



CLONACIÓN Y SOBREEXPRESIÓN DEL GEN REGULADOR GLOBAL *laeA* EN *Aspergillus terreus* TUB-514: EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA

T. Pérez-Aguirre, A. Mejía-Álvarez, F. Fierro-Fierro, J. Barrios-González

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F. Fax: 58044712. Correo electrónico: kashia003@yahoo.com.mx

Palabras clave: *A. terreus*, *lovastatina*, *laeA*

Introducción. La lovastatina (LOV) es un metabolito secundario (MS) producido por *Aspergillus terreus*; el cual es muy valioso para la industria farmacéutica por su actividad hipocolesterolémica. El éxito en una industria de la fermentación depende del mejoramiento continuo de la cepa. Una opción sofisticada de mejoramiento genético molecular es la amplificación de genes regulatorios positivos (1). *LaeA* es un regulador global (positivo) conectado a la vía de señalización C'AMP-PKA, y participa en la expresión de genes de MS en *Aspergillus*. *laeA* codifica para una proteína metiltransferasa, la cual regula dichos genes remodelando la cromatina (2).

En este trabajo se clonó y evaluó la sobreexpresión del gen regulador *laeA* (*SE::laeA*) en *A. terreus* TUB-514 sobre la producción de lovastatina en fermentación sólida (FS) y fermentación líquida (FL).

Metodología. Se probaron 2 estrategias para la *SE::laeA*. a) La expresión de *laeA* con su propio promotor (en pULC43) y b) con un promotor constitutivo (*gpdA* en pAN52.1) (3). Se transformaron protoplastos (3) y se preseleccionaron transformantes por su producción de lovastatina en fermentación en cilindros de agar (FCA), después se evaluó su producción en FS y FL.

Resultados y discusión. El gen *laeA* con su propio promotor y terminador se obtuvo por PCR como un fragmento de 2.6kpb con cortes BamHI; mientras que el gen *laeA* cds se obtuvo como un fragmento de 1.25kpb, con cortes NcoI y BamHI. Después de confirmar su identidad por secuenciación, el gen *laeA* completo se clonó en el sitio BamHI de pULC43, generando el plásmido pUAMTPa, de 7.5kb. Por otro lado, la región codificadora del gen *laeA* se clonó en los sitios NcoI y BamHI de pAN52.1, formando el plásmido pUAMTPc con 6.75kb. Finalmente se seleccionaron 2 transformantes de cada tipo (por su producción en FCA) y se evaluó su producción en FS y en FL. La mejor productora en FS fue la T2C (transformada con pUAMTPc), con un incremento en la producción de lovastatina de 140% ($p > 0.0001$) con respecto a la parental. La cepa transformada con

pUAMTPa (T13A) también tuvo un importante incremento (77%) ($p > 0.0001$) en FS. En FL, las transformantes T14A y T5C mostraron un importante incremento en la producción de lovastatina, con 102 y 97% respectivamente ($p > 0.0001$). Estos resultados concuerdan con lo observado en la producción de esterigmatocistina y penicilina en *A. nidulans* (2).

Cuadro 1. Producción de LOV de transformantes

Transformantes	FS (mg lov/gr ms)	Incremento en FS (%)	FL (mg lov/mL)	Incremento en FL (%)
Parental	7.24±0.53 ^c		0.67±0.019 ^c	
T13A	12.82±1.58 ^b	77	0.93±0.037 ^b	40
T14A	7.92±0.71 ^c	9.5	1.35±0.071 ^a	102
T2C	17.37±0.95 ^a	140	0.60±0.034 ^c	-9
T5C	12.04±0.79 ^b	66.4	1.31±0.057 ^a	97

Nota: valores con letras iguales no difieren significativamente

Conclusiones. 1) Se demostró que la sobreexpresión del gen *laeA* incrementa la producción de lovastatina de *A. terreus*, en FS y FL. 2) Esta estrategia representa un excelente método de mejoramiento genético para construir cepas sobreproductoras para ambos sistemas de cultivo. 3) Los resultados indicaron que sobreexpresar *laeA* desde un promotor constitutivo es más efectivo para construir sobreproductoras para FS. 4) Expresarlo de su propio promotor resultó efectivo para ambas, FS y FL.

Agradecimiento. A CONACYT por el financiamiento de la investigación (N_o Becario 203425).

Bibliografía.

- Barrios-González, J., Fernández, F. J. & Tomasini, A. (2003). Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian J of Biotechnol.* 2:322-333.
- Woo, B. J. & Keller, P. N. (2004). *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell.* 3(2):527-535.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E. & Timberlake, W. E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using *trpC* plasmid. *P Natl Acad Sci U.S.A.* 81:1470-1474.