



OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES DE *Penicillium chrysogenum* ATENUADOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO AP-1: PcYap1 y RsmA

¹Wylma D. Pérez Pérez, ¹Javier Barrios González, ²Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz, ¹Francisco Fierro Fierro

¹UAM Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios.

²UAM Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México, D.F. C.P. 09340. Tel. (55) 5804 6438, correo: wdp_0123@hotmail.com

Palabras clave: *Penicillium chrysogenum*, Factores transcripcionales AP-1, RNAi,

Introducción. Los factores transcripcionales AP-1 son proteínas de unión a ADN del tipo bZIP (cremallera de leucina) [1] que activan la transcripción como parte de la regulación de la expresión génica en respuesta a diferentes estímulos. Han sido descritos en diferentes hongos filamentosos, tal es el caso de AfYap1 de *Aspergillus fumigatus* [2] y RsmA de *Aspergillus nidulans* [3], estos intervienen en la regulación de la respuesta al estrés oxidativo y en la regulación del metabolismo secundario respectivamente.

Nuestro objetivo es estudiar la función de los factores transcripcionales PcYap1 y RsmA de *Penicillium chrysogenum*. Para ello se han obtenido transformantes con plásmidos que permiten la atenuación de la expresión de dichos factores mediante la vía RNAi.

Metodología. Se utilizó el plásmido pGpdPki-RNAi, que contiene los promotores de los genes *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pki* (piruvato quinasa) enfrentados y separados por un sitio de restricción *NcoI*. Los insertos se amplificaron por PCR usando primers que anillaban en el exón 2 del gen *PcYap1* y en el exón 3 del gen *RsmA*. A continuación se insertaron en el sitio *NcoI* del vector.

Las construcciones se transformaron en la cepa Wisconsin 54-1255 de *Penicillium chrysogenum* por medio de protoplastos y selección con fleomicina.

Resultados.

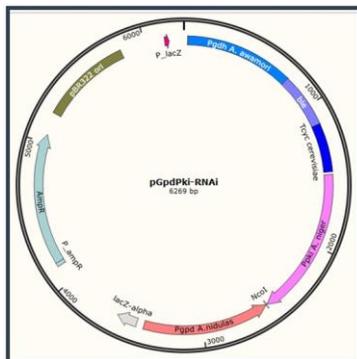


Figura 1. A la izquierda el mapa del plásmido pGpdPki-RNAi, y en la parte de abajo el esquema de los genes *PcYap1* y *RsmA*, indicándose con rectángulos la posición de los intrones de los genes, y con flechas la posición de los primers utilizados para amplificar los fragmentos que se insertaron en el sitio *NcoI* del plásmido.

En la figura 1 se observa el diseño que se hizo para la obtención de las construcciones pGpdPki-RNAi/*PcYap1* y pGpdPki-RNAi/*RsmA*. Se obtuvieron por lisis alcalina el plásmido pGpdPki-RNAi y por PCR los fragmentos de cada gen para posteriormente obtener los plásmidos de atenuación (figura 2) que se utilizaron para la transformación de *Penicillium chrysogenum*. Algunos de los transformantes obtenidos se muestran en la figura 3.

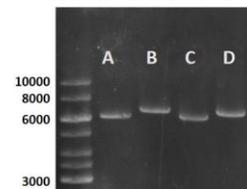
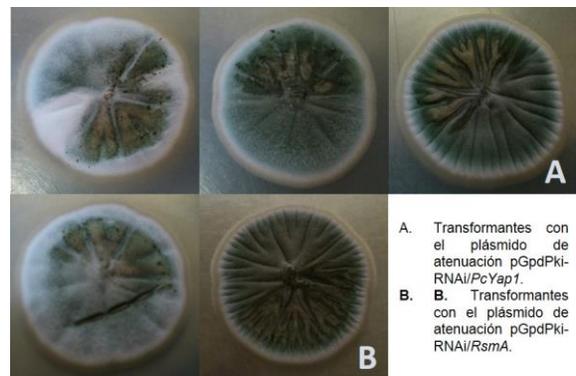


Figura 2. Se muestran las digestiones hechas para confirmar la formación de los plásmidos de atenuación de *PcYap1* y *RsmA*, cuando se digiere con *NcoI* se separa el plásmido del inserto y en las digestiones con *KpnI* se lineariza la construcción por ello la diferencia en los tamaños las bandas

A: pGpdPki-RNAi/*PcYap1* digerido con *NcoI*
B: pGpdPki-RNAi/*PcYap1* digerido con *KpnI*
C: pGpdPki-RNAi/*RsmA* digerido con *NcoI*
D: pGpdPki-RNAi/*RsmA* digerido con *KpnI*



A. Transformantes con el plásmido de atenuación pGpdPki-RNAi/*PcYap1*.
B. Transformantes con el plásmido de atenuación pGpdPki-RNAi/*RsmA*.

Figura 1. Transformantes obtenidas.

Conclusiones. Se obtuvieron las construcciones de los plásmidos de atenuación de los genes *PcYap1* y *RsmA*, y transformantes de *P. chrysogenum* con estas construcciones, Estos transformantes se caracterizarán en su morfología, fisiología y producción de metabolitos secundarios.

Agradecimiento. Se agradece a CONACyT por la financiación y beca otorgada.

Bibliografía.

[1] Rodrigues-Pousada C, Menezes R A y Pimentel C. 2010. *Yeast*. 27: 245-258.
[2] Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A y Brakhage AA. 2007. *Eukaryot. Cell* 7: 2290-2302.
[3] Yin W-B, Amaike S, Wohlbach DJ, Gasch AP, Chiang Y-M, Wang CCC, Bok JW, Rohlf M y Keller NP. 2012. *Mol. Microbiol.* 83: 1024-1034.