol.* 5:453–464.
- Golding NS (1945). The Gas Requirements of Molds. IV. a Preliminary Interpretation of the Growth Rates of Four Common Mold Cultures on the Basis of Absorbed Gases. *J. Dairy Sci.* 28:737–750.
- Gosio B (1893). Sperimentate su culture pure di bacilli del carbonchio dimostrano notevole potere antisettica. *R. Acad. Med. Torino* 61:484.
- Gosio B (1896). Recherche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. *Riv. Ig. Sanita Pubblica Ann.* 7:825–868.
- Govindachari TR, Mohamed PA, Parthasarathy PC (1970). Ishwarane and aristolochene, two new sesquiterpene hydrocarbons from *Aristolochia indica*. *Tetrahedron* 26:615–619.
- Graaf MR, Richel DJ, Van Noorden CJF, Guchelaar HJ (2004). Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30:609–641.
- Grazia L, Romano P, Roggiani D, Gugliemi G (1986). The role of moulds in the ripening process of salami. *Food Microbiol.* 3:15–25.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293–296.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557–580.
- Hanahan D (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA cloning: a practical approach, (IRL Press Limited; Oxford, England), pp. 109–135.
- Hansen ME, Andersen B, Smedsgaard J (2005). Automated and unbiased classification of chemical profiles from fungi using high performance liquid chromatography. *J. Microbiol. Methods* 61:295–304.
- Hauschild JP, Wapelhorst E, Müller J (2007). Mass spectra measured by a fully integrated MEMS mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* 264:53–60.
- Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem.* 75:1300–1306.
- Healy J (1999). Pliny the Elder on science and technology. (Oxford University Press; Oxford).
- Hertzberg RP, Caranfa MJ, Hecht SM (1985). DNA methylation diminishes bleomycin-mediated strand scission. *Biochemistry* 24:5286–5289.

- Hohn TM, Plattner RD (1989). Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase aristolochene synthase from *Penicillium roqueforti*. *Arch. Biochem. Biophys.* 272:137–143.
- Holmes DS, Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193–197.
- Hoskins JA, O’Callaghan N, Queener SW, Cantwell CA, Wood JS, Chen VJ, Skatrud PL (1990). Gene disruption of the *pcbAB* gene encoding ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.* 18:523–530.
- Houbraken, J., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. (2010). Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. *IMA Fungus* 1:171–180.
- Hsieh KP, Yu S, Wei YH, Chen CF, Wei RD (1986). Inhibitory effect in vitro of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, on the mitochondrial HCO-3-ATPase of the rat brain, heart and kidney. *Toxicon* 24:153–160.
- Jami MS, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado AA, Salehi-Najafabadi Z, Martín JF (2010). 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.
- Janus D, Hoff B, Hofmann E, Kück U (2007). An efficient fungal RNA-silencing system using the *DsRed* reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:962–970.
- Jard G, Liboz T, Mathieu F, Guyonvarc’h A, Lebrihi A (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam. A* 28:1590–1609.
- Jelen HH (2002). Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. *J. Agric. Food Chem.* 50:6569–6574.
- Jelen HH, Mirocha CJ, Wasowicz E, Kamiński E (1995). Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3815–3820.
- Jenkins S (1996). *Cheese Primer* (Workman Publishing Company; New York).
- Julianti T, Hata Y, Zimmermann S, Kaiser M, Hamburger M, Adams M (2011). Antitrypanosomal sesquiterpene lactones from *Saussurea costus*. *Fitoterapia* 82:955–959.
- Keller N, Hohn T (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 21:17–29.
- Kennedy M, Krouse D (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 23:456–475.

- Klein E, Rojahn W (1970). (-)-7 $\beta$ -10 $\alpha$ -selina-4,11-dien und (+)-5 $\beta$ ,7 $\beta$ ,10 $\alpha$ -selina-3,11-dien zwei neue sesquiterpene der eudesmanreihe. *Tetrahedron Lett.* 11:279–282.
- Klose J (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26:231–243.
- Kosalková 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.
- Koetter JWA, Schulz GE (2005). Crystal structure of 6-hydroxy-D-nicotine oxidase from *Arthrobacter nicotinovorans*. *J. Mol. Biol.* 352:418–428.
- Kosemura S, Miyata H, Matsunaga K, Yamamura S (1992). Biosynthesis of citreohybridones, the metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Lett.* 33:3883–3886.
- Kosemura S, Miyata H, Yamamura S, Albone K, Simpson TJ (1994). Biosynthetic studies on citreohybridones, metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *J. Chem. Soc. Perk.* T1 135–139.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lafont P, Siriwardana MG, Combemale I, Lafont J (1979). Mycophenolic acid in marketed cheeses. *Food Cosmet. Toxicol.* 17:147–149.
- Larsen MD, Kristiansen KR, Hansen TK (1998). Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 43:215–221.
- Lawrence B, Hogg J (1973). Ishwarance in *Bixa orellana* leaf oil. *Phytochemistry* 12:2995.
- Leiter E, Marx F, Pusztahelyi T, Haas H, Pócsi I (2004). *Penicillium chrysogenum* glucose oxidase -- a study on its antifungal effects. *J. Appl. Microbiol.* 97:1201–1209.
- Li SY, Chang SC, Wei RD (1985). Chemical transformation of eremofortin C into PR toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:729–731.
- Lomascolo A, Dubreucq E, Perrier V, Galzy P, Grimaud J (1994). Mycelial lipid composition of three *Penicillium* strains. *J. Dairy Sci.* 77:2160–2167.

- López-Díaz TM, Román-Blanco C, García-Arias MT, García-Fernández MC, García-López ML (1996). Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. *Int. J. Food Microbiol.* 30:391–395.
- López-Nieto M, Ramos F, Martín JF (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of  $\alpha$ -amino adipyl-cisteinylvaline in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:343–351.
- Lugauskas A, Raila A, Railiene M, Raudoniene V (2006). Toxic micromycetes in grain raw material during its processing. *Ann. Agric Environ. Med.* 13:147–161.
- Maeda RN, Da Silva MMP, Santa Anna LMM, Pereira, N (2010). Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161:411–422.
- Maheva E, Djelveh G, Larroche C, Gross J (1984). Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Lett.* 6:97–102.
- Margaritora S, Cesario A, Venanzio Porziella V, Granone P, Catassi A, Russo P (2005). Farnesyltransferase Inhibitors: Overview of their action and role in solid malignancy therapy. *Letts. Drug Des. Discov.* 2:26–35.
- Martín J, García-Estrada C, Kosalková K, Ullán RV, Albillos SM, Martín JF (2012). The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine produce a drastic increase in the expression of the penicillin biosynthetic genes for prolonged time, mediated by the *laeA* regulator. *Fungal Genet. Biol.* 49:1004–1013.
- Martín JF, Liras P (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:173–206.
- Massart D, Vandeginste B, Deming S, Michotte Y, Kaufman L (1988). Chemometrics: A textbook (Elsevier Science Publishers; Amsterdam).
- McKenzie T, Hoshino T, Tanaka T, Sueoka N (1986). The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* 15:93–103.
- Miller J (1972). Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor; New York).
- Modler HW, Brunner JR, Stine CM (1974). Extracellular protease of *Penicillium roqueforti*. I. Production and characteristics of crude enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* 57:523–527.
- Moreau C (1980). Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, interet en industrie fromagere, mycotoxines. *Lait* 60:254–271.



- Moreau S, Cacan M (1977). Eremofortin C. A new metabolite obtained from *Penicillium roqueforti* cultures and from biotransformation of PR toxin. *J. Org. Chem.* 42:2632–2634.
- Moreau S, Lablache-Combier A, Biguet J (1980). Production of eremofortins A, B, and C relative to formation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:770–776.
- Moreau S, Gaudemer A, Lablache-Combier A, et Biguet J (1976) Metabolites de *Penicillium roqueforti*: PR toxine et metabolites associes. *Tetrahedron Lett.* 11:833–834.
- Morgavi D, Riley R (2007). An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Anim. Feed Sci. Tech.* 137:201–212.
- Moulé Y, Jammali M, Darracq N (1978). Inhibition of protein synthesis by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *FEBS Lett.* 88:341–344.
- Moulé Y, Jemmali M, Rousseau N (1976). Mechanism of the inhibition of transcription by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Chem. Biol. Interact.* 14:207–216.
- Moulé Y, Moreau S, Bousquet JF (1977). Relationships between the chemical structure and the biological properties of some eremophilane compounds related to PR toxin. *Chem. Biol. Interact.* 17:185–192.
- Mu W, Chen C, Li X, Zhang T, Jiang B. (2009). Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus sp.* SK007. *Bioresour. Technol.* 100:1366–1370.
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335–350.
- Nicolás FE, De Haro JP, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM (2007). Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genet. Biol.* 44:504–516.
- Nicoletti R, De Stefano M, De Stefano S, Trincone A, Marziano F (2004). Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates. *Mycopathologia* 158:465–474.
- Nielsen KF, Dalsgaard PW, Smedsgaard J, Larsen TO (2005). Andrastins A-D, *Penicillium roqueforti* metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese. *J. Agric. Food. Chem.* 53:2908–2913.
- Nielsen KF, Sumarah MW, Frisvad JC, Miller JD (2006). Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *J. Agric. Food Chem.* 54:3756–3763.

- Niessen W (2006). Liquid chromatography-mass spectrometry (Taylor and Francis Group; New York).
- O'Brien M, Egan D, O'kiely P, Forristal PD, Doohan FM, Fuller HT (2008). Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycol. Res.* 112:921–932.
- O'Brien M, Nielsen KF, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54:9268–9276.
- O'Farrell PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007–4021.
- Omura S, Inokoshi J, Uchida R, Shiomi K, Masuma R, Kawakubo T, Tanaka H, Iwai Y, Kosemura S, Yamamura S (1996). Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium sp.* FO-3929. I. Producing strain, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.* 49:414–417.
- Orofino-Kreuger MR, Grootjans S, Biavatti MW, Vandenabeele P, D'Herde K (2012). Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anticancer Drugs* 23: 883–896.
- Otto M (1999). Modeling: multiple linear regression. En: Chemometrics, statistics and computer application in analytical chemistry. (Wiley VCH; Weinheim), pp. 192–214.
- Overy DP, Larsen TO, Dalsgaard PW, Frydenvang K, Phipps R, Munro MHG, Christophersen C (2005). Andrastin A and barceloneic acid metabolites, protein farnesyl transferase inhibitors from *Penicillium albocoremium*: chemotaxonomic significance and pathological implications. *Mycol. Res.* 109:1243–1249.
- Pasanen AI, Lappalainen S, Panasen P (1996). Voltaire organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins. *Analyst* 121:949–1953.
- Pitt J (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphs *Eupenicillium* and *Talaromyces*. (London: Academic Press).
- Pitt J, Hocking A (2009). Fungi and food spoilage (Springer; New York).
- Pitt JI (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium species*: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* 65:1135–1157.
- Polonelli L, Morace G, Delle Monache F, Samson RA (1978). Studies on the PR toxin of *Penicillium roqueforti*. *Mycopathologia* 66:99–104.

- Proctor RH, Hohn TM (1993). Aristolochene synthase. Isolation, characterization, and bacterial expression of a sesquiterpenoid biosynthetic gene (*Ari1*) from *Penicillium roqueforti*. *J. Biol. Chem.* 268:4543–4548.
- Queener SW, McDermott J, Radue AB (1975). Glutamate dehydrogenase specific activity and cephalosporin C synthesis in the M8650 series of *Cephalosporium acremonium* mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:646–651.
- Raper K, Thom C (1949). A manual of the *Penicillia* (Williams & Wilkins Co; Baltimore).
- Rasmussen RR, Rasmussen PH, Larsen TO, Bladt TT, Binderup ML (2011). *In vitro* cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food Chem. Toxicol.* 49:31–44.
- Rasmussen RR, Storm IMLD, Rasmussen PH, Smedsgaard J, Nielsen KF (2010). Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 397:765–776.
- Regueira TB, Kildegaard KR, Hansen BG, Mortensen UH, Hertweck C, Nielsen J (2011). Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3035–3043.
- Rundberget T, Skaar I, Flåøyen A (2004). The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *Int. J. Food Microbiol.* 90:181–188.
- 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.
- Sadhukhan AK, Murthy MR, Kumar RA, Mohan EVS, Vandana G, Bhar C, Rao KV (1999). Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 1:33–38.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York).
- Samson R, Houbraken J, Thrane J, Frisvad J, Andersen B (2010). Food and indoor fungi, CBS laboratory manual series 2:CBS-Fungal Biodiversity Centre, Utrecht. (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre).
- Samson RA, Eckardt C, Orth R (1977). The taxonomy of *Penicillium* species from fermented cheeses. *Antonie Van Leeuwenhoek* 43:341–350.
- Samson RA, Gams W (1984). The taxonomic situation in the hyphomycete genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 50:815–824.

- Sandu C, Chiribau CB, Brandsch R (2003). Characterization of *HdnoR*, the transcriptional repressor of the 6-hydroxy-D-nicotine oxidase gene of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, and its DNA-binding activity in response to L- and D-nicotine derivatives. *J. Biol. Chem.* 278:51307–51315.
- Saxena S, Saxena RK (2004). Statistical optimization of tannase production from *Penicillium variable* using fruits (chebulic myrobalan) of *Terminalia chebula*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39:99–106.
- Schoch CL, Sung GH, López-Giráldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny PB, Kauff F, Wang Z, *et al.* (2009). The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst. Biol.* 58:224–239.
- Schoch U, Luthy J, Schlatter C (1984). Subchronic toxicity testing of moldripened chesse. *Z. Lebensm Unters For.* 179:99–103.
- Scott P (1981). Toxins of *Penicillium* species used in cheese manufacture. *J. Food Protect.* 44:702–710.
- Scott PM, Kanhere SR (1979). Instability of PR toxin in blue cheese. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 62:141–147.
- Scott PM, Kennedy BP, Harwig J, Blanchfield BJ (1977). Study of conditions of production of roquefortine and other metabolites of *Penicillin roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:249–253.
- Scudamore KA, Livesey CT (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agr.* 77:1–17.
- Shen YQ, Heim J, Solomon NA, Wolfe S, Demain AL (1984). Repression of beta-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* 37:503–511.
- Shetty AS, Gaertner FH (1975). Kynureninase-Type enzymes of *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, and *Pseudomonas fluorescens*: further evidence for distinct kynureninase and hydroxykynureninase activities. *J. Bacteriol.* 122:235–244.
- Shimp JL, Kinsella JE (1977). Lipids of *Penicillium roqueforti*. Influence of culture temperature and age on unsaturated fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 25:793–799.
- Siemens K, Zawistowski J (1992). Determination of *Penicillium roqueforti* toxin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 609:205–211.
- Siemens K, Zawistowski J (1993). Occurrence of PR imine, a metabolite of *Penicillium roqueforti*, in blue cheese. *J. Food. Prot.* 56:317–319.

- Sladic D, Gasic MJ (2006). Reactivity and biological activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol and related compounds from sponges of the order *Dictyoceratida*. *Molecules* 11:1–33.
- Smith CM, Fontenelle LJ, Muzik H, Paterson AR, Unger H, Brox LW, Henderson JF (1974). Inhibitors of inosinate dehydrogenase activity in *Ehrlich ascites* tumor cells *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 23:2727–2735.
- Smith G (1960). An introduction to industrial mycology (Edward Arnold Ltd; London).
- Soriano del Castillo J (2007). Micotoxinas en alimentos. (Díaz de Santos; Madrid, España).
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503–517.
- de Souza JJ, Vieira IJC, Rodrigues-Filho E, Braz-Filho R (2011). Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules* 16:10604–10618.
- Stephenson SL (2010). The kingdom fungi: The biology of mushrooms, molds, and lichens (Timber Press; Chicago).
- Torrenegra R, Baquero J, Calederon J (2005). Antibacterial activity and complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignment of mycophenolic acid isolated from *Penicillium verrucosum*. *Rev. Lat. Am. Quim.* 33:76–81.
- Tressler RJ, Garvin LJ, Slate DL (1994). Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors *in vivo*. *Int. J. Cancer* 57:568–573.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.* 13:3191–3197.
- Uchida R, Shiomi K, Inokoshi J, Sunazuka T, Tanaka H, Iwai Y, Takayanagi H, and Omura S (1996a). Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium sp.* FO-3929. II. Structure elucidation and biosynthesis. *J. Antibiot.* 49:418–424.
- Uchida R, Shiomi K, Inokoshi J, Tanaka H, Iwai Y, Omura S (1996b). Andrastin D, novel protein farnesyltransferase inhibitor produced by *Penicillium sp.* FO-3929. *J. Antibiot.* 49:1278–1280.
- Ullán RV, Godio RP, Teijeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltrer R, Kosalkova K, Martín JF (2008). RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression. *J. Microbiol. Methods* 75:209–218.

- Vögeli U, Freeman JW, Chappell J (1990). Purification and characterization of an inducible sesquiterpene cyclase from elicitor-treated tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 93:182–187.
- Wei R, Schnoes H, Hart P, Strong F (1975). The structure of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Tetrahedro* 31:109–114.
- Wei RD, Liu GX (1978). PR toxin production in different *Penicillium roqueforti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:797–799.
- Wei RD, Still PE, Smalley EB, Schnoes HK, Strong FM (1973). Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.* 25:111–114.
- Wei YH, Ding WH, Wei RD (1984). Biochemical effects of PR toxin on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 230:400–411.
- Wells JM, Payne JA (1975). Toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* isolates from weevil-damaged chestnuts. *Appl. Microbiol.* 30:536–540.
- Yanamandra U, Anantaram J, Subramanian S, Sharma M, Hazra N, Nair V (2011). *Penicilliosis* presenting as fungating skin lesion. *J. Infect. Chemother.* 17:700–702.
- Zeringue HJ, Bhatnagar D, Cleveland TE (1993). C(15)H(24) Volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2264–2270.
- Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990). Mini-prep in ten minutes. *BioTechniques* 8:172–173.
- Zidorn C (2006). Sesquiterpenoids as chemosystematic markers in the subtribe Hypochaeridinae (Lactuceae, Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 34:144–159.
- Zolezzi M (2005). Mycophenolate sodium versus mycophenolate mofetil: A review of their comparative features. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 16:140.