



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Universidad de Salamanca

**Departamento de Microbiología y
Genética**

**Optimización de la producción de riboflavina en
Ashbya gossypii basada en el análisis funcional de
las rutas de recuperación de nucleobases de
purina.**

José Antonio Uña Álvarez

Tesis Doctoral

2013



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Dr. Luís Román Fernández Lago, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA: Que la memoria titulada “Optimización de la producción de riboflavina en *Ashbya gossypii* basada en el análisis funcional de las rutas de recuperación de nucleobases de purina”, presentada por D. José Antonio Uña Álvarez para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^a Ángeles Santos García y del Dr. José Luis Revuelta Doval, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste expide el presenta certificado en:

Salamanca a de de 2013

Fdo. Dr. Luís Román Fernández Lago



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Dra. M^a Ángeles Santos García, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y

Dr. José Luis Revuelta Doval, Catedrático de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN: Que el doctorando José Antonio Uña Álvarez ha realizado en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, bajo su dirección, el trabajo titulado “Optimización de la producción de riboflavina en *Ashbya gossypii* basada en el análisis funcional de las rutas de recuperación de nucleobases de purina”, para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, y como directores del trabajo, expiden el presente certificado en:

Salamanca a de de 2013

Fdo: Dra. M^a Ángeles Santos García.

Fdo. Dr. José Luis Revuelta Doval

A mis padres.

Ninguna tesis se escribe en total soledad, ni es fruto de un solo par de manos, ni de una sola mente. Tampoco se deben olvidar todos aquellos hombros que han cargado con tanto peso durante este tiempo. Unas breves líneas no harán justicia de todo lo que se debe agradecer. Pero aspiro en el día a días a que esa justicia sea hecha.

Agradezco:

A los directores de este trabajo: Dra. Santos y Dr. Revuelta por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo y la dirección y determinación con la que lo habéis seguido. Y también por darme a conocer de primera mano cómo es ser un biólogo de bata.

A la Junta de Castilla y León y Fondo Social Europeo por la concesión de la Beca para la realización de esta Tesis Doctoral. Y por la financiación de este trabajo mediante el Proyecto Ref. SA098A09 de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León.

A mis compañeros de laboratorio tanto pasados como presentes: Fernando, Alberto, Rubén, Rodrigo, José Miguel, Rafa y las niñas: Patri, Cris, Lola, Silvia, Sole, Patri la Nueva y Cris (no, no cambio y no os voy a distinguir por el nombre). Porque de todos es un pedacito de esta tesis. Especialmente a Angie por creer en mis capacidades; y aunque a veces tengamos puntos de vista diferentes el objetivo no cambia.

A mis compañeros de facultad, especialmente a los que siguen perdidos por aquí o casi: Guille, Javi, Charli, Ana, Abe, Pi, Raúl (todavía una caja de puntas tiene tu nombre...) que tantas horas y vicios hemos compartido.

A la gente del departamento, tanto los que siguen en estas tierras como los que colonizaron otras nuevas, por las tertulias de las horas de comer, cenas y esas pachanguitas de baloncesto tan buenas (prometo que volveré a jugar). Especialmente a Pedrito que además es mi rastreador de artículos raros.

A mis compañeros del Insycal, que aunque este año nos quedáramos sin jugar, seguimos siendo más equipo fuera de la cancha que dentro.

A los de siempre Señor Rober, Ale, Jorgito, Chema, con vosotros los problemas se diluyen. Bicha lo tuyo es trampa que te has ido pa tierras mu lejanas.

A mi familia, mis padres, mi herma, tíos, primos, abuelos que habéis estado pendientes en todo momento ¿Y cuándo no? Porque con vuestro apoyo habéis hecho que esto sea posible.

ABREVIATURAS

2,8-DHA	2,8-dihidroxiadenina
ADP	Adenosina-5'-difosfato
<i>Ag</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
AICAR	5-aminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido
AICAR	5-aminoimidazol 4-carboxamida
AIR	5-aminoimidazol ribonucleótido
AK	adenina quinasa
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
APRT	adenina fosforribosiltransferasa
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BIRD	dominio de regulación e interacción de Bas1p (de la terminología inglesa “Bas1p Interaction Regulador Domain”) secuencia de reconocimiento de Bas1p (de la terminología inglesa “Bas1 Recognition Element”)
BRE	“Bas1 Recognition Element”
CAIR	carboxiaminoimidazol ribótido
CDR	cantidad diaria recomendada
DBD	dominio de unión a ADN (de la terminología inglesa “DNA Binding Domain”)
DMT	Drug Metabolite Transporter
ENT	Equilibrative Nucleoside Transporter
FAD	dinucleótido de flavina y adenina
FAICAR	5-formaminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido
FGAM	formilglicinamida ribonucleótido
FGAR	formil glicinamida ribonucleótido
FMN	mononucleótido de flavina
GAR	glicinamida ribonucleótido
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GK	guanina quinasa
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GPRT	guanina fosforribosiltransferasa
GRE	elemento regulador en presencia de guanina
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HGPRT	hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
HGXPR	hipoxantina guanina xantina fosforribosiltransferasa
HPRT	hipoxantina fosforribosiltransferasa
IMP	Inosina-5'-monofosfato
ISN	nucleotidasa específica de IMP
MPA	Ácido micofenólico
NAT	Nucleobase Ascorbate Transporter
NCS2	Nucleobase Cation Symporter 2
NSE	elemento regulador en situación limitante de nutrientes
PNP	nucleosido fosforilasa de purinas
PRA	5- fosforribosilamina

PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
PRT	fosforribosiltransferasa
PUP	Purine Uptake Permease
RFK	quinasa de riboflavina
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (de la terminología inglesa "Real Time-Polymerase Chain Reaction").
SAICAR	6-aminoimidazol 4-N-succinocarboxamida ribonucleótido
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
THF	tetrahidrofolato
UPS	Ureidin Permease
XMP	xantosina-5'-monofosfato
XPRT	xantina fosforribosiltransferasa

Índice

INTRODUCCIÓN

I. LA RIBOFLAVINA O VITAMINA B₂.	1
I.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN BIOLÓGICA.	1
I.2. NUTRICIÓN Y FARMACOLOGÍA.	2
II. EL HONGO SOBREPDUCTOR DE RIBOFLAVINA <i>ASHBYA GOSSYPHII</i>.	5
II.1 TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA	5
II.2. BIOSÍNTESIS Y PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA	7
II.2.1. Ruta biosintética de la riboflavina	9
II.2.2. Biosíntesis del precursor GTP	11
II.2.2.1. Ruta de síntesis de novo de nucleótidos de purina	11
II.2.2.2. Biosíntesis de nucleótidos de purina a través de las rutas de recuperación	14
II.2.2.3. Regulación de la biosíntesis de nucleótidos de purina	19
II.2.2.4. Farmacología y biosíntesis de purinas	22
II.2.3. <i>Ashbya gossypii</i> en la producción industrial de riboflavina	23

OBJETIVOS

OBJETIVOS	29
------------------------	-----------

RESULTADOS

I. DISECCIÓN GENÉTICA DE LAS RUTAS DE RECUPERACION DE NUCLEOBASES DE PURINA EN <i>A. GOSSYPHII</i>.	31
I.1. GENES IMPLICADOS EN LAS RUTAS DE RECUPERACIÓN	31
I.1.1. Comparación de genomas: análisis de homología.	31
I.1.2. Estudios de complementación heteróloga	34
I.1.2.1. Rutas de recuperación de adenina.....	34
I.1.2.2. Rutas de recuperación de xantina y guanina	37
I.2. ANÁLISIS FUNCIONAL	40
I.2.1. Inactivación de los genes <i>AgAPT1</i> , <i>AgXPT1</i> y <i>AgAMD1</i>	40
I.2.2. Actividades enzimáticas.....	44
I.2.3. Modulación de las actividades enzimáticas	45
I.2.4. Relación funcional de las rutas de recuperación y la ruta de novo	47
I.2.5. Recuperación de la nucleobase no convencional AICA	49
I.2.6. Localización subcelular de las enzimas implicadas en las rutas de recuperación.....	51
I.2.7. Excreción de derivados purínicos en cepas defectivas en las rutas de recuperación	54
I.2.8. Efecto de las nucleobases de purina en el crecimiento	57
I.2.9. Perfiles de transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de nucleótidos de purina. 60	
I.2.9.1. Expresión diferencial en la fase trófica y fase de producción	60
I.2.9.2. Modulación de la transcripción por las nucleobases de purina	62
II. POTENCIALES TRANSPORTADORES DE NUCLEOBASES DE PURINA EN <i>A. GOSSYPHII</i>.	64

II.1. IDENTIFICACIÓN DE GENES POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE PURINAS	64
II.2. FUNCIÓN DEL GEN <i>AGFCY2</i> EN EL TRANSPORTE DE NUCLEOBASES DE PURINA EN <i>A. GOSSYPHII</i> Y EN <i>S. CEREVISIAE</i>	66
II.3. CONTRIBUCIÓN DE LOS GENES <i>AGFCY2</i> , <i>AGAFR622W</i> Y <i>AGFUN26</i> AL TRANSPORTE DE NUCLEOBASES	70

DISCUSIÓN

I. RELEVANCIA DE LA PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA	73
II. LAS RUTAS DE RECUPERACIÓN DE NUCLEOBASES DE PURINA EN EL GRUPO DE LOS HEMIASCOMICETOS	74
III. EL TRANSPORTE DE NUCLEOBASES EN <i>A. GOSSYPHII</i> FRENTE A <i>S. CEREVISIAE</i>	80

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	83
--------------------	----

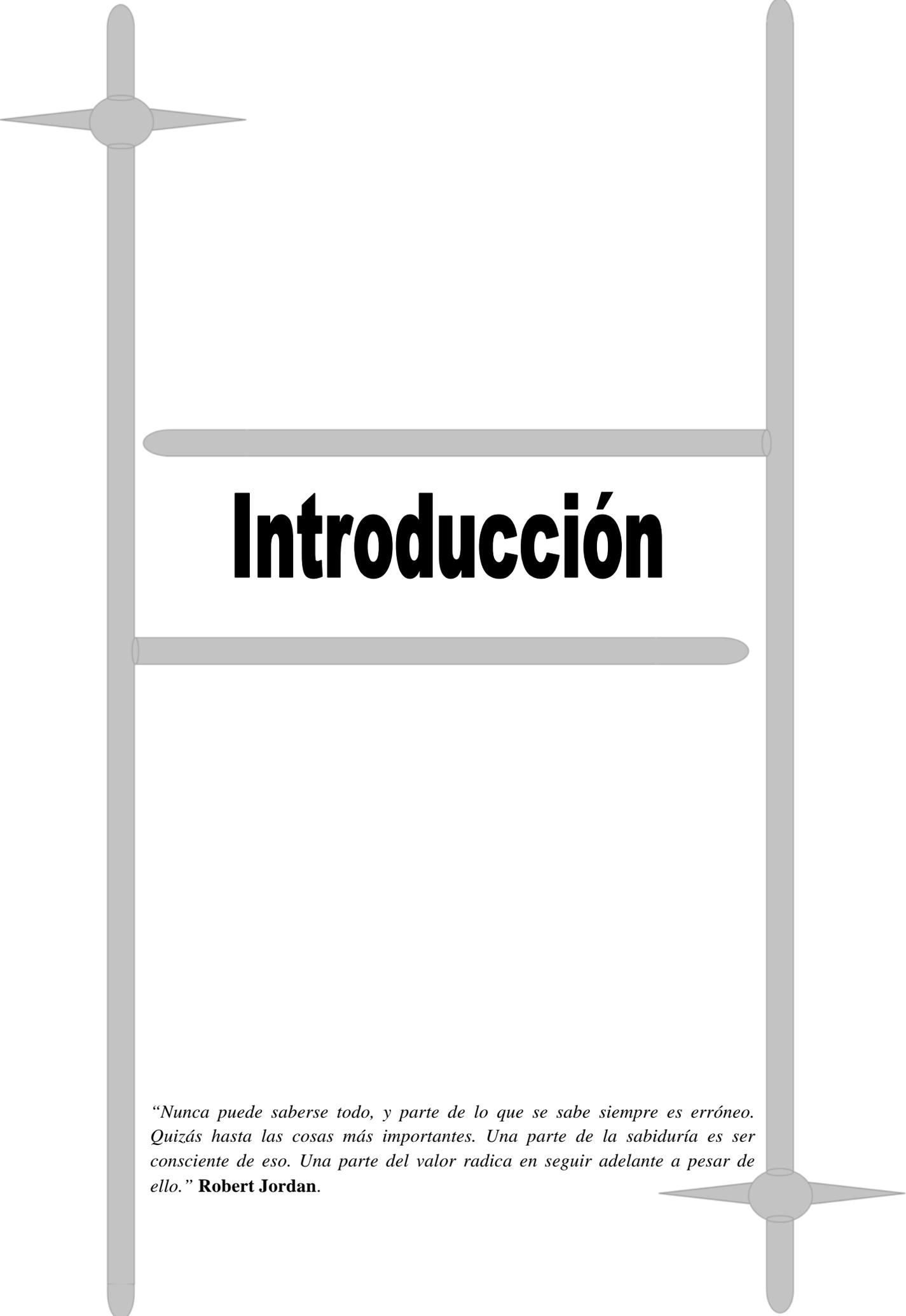
MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIAL BIOLÓGICO.....	85
I.1. CEPAS DE <i>E. COLI</i>	85
I.2. CEPAS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	85
I.3. CEPAS DE <i>A. GOSSYPHII</i>	86
II. MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS	87
III. VECTORES EMPLEADOS	88
IV. OLIGONUCLEÓTIDOS	89
V. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS	92
V.1. OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	92
V.2. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>A. GOSSYPHII</i> DE ALTO PESO MOLECULAR.....	92
V.3. OBTENCIÓN DE ARN DE <i>A. GOSSYPHII</i>	93
V.4. OBTENCIÓN DE UNA GENOTECA GENÓMICA DE <i>A. GOSSYPHII</i> EN UN VECTOR FUNCIONAL EN <i>S. CEREVISIAE</i>	93
VI. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	94
VI.1. OBTENCIÓN DE ESPORAS DE <i>A. GOSSYPHII</i>	94
VI.2. TRANSFORMACIÓN DE ESPORAS DE <i>A. GOSSYPHII</i>	94
VI.3. TRANSFORMACIÓN DE <i>S. CEREVISIAE</i>	95
VI.4. PRUEBAS DE ALIMENTACIÓN CRUZADA.....	95
VII. MANIPULACIÓN DEL ADN	95
VII.1. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y LIGACIÓN.....	95
VII.2. ELECTROFORESIS DE ADN	95

VII.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA.....	96
VII.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y PCRS ANALÍTICAS.....	96
VII.5. SECUENCIACIÓN DE ADN.....	96
VIII. MANIPULACIÓN DEL ARN.....	97
VIII.1. ELECTROFORESIS DE ARN.....	97
VIII.2. SÍNTESIS DE ADN COPIA (ADNc) Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR).....	97
IX. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	97
IX.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEÍCOS.....	97
IX.2. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	98
IX.2.1. <i>Ensayo de actividades enzimáticas con bases radiactivas.....</i>	<i>98</i>
IX.3. ENSAYO DE ENTRADA DE BASES RADIATIVAS A LA CÉLULA.....	99
X. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA.....	99
XI. MICROSCOPIA.....	100
XI.1. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR FLUORESCENCIA DIRECTA.....	100
XI.2. TINCIÓN DE NÚCLEOS.....	100
XI.3. TINCIÓN CON CALCOFLÚOR.....	101
XII. SOPORTE INFORMÁTICO.....	101

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.....	103
--------------------------	------------

The page features two vertical grey lines, one on the left and one on the right. At the top of each line is a grey crosshair symbol, and at the bottom is another grey crosshair symbol. Two horizontal grey bars cross the vertical lines, one above and one below the main title.

Introducción

“Nunca puede saberse todo, y parte de lo que se sabe siempre es erróneo. Quizás hasta las cosas más importantes. Una parte de la sabiduría es ser consciente de eso. Una parte del valor radica en seguir adelante a pesar de ello.” **Robert Jordan.**

I. LA RIBOFLAVINA o VITAMINA B₂

I.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN BIOLÓGICA

La riboflavina, también denominada vitamina B₂, fue descubierta en 1879 como un pigmento amarillo verdoso aislado de la leche que se denominó lactoflavina. Se clasifica en el grupo de las flavinas, caracterizadas por ser pigmentos amarillos (del latín *flavus*: amarillo) que en presencia de luz UV emiten una fluorescencia amarillo verdosa. La riboflavina es un compuesto hidrosoluble, termoestable y altamente fotosensible. En la naturaleza puede aparecer como pigmento libre, como fosfato de riboflavina, sulfato de riboflavina o formando parte de las flavoproteínas.

Su estructura fue determinada por Kuhn y Karrer en los años 30 (Kuhn *et al.*, 1935 y Karrer *et al.*, 1935). Se compone de un anillo de dimetilisoaloxacina con un grupo D-ribitilo en la posición 8 [7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitil) isoaloxacina] (Figura 1). La actividad biológica de la riboflavina se debe a la capacidad del núcleo de isoaloxacina de estar en tres estados redóx: oxidado o estado de quinona, reducido en un electrón o estado de semiquinona (radical) y reducido en dos electrones (totalmente reducido) o estado de hidroquinona. La riboflavina generalmente no tiene funciones metabólicas directas en la célula, a excepción de cofactor redóx en la bomba de Na⁺ NADH:quinina oxidoreductasa de *Vibrio cholerae* (Juárez *et al.*, 2008), pero su importancia biológica estriba en ser precursor de la síntesis de los cofactores flavínicos, el cofactor mononucleótido de flavina (FMN) y el cofactor dinucleótido de flavina y adenina (FAD) (Figura 1).

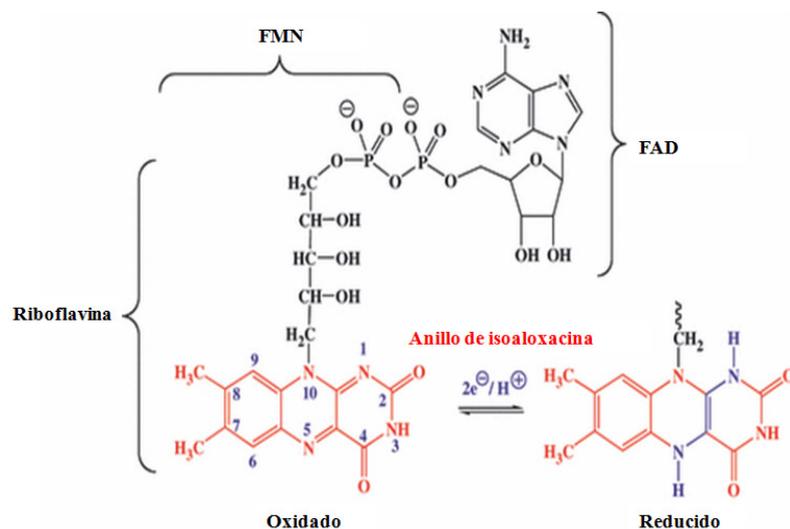


Figura 1. Estructuras de las moléculas de riboflavina y sus cofactores, el FMN y el FAD. El estado redóx del anillo de isoaloxacina se representa en los colores azul y rojo.

Estos nucleótidos actúan como grupos prostéticos de flavoenzimas. Una gran parte de las flavoenzimas son constituyentes de las cadenas respiratorias celulares y colaboran en la transferencia del hidrógeno que toman del sustrato inicial las hidrogenasas anaerobias. Las flavoenzimas también intervienen en la degradación oxidativa de los ácidos grasos, piruvato y aminoácidos, o procesos de oxido-reducción (Klein y Fulco,

1993). Así, el FAD participa en el sistema de transporte de electrones en la cadena respiratoria para la producción de energía; actúa en los sistemas enzimáticos oxidativos de la citocromo C reductasa, deshidrogenasa succínica y xantina oxidasa.

Otras funciones de la riboflavina están relacionadas con su capacidad de absorción de luz. Así pues, derivados flavínicos forman parte de fotorreceptores captando la luz azul, como es el caso de las fototropinas y los criptocromos. Las fototropinas contienen dos dominios de unión a FMN, siendo los receptores primarios en el fototropismo (Salomon *et al.*, 2000) que median la respuesta de las plantas superiores a la luz. A su vez estas tropinas están implicadas en el movimiento de los cloroplastos y en la apertura y cierre estomático. También intervienen en el fototropismo de algunos hongos (Delbruck *et al.*, 1976). Otro grupo de flavoproteínas actúan como cromóforos en la fototaxis de protistas (Wolken 1977). Los criptocromos, presentes tanto en plantas como en animales, a diferencia de las fototropinas no son quinasas. Constituyen una familia de flavoproteínas que regulan la germinación, elongación, fotoperiodicidad y otras respuestas en las plantas superiores. Los criptocromos también están involucrados en el ritmo circadiano de plantas y animales (Presti, 1983; Cashmore *et al.*, 1999) y en la detección de campos magnéticos en algunas especies (Mouritsen *et al.*, 2004). Uno de los cromóforos catalíticos de los criptocromos siempre es el FAD, como ocurre en las fotoliasas (Sancar, 1994) - con las que tienen una alta homología - que intervienen en la fotorreactivación o reparación del ADN dañado por luz ultravioleta mediante exposición a luz azul (Sancar, 2003).

No solamente los derivados flavínicos son capaces de captar luz sino también de emitirla, como en el caso de la bioluminiscencia, en el cual la enzima luciferasa emplea como sustrato FMH₂ (Duane y Hastings, 1975).

I.2. NUTRICIÓN Y FARMACOLOGÍA

La riboflavina es un micronutriente esencial en la dieta de los animales, puesto que no son capaces de sintetizarla, a diferencia de lo que ocurre con todas las plantas y la mayoría de los microorganismos (Koser, 1968; Powers, 2003). La cantidad diaria recomendada para el ser humano por la Unión Europea (EU RDA) es de 1,6 mg/día. En el caso de los animales pecuarios esta cantidad se llega a incrementar a 4 mg/día. En situaciones especiales la ingesta de riboflavina debe ser incrementada, como ocurre durante el embarazo y la lactancia, en individuos fumadores y bebedores, pacientes infectados con el VIH, así como en sujetos con una dieta hipercalórica.

Como en el caso de otras vitaminas hidrosolubles, el intestino humano está expuesto a dos recursos de riboflavina, uno es la dieta (que se absorbe en el intestino delgado) y el otro bacteriano (generada por la microbiota del intestino grueso y absorbida en el propio tracto intestinal). Aunque no está clara la contribución de este último recurso a la homeostasis del cuerpo (Said, 2011).

Las mejores fuentes de riboflavina en la dieta son los productos de casquería (las vísceras, y principalmente el hígado), los huevos, la leche, la carne magra, verduras de color verde oscuro, cereales enteros, pasta, pan y cerveza (“Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes” 1998).

En la actualidad, ciertos factores durante el procesado y preparación de los alimentos pueden influir en la reducción de bioviabilidad de los recursos alimenticios. Durante el cocinado y el procesamiento de alimentos se pierden cantidades apreciables de riboflavina, lo mismo ocurre con la leche envasada en botellas (Wanner, 1960). También el proceso de secado al sol de frutas y vegetales conlleva una pérdida de grandes cantidades de riboflavina. Debido a esto, en la actualidad se emplean alimentos enriquecidos o fortificados con riboflavina principalmente grano y cereales (Capozzi *et al.*, 2011).

En caso de ingesta de cantidades excesivas de riboflavina, ésta se excreta fácilmente del cuerpo por medio de la orina, y no se conoce toxicidad (Horwitt *et al.*, 1950). La deficiencia de riboflavina, denominada arriboflavinosis es muy frecuente entre adolescentes, embarazadas, ancianos y deportistas. Además de los casos anteriores, la deficiencia subclínica de riboflavina ha sido observada en personas con trastornos alimentarios, trastornos metabólicos como diabetes o hipertiroidismo. En patologías del sistema digestivo, principalmente las que inciden en el tracto intestinal y las que provocan inflamación intestinal o la enfermedad de Crohn (Powers, 2003). Relacionadas con la disfuncionalidad del transportador de riboflavina *RFT2* del intestino tenemos los síndromes neurológicos de Brown-Vialetto-Van Laere y Fazio Londe, así como el carcinoma escamoso del esófago y el cáncer gástrico (Horvath, 2012; Ji *et al.*, 2011; Eli *et al.*, 2012). También se ha observado deficiencia de riboflavina debido al consumo de ciertas drogas, en estados febriles, de estrés, e incluso en el síndrome del túnel carpiano (Folkers *et al.*, 1984).

La arriboflavinosis cursa con desórdenes metabólicos causando trastornos como: reducción de la tasa de crecimiento, síndrome oral-ocular-genital, lesiones bucales (labios agrietados y rojos, glositis, queilitis angular, atrofia de las papilas gustativas, úlceras y dolor de garganta), lesiones oculares (fotosensibilidad, relacionada con fotofobia, quemazón, prurito ocular, pérdida de la agudeza visual, vascularización superficial de la córnea, opacidad en la córnea y cataratas en la vejez), lesiones cutáneas (rágades, dermatitis seborreica en los pliegues nasolabiales, en el escroto o en la vulva, cicatrización lenta, acné y alopecia), neuropatías, hiperhomocisteinemia, anemia y fatiga. Toda esta sintomatología se ve agravada si hay carencia de otras vitaminas del grupo B (Powers, 2003).

Las dosis terapéuticas de riboflavina varían entre 3 y 400 mg/día. Empleándose para la profilaxis de la migraña 400 mg/día (Maizels *et al.*, 2004) y dosis de 30 a 50 mg/día en el caso de la anemia y estados carenciales asociados con queilitis angular, dermatitis seborreica y neuropatías.

Además, la riboflavina se emplea en clínica para la técnica de ligaciones cruzadas en el tratamiento del queratocono (formación cónica anómala de la córnea por adelgazamiento y protrusión de la misma), puesto que favorece la formación de enlaces fortaleciendo la estructura biomecánica de la córnea (Hovakimyan *et al.*, 2012), en el sistema Mirasol para el tratamiento del plasma por exposición a luz ultravioleta favoreciendo la reducción de microorganismos (Fast *et al.*, 2012) y en la ictericia neonatal durante la fototerapia, ya que favorece la eliminación de bilirrubina (Pataki *et al.*, 1985).

Además, hay evidencias de que altas concentraciones de riboflavina en el plasma pueden reducir el riesgo de desarrollar adenomas colorrectales, disminuyendo, a su vez, el riesgo de cáncer colorrectal (de Vogel *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012).

El conocimiento sobre la importancia que tiene la riboflavina en la salud humana ha determinado un incremento en la demanda mundial de esta vitamina, pasando de una producción anual de 2000 toneladas en los años 80 a 4000 toneladas en el año 2004 y a 9000 toneladas en 2011 (Florent, 1986; Karos *et al.*, 2004; Kato y Park, 2012).

Si bien la riboflavina es factor de crecimiento para muchos de los organismos vivos, existen muchos otros que poseen la capacidad natural de sintetizar mayor cantidad de riboflavina que sobrepasa sus necesidades metabólicas almacenándola durante el desarrollo. Estos organismos reciben el nombre de flavinogénicos y son empleados por la industria para la producción de la vitamina. Entre estos organismos se establecen tres categorías (Demain, 1972): **sobreproductores débiles** como *Clostridium acetobutylicum*, uno de los primeros organismos empleados por la industria para la obtención de riboflavina por fermentación anaeróbica, produciendo hasta 100 mg/l en 4 días; **sobreproductores medios** entre los que destaca el género *Candida* con las especies *C. famata*, *C. flareri* y *C. guilliermondii*, capaces de sintetizar 600 mg/l. Estos dos grupos de productores son especialmente sensibles a la presencia de iones de hierro en el medio. Como último grupo tenemos los **sobreproductores fuertes**, entre los que se encuentra *Bacillus subtilis* (organismos modificados), bacteria que ya se utilizaba para la síntesis de D-ribosa, y dos ascomicetes, *Eremothecium ashbyii* el primero en ser usado debido a su capacidad natural para sintetizar riboflavina (Guilliermond *et al.*, 1935) pero a causa de su inestabilidad genética y los problemas que presentaba en los tanques de fermentación cesó su uso, siendo sustituido por *Ashbya gossypii* que es genéticamente mucho más estable pero preferible aunque fuera mucho menos productivo en principio (Wickerman *et al.*, 1946).

II. EL HONGO SOBREPRODUCTOR DE RIBOFLAVINA

ASHBYA GOSSYPII

Ashbya gossypii es un hongo filamentoso, descrito originalmente en 1926 por Ashby y Nowel como *Nematospora gossypii* “el hongo de la estigmatomicosis”. Los ejemplares Tipo se aislaron de semillas de algodónero – *Gossypium hirsutum* - afectadas por la estigmatomicosis (Ashby y Nowel, 1926).

A. gossypii es un fitoparásito que no desarrolla estructuras propias para dar lugar a la infección como ocurre en otros hongos (Batra 1973). La infección del anfitrión se produce a través de las laceraciones causadas, al alimentarse de la planta, por los estiletos bucales de insectos heterópteros, principalmente de los géneros *Antestia* y *Dysdercus*, los cuales actúan de vectores. La micosis generada por *A. gossypii*, afecta tanto al desarrollo de la cápsula como al de las semillas, siendo sus efectos más graves cuanto más joven es la planta de algodón (Tabla 1). También es capaz de infectar a cítricos y a plantas de soja, en regiones tropicales y subtropicales (Batra, 1973).

En 1950 se le denomina como “levadura filamentosa” (Mickelson, 1950) tanto por su hábitat, como por la forma con la que crece el micelio sobre las frutas que se asemeja al pseudomicelio que forma *Saccharomyces cerevisiae* en las uvas. Su taxonomía ha sido origen de controversia durante años, pertenece al género *Eremothecium* (del griego *eremos*: aislado y *theca*: caja, asco) aunque se considera correcta la denominación de *Ashbya*. Actualmente el género *Ashbya* está incluido en la familia *Saccharomycetaceae*, perteneciente al grupo de hongos hemiascomicetos (Prillinger *et al.*, 1997). Este grupo incluye ascomicetos micélicos o levaduriformes microscópicos, desprovistos de ascocarpos y con un ciclo de vida muy simplificado y muy modificado, lo que puede deberse a ser los *Ascomycetes* más primitivamente simples (Gaumann, 1952) o a una evolución regresiva.

Tabla 1. Patogenia de <i>A. gossypii</i> sobre plantas de algodón*.	
Edad de inoculación	Síntomas y observaciones
1 y 2 semanas	El crecimiento se detiene completamente; muerte de las semillas; las cápsulas se deshacen o abortan; la borra se vuelve una membrana oscura.
3 y 4 semanas	Se reduce el tamaño de las cápsulas; borra fuertemente manchada; carpelos abiertos, entornados y parcialmente flexionados; la parte central de los lóculos no se expande y de apariencia membranosa.
5, 6 y 7 semanas	Poco o ningún efecto en el tamaño de la cápsula, borra intacta sin membranas pero teñida de marrón oscuro a bayo, la tinción se reduce con la edad.
8 y 9 semanas	Ningún efecto, salvo trazas de decoloración.

* Batra, 1973

A diferencia de otros miembros del género *Eremothecium* cuyos ciclos de reproducción sexual y asexual están bien delimitados, en *A. gossypii* existe una controversia sobre la reproducción sexual. Batra lo describe como un hongo homotálico, en el cual previa a la formación de las esporas se daría cariogamia, para, posteriormente por meiosis dar lugar a las esporas haploides. Datos actuales indican que la cepa silvestre tiene tipo sexual *MATa*, pero carece de parte de los genes implicados en la ruta de la feromona, siendo, por tanto, las esporas observadas de origen asexual, y el ciclo sexual (fase ascógena) sería desconocido (Wendland y Walther, 2005; Wendland *et al.*, 2011). En este trabajo se asume la segunda hipótesis, siendo actualmente la más aceptada, y la descripción del ciclo de vida se realiza de acuerdo a ella (Figura 2).

Este ciclo comienza con un estadio de espora (Figura 2a) de estructura aculeiforme con crestas concéntricas en toda su longitud, equipada con un apéndice característico en la parte posterior. Este apéndice, de dos a cuatro veces la longitud de la espora y en forma de flagelo, no genera movilidad sino que su función es adhesiva, permite mantener unidas las esporas dentro del saco esporífero y también facilita su propagación al enratarse en el *rostrum* o introducirse en el canal dorsal maxilar (canal suctor o alimentario) de los insectos heterópteros. La espora es uninucleada y haploide. El genoma de *A. gossypii* es de 9,2 Mb (Dietrich *et al.*, 2004) y se organiza en 7 cromosomas (Benito, 1997).

La germinación de la espora comienza con un crecimiento isotrópico en la región central y varias divisiones nucleares (Figura 2b). Este estadio de diferenciación se observa, en condiciones óptimas de crecimiento, a las 8 horas de iniciarse el cultivo, tiempo en el que pueden ocurrir hasta 3 rondas de división nuclear. Después comienza una fase de crecimiento polarizado con la emisión de una hifa germinal. Esta hifa, separada de la célula germinal por un septo, prosigue incesantemente su crecimiento mientras las condiciones del medio son favorables (Figura 2c).

A continuación, y siguiendo un modelo de crecimiento bipolar, en el polo opuesto a la primera hifa, emerge una segunda hifa germinal (Figura 2d). Las dos hifas germinales prosiguen su elongación y a partir de ellas surgen por ramificación lateral nuevas hifas, dando lugar al micelio juvenil (Figura 2e y 2f).

En la maduración hifal (Fig. 2g), estadio que se alcanza entre las 20-24 horas posteriores a la germinación, el modo de crecimiento varía de una masa fractal a una superficie fractal, ya que las ramificaciones de las hifas en vez de generarse en los laterales lo hacen en los ápices de manera dicotómica, apareciendo las estructuras en forma de horca (Obert *et al.*, 1990). Después, a partir de cada ramificación surgen nuevas ramificaciones y el resultado final del crecimiento es un denso micelio cenocítico de hifas tabicadas (Figura 2f) (Wendland y Phylippsen, 2000).

El crecimiento cesa cuando se agotan los nutrientes, momento en el que se produce la autólisis de algunas hifas (Figura 2f) o la formación de sacos esporíferos en otras. La formación de los sacos esporíferos (Figura 2h), ya estén aislados o formando cadenas,

comienza con la desaparición de los septos que delimitan un compartimento en la hifa y la reabsorción del contenido celular para dar lugar a la aparición de unas incipientes estructuras filiformes que maduran y generan las esporas, situadas en los extremos del saco y cuyo número puede variar entre 8 y 16. Finalmente las esporas se liberarán al medio recomenzando el ciclo (Figura 2a).

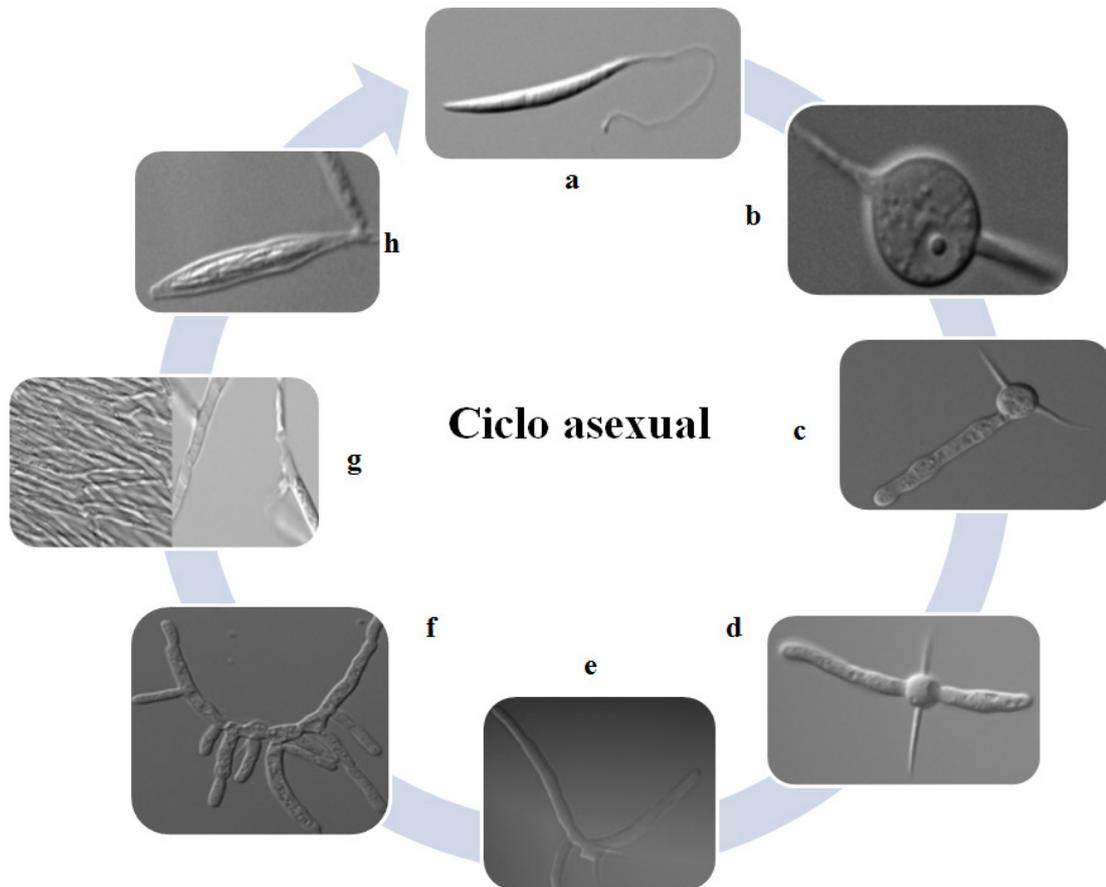


Figura 2. Ciclo de vida de *A. gossypii*. Los estadios de diferenciación que se representan se observan a los tiempos indicados en el texto y son: **a)** espora; **b)** germinación por crecimiento isotrópico; **c)** emisión de la primera hifa germinal (crecimiento polar); **d)** emisión de la segunda hifa (crecimiento bipolar); **e)** ramificación lateral; **f)** micelio juvenil formado por ramificaciones laterales; **g)** micelio maduro (ramificación dicotómica) y lisis hifal; **h)** saco esporífero.

En medio sólido, *A. gossypii* muestra un crecimiento radial formando colonias regulares. La forma y el tamaño de estas colonias están determinados por factores como la frecuencia y el ángulo de ramificación.

II.2. BIOSÍNTESIS Y PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA

Pronto fue reconocido el hongo *A. gossypii* por su capacidad de producir grandes cantidades de riboflavina, la cual era responsable de su apariencia amarillenta (Wickerman *et al.*, 1946).

La riboflavina se sintetiza a lo largo de todo el ciclo de vida, para cubrir los requerimientos de nucleótidos flavínicos. Sin embargo, es a partir de las 24 horas, después

de haberse iniciado el crecimiento, cuando se potencia el proceso biosintético. El exceso de riboflavina se acumula en el interior de las vacuolas, que emiten una fluorescencia amarilla al ser excitadas por luz ultravioleta (Figura 3A). El incremento de riboflavina en el interior vacuolar conlleva la formación de unos agregados de cristales alargados y amorfos de la vitamina (Figura 3B).

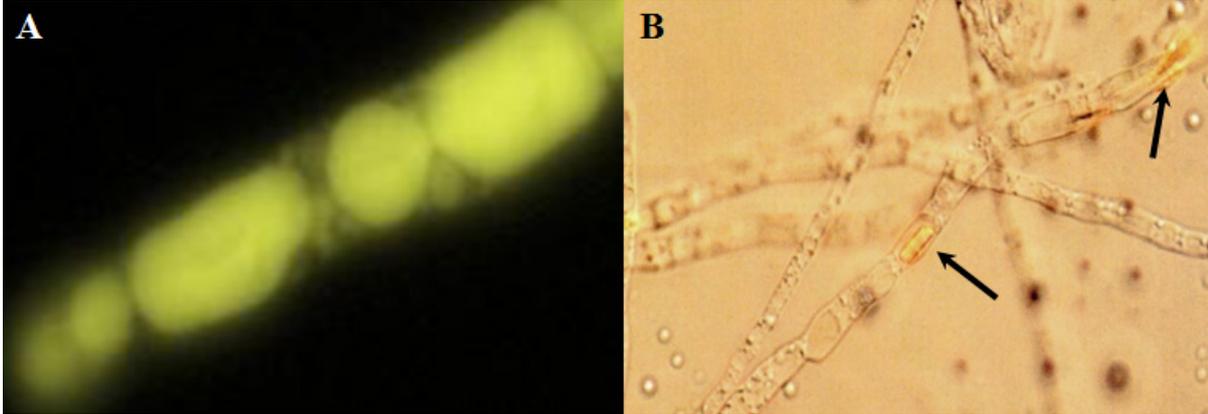


Figura 3. Fenotipo de producción de riboflavina. Cristales de riboflavina en el interior de las vacuolas. **A)** Emisión con luz ultravioleta **B)** Emisión con luz visible.

A los 3 ó 4 días de crecimiento la producción va a ser todavía más acusada, observándose a simple vista una pigmentación amarillenta tanto en la masa miceliar como en el medio de crecimiento. Este cambio de coloración, de micelio pálido en la primera fase del crecimiento (fase trófica) a color amarillo en la fase más tardía (fase productiva), ocurre tanto en cultivos en medio líquido como en sólido (Figura 4).

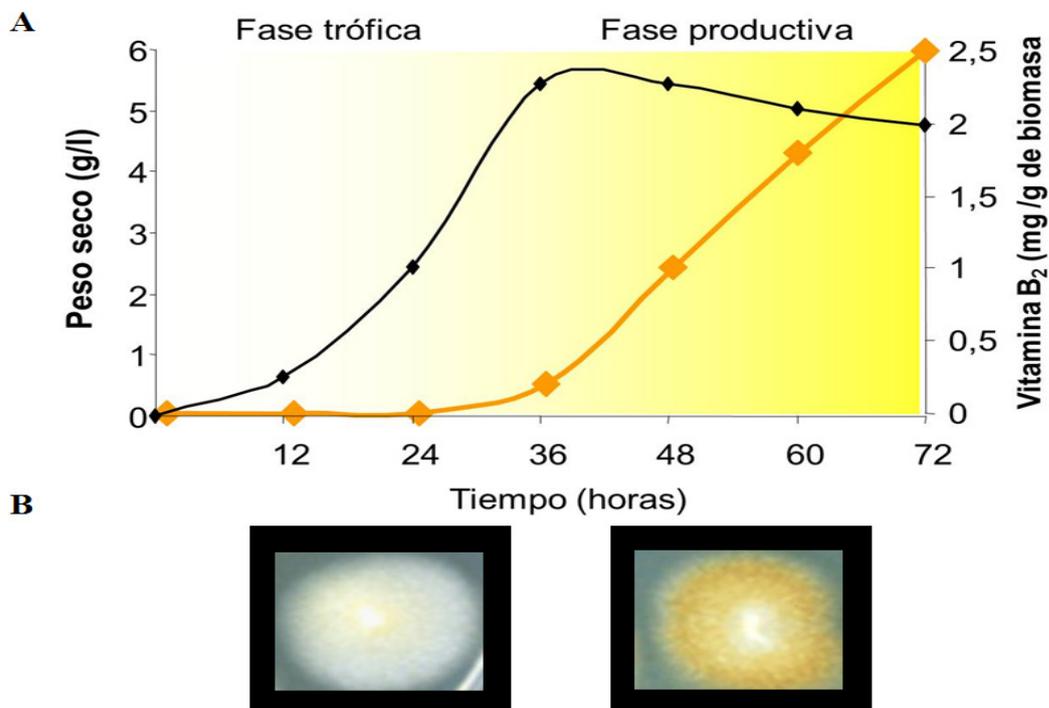


Figura 4. Biosíntesis de riboflavina. **A)** Representación gráfica que muestra el crecimiento del hongo (en color negro) frente a la producción de riboflavina (en color naranja). **B)** Fotografías de una colonia de *A. gossypii* en medio sólido en el que se aprecia el cambio de coloración del micelio.

II.2.1. Ruta biosintética de la riboflavina

Los trabajos realizados en las últimas décadas con organismos flavinogénicos han permitido establecer la ruta de síntesis de riboflavina.

En 1991, nuestro laboratorio comenzó a estudiar el proceso de síntesis de riboflavina en *A. gossypii*, objeto de un proyecto de investigación suscrito con la empresa BASF AG. En *A. gossypii* la síntesis de riboflavina (Figura 5) tiene lugar a través de seis etapas enzimáticas, controladas por los productos de seis genes, genes de *AgRIB1* a *AgRIB5* y *AgRIB7* (Revuelta *et al.*, 1995); el hongo solo presenta una copia de cada uno de los genes, dispersos a través del genoma.

El ribonucleótido GTP es uno de los sustratos necesarios para la síntesis de riboflavina junto con la ribulosa 5-fosfato (ribu-5p); necesitando de cada uno de ellos 1 y 2 moles respectivamente para la síntesis de 1 mol de riboflavina. Es por tanto una ruta bifurcada, en lo respectivo a la ruta a partir de la ribulosa 5-fosfato los enzimas participantes son codificados por los genes *AgRIB3* (3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfatasa sintasa), *AgRIB4* (lumazina sintasa) y *AgRIB5* (riboflavina sintasa). Por la vía del GTP *AgRIB1* (GTP ciclohidrolasa I), *AgRIB7* (reductasa), *AgRIB2* (desaminasa). En organismos procariotas como es el caso de *B. subtilis*, el producto del gen *RIBG* tiene tanto actividad desaminasa como reductasa. La fosfatasa responsable de la síntesis de riboflavina es desconocida, puesto que no se ha podido aislar después del cribado de cientos de organismos auxotróficos para la riboflavina. Y se asume que es una fosfatasa inespecífica que interviene simultáneamente en la biosíntesis de riboflavina y otros compuestos (Abbas y Sibirny 2011).

Los precursores GTP y ribulosa 5-fosfato (Bacher *et al.*, 1989) son convertidos a través de cinco reacciones enzimáticas en el precursor inmediato de la riboflavina 6,7-dimetil-8(1-D-ribitol) lumazina, el cual es transformado en riboflavina por la acción de la sintasa de riboflavina, codificada por el gen *RIB5* (Revuelta *et al.*, 1995).

Los cofactores flavínicos FMN y FAD se forman a partir de la molécula de riboflavina. El FMN se forma por fosforilación de la riboflavina en su grupo 5'-OH de la cadena ribitol por una quinasa de riboflavina (RFK, *FMNI*) que utiliza como molécula donadora ATP. La posterior adenilación del FMN, utilizando como sustrato una segunda molécula de ATP, produce FAD en una reacción catalizada por la sintetasa de FAD (*FMNAT*, *FADI*). Sin embargo en bacterias una única enzima es capaz de realizar ambas funciones *RIBC*. Tanto el FMN como el FAD pueden considerarse las formas biológicamente activas de la riboflavina, ya que forman parte de los grupos prostéticos de las flavoproteínas, enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción.

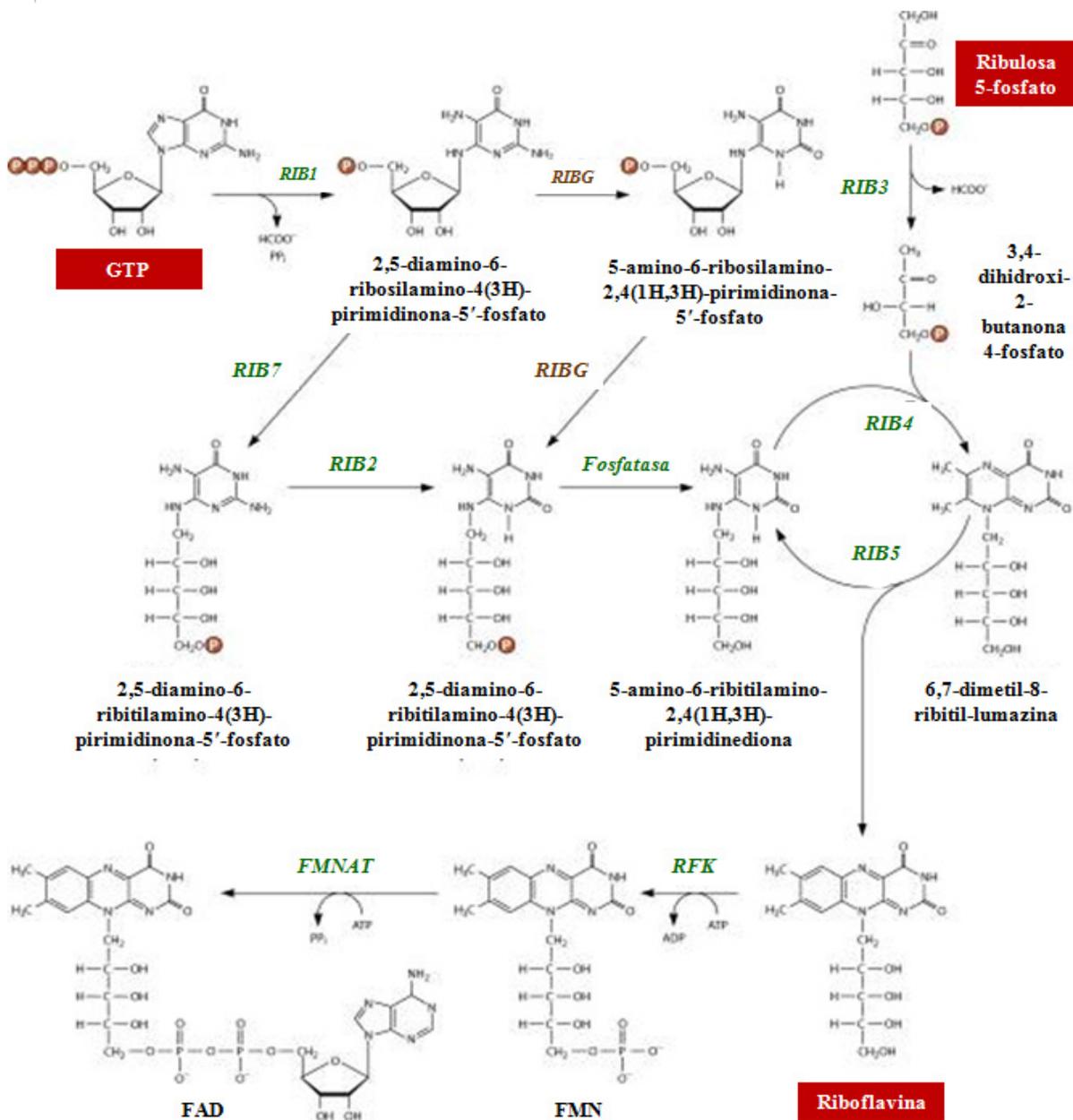


Figura 5. Esquema de la ruta biosintética de riboflavina y sus cofactores. En color verde genes de *A. gossypii*, ruta en hongos; en color marrón genes de *B. subtilis*. Modificado de Abbas y Sibirny, 2011

Aunque a lo largo del desarrollo de *A. gossypii* se produce riboflavina las mayores cantidades se sintetizan al final de la fase de crecimiento. Los genes *AgRIB1* y *AgRIB3* muestran un incremento en la transcripción en la fase de transición entre la fase de crecimiento y la de producción (Stahmann *et al.*, 2000; y Mateos *et al.*, 2006). El resto de los genes flavinogénicos se expresan de forma constitutiva.

Los niveles de expresión de algunos genes de la ruta biosintética influyen en la producción de riboflavina. La integración al azar en el genoma de una copia adicional de los genes *AgRIB3*, *AgRIB4* y *AgRIB5* muestra un incremento del 2.5% de producción. (Althöfer *et al.*, 1998). Otras combinaciones de los genes *RIB* no tienen efectos sobre la producción o tienen efectos negativos en el crecimiento.

El factor limitante, en buena medida, es la disponibilidad del nucleótido precursor GTP, ya que existe una relación directa entre los procesos que afectan a la síntesis del nucleótido y la producción de vitamina (Demain, 1972; Schlüpen *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008).

II.2.2. Biosíntesis celular del precursor GTP

El GTP es uno de los nucleótidos de purina, siendo la purina el heterocíclico de nitrógeno más ampliamente distribuido en la naturaleza. El venerable nombre de “purina” (*purum uricum*) se mantiene en lugar del nombre sistemático imidazo (4,5-d) pirimidina por la IUPAC en agradecimiento a Emil Fischer que lo acuñó en 1899 al sintetizar por vez primera esta base incolora y cristalina, a partir de ácido úrico aislado de cálculos biliares.

Los derivados purínicos están envueltos en un gran número de procesos metabólicos, almacenaje de energía, actividades REDOX, formando parte del material genético, señalización y recepción, etc. En los años 50 el estudio de purinas tuvo su auge, pero en la actualidad ha tenido un renacimiento, en la búsqueda de activos farmacológicos aislados a partir de sustancias obtenidas de recursos naturales (Rosemeyer, 2004).

En la célula hay dos tipos de vías metabólicas que conducen a la formación de los nucleótidos de purina: la vía *de novo* y las vías de recuperación. La síntesis *de novo* de los nucleótidos empieza a partir de precursores metabólicos: aminoácidos, ribosa 5-fosfato, CO₂ y NH₃. Las vías de recuperación reciclan las nucleobases libres y los nucleósidos liberados, principalmente, de la degradación de los ácidos nucleicos.

II.2.2.1 Ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purina

La biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purinas es una ruta anabólica altamente conservada y ampliamente distribuida filogenéticamente. En los organismos pertenecientes a los tres *Domina*, *Bacteria*, *Archaea* y *Eucaria*, las enzimas que participan en la ruta exhiben de un 35 a un 65% de similitud entre la secuencia aminoacídica, sugiriendo que podría haber un ancestro común para los tres *Domina* (Johnson *et al.*, 1987; Henikoff y Smith, 1989).

A mediados de los años 50 Buchanan ayudó a elucidar las rutas de biosíntesis de las purinas en una serie de 20 artículos con el título general de “Biosíntesis de Purinas”. Greenberg hizo una investigación paralela y gracias a la información compartida por ambos grupos se pudo realizar un rápido progreso.

Los productos finales de esta ruta, precursores de los ácidos nucleicos, son el AMP (adenosina 5'-monofosfato, adenilato) y el GMP (guanosina 5'-monofosfato; guanilato), que contienen las bases purínicas adenina y guanina, respectivamente. Hay que destacar que estas bases no son intermediarios de la ruta *de novo*, es decir, las bases no son sintetizadas y a continuación unidas a la ribosa, como cabría esperar. El anillo purínico se sintetiza *de novo* en las células a partir de aminoácidos, que actúan como donadores de

carbonos y nitrógeno, y otras moléculas pequeñas que completan el esqueleto de la base. Los diferentes estudios con isótopos radiactivos, llevados a cabo por Buchanan y Greenberg, con homogenados de extractos de hígado de paloma han permitido establecer el origen de cada uno de los átomos que constituyen el anillo de purina (Figura 6).

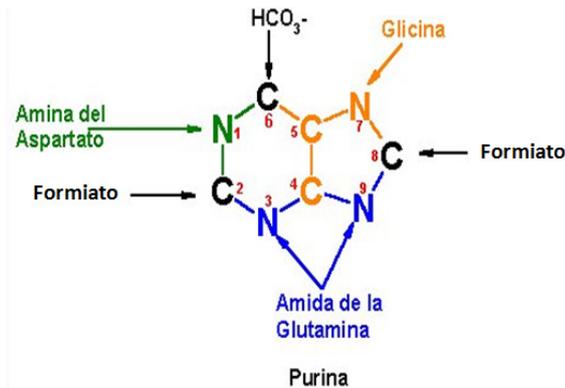


Figura 6. Origen de los distintos átomos del anillo de purina.

La ruta *de novo* está constituida por diez etapas enzimáticas en las que se forma IMP (inosina 5'-monofosfato; inosinato) cuya nucleobase purínica es hipoxantina. A partir del IMP la ruta se ramifica para formar AMP por un lado y GMP por otro. La ruta parte de ribosa-5-fosfato que se genera en la vía de las hexosas monofosfato, ésta debe ser activada para ingresar a la síntesis usando un ATP (Figura 7), el cual le transfiere pirofosfato en el carbono 1. Esta reacción es catalizada por la fosforribosilpirofosfato sintetasa, dando como producto 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), el cual acepta el grupo amino de la glutamina dando 5-fosforribosilamina (PRA) bajo la acción de la enzima fosforribosilpirofosfato amidotransferasa. A continuación se dan una serie de reacciones de aminotransferencia y transformilación para formar 6-aminoimidazol 4-N-succinocarboxamida ribonucleótido (SAICAR), el cual, tras liberar una molécula de fumarato, forma 5-aminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido (AICAR). Después la incorporación de un grupo formilo al AICAR genera 5-formaminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido (FAICAR), precursor inmediato de inosina-5'-fosfato (IMP), el cual constituye el primer nucleótido intermediario cíclico de purinas. Es a partir de IMP donde se ramifica la ruta de síntesis de purinas, ya que desde él se forma AMP como GMP a través de dos rutas divergentes.

La conversión del IMP en AMP requiere la incorporación de un grupo amino procedente del aspartato; ello tiene lugar a través de dos reacciones catalizadas por las enzimas adenilsuccinato sintetasa y adenilsuccinato liasa. Una diferencia clave consiste en la utilización de GTP, en lugar de ATP, como fuente de energía en la síntesis del adenilsuccinato. El GMP se forma por oxidación del IMP, que requiere NAD^+ , dando lugar a XMP (xantilato) por acción de la enzima inosinato deshidrogenasa, seguida de la incorporación de un grupo amino procedente de la glutamina. El ATP se hidroliza a AMP y PP_i en el último paso.

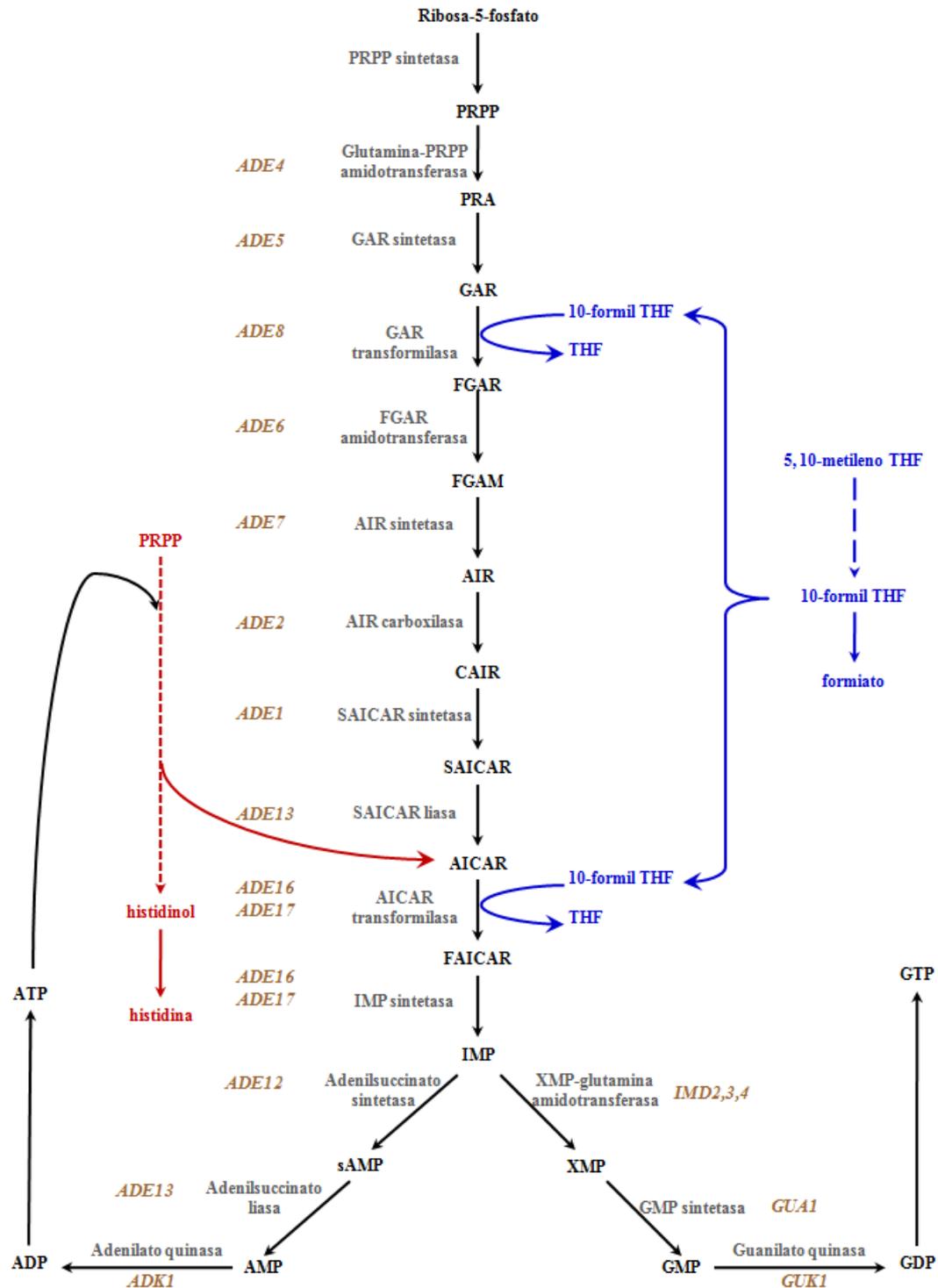


Figura 7. Representación esquemática de la ruta de síntesis *de novo* de purinas y su relación con las rutas de síntesis de histidina (rojo) y formiato (azul). En color marrón se indican los genes de *S. cerevisiae* que codifican las correspondientes enzimas. **PRPP** 5-fosfo- α -ribosil-1-pirofosfato, **PRA** 5-fosforribosilamina, **GAR** glicinamida ribonucleótido, **FGAR** formil glicinamida ribonucleótido, **FGAM** formilglicinamidina ribonucleótido, **AIR** 5-aminoimidazol ribonucleótido, **CAIR** carboxiaminoimidazol ribótido, **SAICAR** 6-aminoimidazol 4-N-succinocarboxamida ribonucleótido, **AICAR** 5-aminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido, **FAICAR** 5-formaminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido, **THF** tetrahidrofolato. Modificado de Rebora *et al.*, 2005.

La conversión final de AMP y GMP a sus respectivos nucleósidos difosfato y trifosfato se debe a la acción de quinasas específicas: AMP quinasa, GMP quinasa y ADP quinasa, GDP quinasa, respectivamente. Como sistema de control primario para el equilibrio de la concentración celular de ambos nucleótidos, para la formación de AMP se requiere energía en forma de GTP, mientras que en la síntesis de GMP se consume energía a partir de ATP. Así la célula mantiene un equilibrio entre las proporciones de ambas moléculas.

El AICAR no solamente se produce a través de la ruta biosintética del IMP si no que también es un subproducto que se genera en la ruta de síntesis del aminoácido histidina. Aunque mutantes en los primeros pasos de la ruta *de novo* anteriores a la síntesis de AICAR en *S. cerevisiae* muestran auxotrofia para adenina. Esto indica que la ruta de histidina no aporta el suficiente AICAR para la síntesis de nucleótidos de purina en ausencia de adenina extracelular. Esto se debe a que en la síntesis de histidina se requiere de ATP y el AICAR producido durante la biosíntesis de histidina no contribuye a la síntesis de AMP por la ruta *de novo* (Rebora *et al.*, 2005).

II.2.2.2. Biosíntesis de nucleótidos de purina a través de las rutas de recuperación

En la célula existen otras rutas para la síntesis de purinas. Los estudios de Buchanan sobre la incorporación de hipoxantina a ácido inosínico fueron la primera evidencia de las que se denominaron rutas de recuperación o rescate de nucleobases de purinas por su conversión directa a sus respectivos nucleótidos (Korn y Buchanan 1955).

De la degradación metabólica celular de los ácidos nucleicos se generan no sólo nucleótidos sino también los correspondientes nucleósidos y nucleobases. Los derivados de adenina, nucleósido o base, por desaminación dan lugar a su derivado de hipoxantina correspondiente. La hipoxantina se oxida sucesivamente a xantina y ácido úrico por acción de la xantina oxidasa, que es una flavoenzima.

Del catabolismo de los derivados de la guanina también se forma ácido úrico. La guanina por desaminación da lugar a xantina y por acción de la xantina oxidasa se forma ácido úrico (Figura 8). El ácido úrico es el producto final de excreción del catabolismo de las purinas en los primates, aves, reptiles e insectos. Sin embargo, en el resto de organismos son necesarias una serie de degradaciones posteriores para excretarlo en forma de alantoína (la mayoría de los mamíferos), alantoato (peces teleósteos), urea (anfibios y peces cartilagosos) o amoniaco (invertebrados marinos), según el orden de modificaciones necesarias (Balinsky, 1972). En plantas a partir del ácido úrico se forma la urea que se emplea para la síntesis de metabolitos secundarios o bien se degrada hasta glioxilato. En algunos hongos la urea también actúa como sustancia de reserva o de desintoxicación. Los hongos hemiascomicetos carecen de la enzima xantina oxidasa; siendo incapaces, por tanto, de degradar las nucleobases purínicas (Werner y Witte, 2011).

Los organismos también pueden sintetizar nucleótidos de purina desde las nucleobases presentes en el medio exterior. Para ello requieren de su incorporación al espacio intracelular. En los organismos estudiados, las bases purínicas se incorporan a la célula mediante transportadores específicos que se agrupan en diferentes familias. La familia xantina-uracilo permeasa, conocida genéricamente como la familia NAT (Nucleobase Ascorbate Transporter) o familia NCS2 (Nucleobase Cation Symporter 2), incluye transportadores con diferente especificidad. Algunos miembros de la familia actúan principalmente como permeasas de ácido úrico, caso de las proteínas UapA y UapC de *Aspergillus nidullans* que median la entrada a la célula de más del 95% del ácido úrico y sólo el 8-10% de la incorporación de hipoxantina va vía esos transportadores (Diallinas *et al.*, 1995). Por el contrario, otros miembros de la familia como la proteína YgfOp de *Escherichia coli* tienen alta afinidad por la nucleobase xantina y son incapaces de transportar uracilo, hipoxantina, o ácido úrico (Karatza y Frillingos, 2005).

Sin embargo, en mamíferos todas las proteínas pertenecientes a la familia NAT están especializadas en el transporte de vitamina C y hasta la fecha no se ha descrito ninguna proteína capaz de mediar el transporte de nucleobases y/o nucleósidos (Rivas *et al.*, 2008). Tampoco en protozoos se han descrito proteínas con la firma NAT/NCS2 capaces de mediar el transporte de nucleobases.

En mamíferos y protozoos sólo se han descrito transportadores de la familia ENT (Equilibrative Nucleoside Transporters) implicados tanto en el transporte de nucleobases como de nucleósidos (Karatza y Frillingos, 2005; Rivas *et al.*, 2008). El transportador ENT1 de mamíferos, está descrito como responsable del transporte de los nucleósidos adenosina e inosina y de la nucleobase hipoxantina, mientras que el transportador ENT2, media el transporte de los nucleósidos inosina, guanosina y adenosina y de las nucleobases guanina y adenina. Los ortólogos a estos transportadores en protozoos son las proteínas CfNt1p y CfNt2p, respectivamente (Baldwin *et al.*, 2004; Burchmore *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

En plantas, además de los transportadores de las familias NAT y ENT, existen dos familias específicas, la familia PUP (Purine Uptake Permease) y UPS (Ureidin Permease). La familia PUP se originó a lo largo de la evolución terrestre de las plantas, durante la transición de briófitas a licófitas, derivando de transportadores preexistentes de nucleótidos y azúcares pertenecientes a la familia de transportadores de drogas y metabolitos DMTs. Los transportadores PUP están implicados en el transporte de metabolitos primarios, como pueden ser las nucleobases, y secundarios, como la nicotina, de derivados purínicos (Mansfield *et al.*, 2009; Jelesko, 2012).

Una vez que se internalizan en la célula, las nucleobases se convierten a sus correspondientes nucleótidos. Así pues, a partir de las bases purínicas podemos obtener sus respectivos nucleótidos por procesos de fosforribosilación, con consumo de una molécula de PRPP.

De esta manera las rutas de recuperación no solo participan en la regulación intracelular de nucleótidos, sino que también intervienen en la reutilización de nucleobases y nucleósidos libres en el espacio intra o extracelular (Figura 8).

Al contrario de lo que ocurre con la ruta *de novo*, las rutas de recuperación están menos conservadas, variando de unos organismos a otros. Esto no significa que sean menos importantes, pues estas rutas son esenciales en los protistas parásitos del grupo de los apicomplejos (como los causantes de la toxoplasmosis y la malaria) que han tenido una pérdida secundaria de la ruta *de novo*, debido a su adaptación a la vida parasítica. En los apicomplejos se puede apreciar una gran variedad en estas rutas (Chaundhary *et al.*, 2004). El conocimiento profundo de los componentes y funcionamiento de las rutas de estos organismos puede aportar en un futuro dianas específicas en el desarrollo de medicamentos (Ulman y Carter, 1995; Craig y Eakin, 1997; Berg *et al.*, 2010).

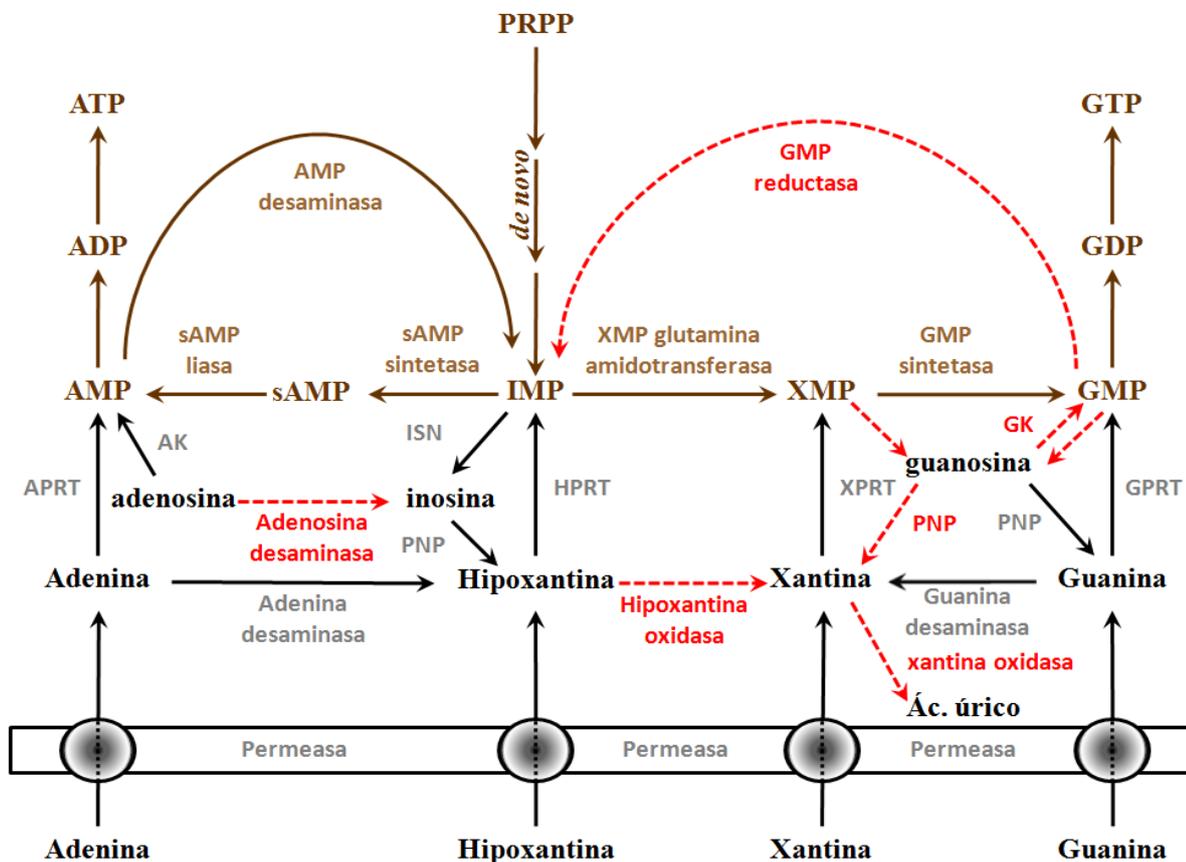


Figura 8. Representación esquemática del metabolismo de purinas. En color marrón se indican los pasos correspondientes a la biosíntesis *de novo*, mientras que en color gris se indican las actividades propias de las rutas de recuperación presentes en *S. cerevisiae*: ISN, nucleotidasa específica de IMP; PNP, nucleósido fosforilasa de purinas; AK, adenosina quinasa; APRT, adenina fosforribosiltransferasa; HPRT, hipoxantina fosforribosiltransferasa, XPR, xantina fosforribosiltransferasa; GPRT, guanina fosforribosiltransferasa. En color rojo y línea discontinua se representan las actividades ausentes en *S. cerevisiae*: GK, guanosina quinasa.

En la naturaleza existen cuatro actividades de fosforribosilación correspondientes a cada una de las nucleobases de purina: adenina fosforribosiltransferasa (APRT) que

cataliza la formación de AMP a partir de adenina, hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT) que cataliza la formación de XMP a partir de hipoxantina, guanina fosforribosiltransferasa (GPRT) que cataliza la formación de GMP a partir de guanina y xantina fosforribosiltransferasa (XPRT) que cataliza la formación de XMP a partir de xantina. Aunque en algunos organismos una misma enzima es capaz de desarrollar varias actividades, el caso más extendido es la utilización de guanina e hipoxantina (HGPRT), e incluso guanina, xantina e hipoxantina (HGXPRT); solo en el protozoo *Giardia lamblia* se ha encontrado una enzima específica para la guanina, y no se ha observado en ningún organismo una enzima específica para hipoxantina. Los datos actuales indican que la actividad APRTasa es la más conservada en los organismos, una sola enzima realiza esta actividad (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución biológica de las PRT*.					
ORGANISMO	APRT	GPRT	XPRT	HGPRT	HGXPRT
Bacteria					
<i>Escherichia coli</i>	*		*	*	
<i>Haemophilus influenzae</i>	*		*	*	
<i>Salmonella typhimurum</i>	*		*		
<i>Lactococcus lactis</i>	*			*	
<i>Mycoplasma sp.</i>	*			*	
<i>Borrelia sp.</i>	*			*	
<i>Synechocystis sp.</i>	*				
Archaea					
<i>Methanococcus voltae</i>	*		*	*	
<i>Methanococcus jannaschii</i>	*				
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	*		*	*	
<i>Haloferax volcanii</i>	*			*	
<i>Halobacterium halobium</i>	*			*	
Eucaria					
<i>Giardia lamblia</i>	*	*			
<i>Trichomonas foetus</i>	*				*
<i>Toxoplasma sp.</i>	*				*
<i>Plasmodium sp.</i>	*				*
<i>Eimeria sp.</i>	*				*
<i>Tetrahymena sp.</i>	*			*	
<i>Leishmania sp.</i>	*		*	*	
<i>Kinetoplastidia sp.</i>	*		*	*	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	*		*	*	
<i>Schistosoma mansoni</i>	*			*	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	*			*	
mamíferos	*			*	

* Modificado de Becerra y Lazcano, 1996.

En los géneros de protozoarios *Cryptosporidium* y *Theileria* no existen actividades PRT, y dependen exclusivamente de la reutilización de adenosina a través de la quinasa de adenosina para la biosíntesis de los nucleótidos purínicos (Chaudhary *et al.*, 2004).

La familia de las PRT incluye enzimas capaces de fosforribosilar otros compuestos nitrogenados como el amonio, orato y uracilo. Aunque no todas las proteínas de la familia PRT tienen actividad enzimática.

Por ejemplo, en algunas bacterias las proteínas PRT regulan la expresión de los genes de la ruta biosintética de purinas y pirimidinas. No todas las enzimas con actividad PRTasa son miembros de las familias de los PRT, solo aquellas que presentan la secuencia del motivo PRT se incluyen dentro de la familia. Este motivo consiste en cuatro aminoácidos hidrofóbicos, dos aminoácidos de carácter ácido y siete aminoácidos de carácter variable, que generalmente incluyen glicina y treonina (Figura 9). Pero a parte de este motivo las diferentes PRT tienen un bajo nivel de identidad de secuencia, generalmente menor del 15% (Sinha y Smith, 2001).

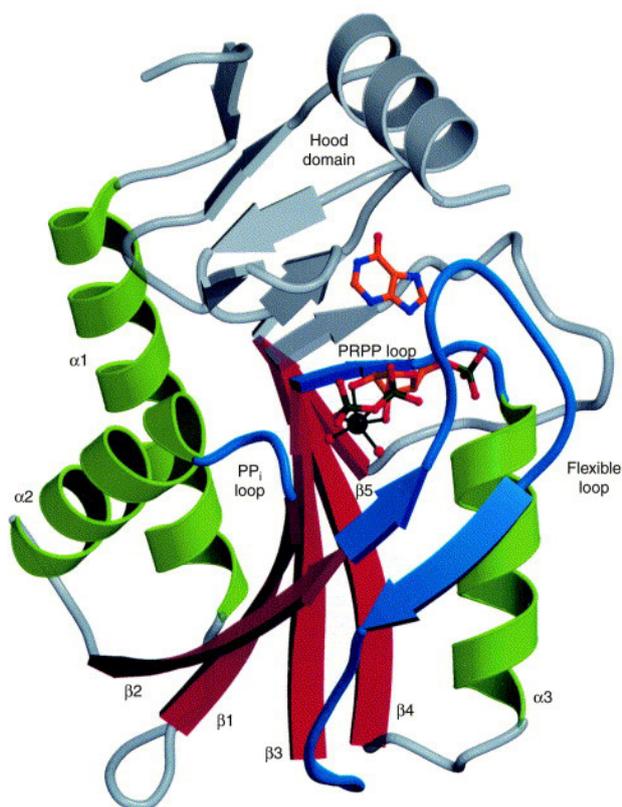


Figura 9. Estructura de la proteína HGXPRT de *T. cruzi*. El núcleo común se resalta en verde las hélices α , y en rojo las hojas plegadas β . Los lazos de unión $Mg \bullet PRPP$ (PRPP lazo, lazo de PP_i y bucle flexible) están resaltados en azul. El resto de la proteína está en gris. Todos los detalles atómicos se muestran para los sustratos $Mg \bullet PRPP$ e hipoxantina, el color de acuerdo al tipo de átomo (de carbono, el naranja, de oxígeno, el color rojo, de nitrógeno, el azul, de fósforo, el verde, Mg, negro y agua, esferas rojas).

(Sinha y Smith, 2001).

Los estudios realizados en mamíferos indican que la importancia que tienen las rutas de recuperación en la biosíntesis de purinas, depende del tipo celular y su distrito, como en el caso de los glóbulos rojos y el cerebro humano que dependen casi exclusivamente de estas vías de rescate de purinas. Estas actividades están bien estudiadas puesto que existen varias enfermedades graves relacionadas con la disfunción de las enzimas implicadas. La deficiencia de la APRT es un desorden autosómico recesivo, la adenina que se acumula al no poder ser reciclada por las rutas de recuperación

es convertida por la deshidrogenasa de xantina (cuya función principal es catalizar la transformación de xantina en urato) en 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA). La 2,8-DHA es insoluble en la orina, por lo tanto los síntomas están relacionados con los riñones y el tracto urinario, como hematuria, nefrolitiasis, infecciones del tracto urinario, además de lesiones en los riñones y enfermedades crónicas de riñón que pueden dar lugar a daños irreversibles provocando la enfermedad renal en estado terminal (ERT) (Harambat *et al.*, 2012). Pero el desorden más estudiado es la deficiencia de la HGPRT por mutación del gen *HPRT1* cuyo mayor exponente es el síndrome de Lesch-Nyhan, que es un desorden hereditario asociado al cromosoma X, caracterizado por hiperuricemia con hiperuricosuria, nefrolitiasis con fallo renal y gota, disfunción neuronal con distonia, disartria, disfagia, espasticidad y hiperreflexia, retraso mental con comportamientos agresivos compulsivos que pueden llegar a automutilaciones. Existe una buena correlación entre el nivel de actividad de la enzima y la gravedad de la enfermedad (McKeran y Watts, 1976). Otros trastornos están asociados a deficiencias en las actividades nucleotidasa, nucleósido fosforilasa, adenosina desaminasa (Camici *et al.*, 2009).

En *S. cerevisiae* las rutas de recuperación están bien estudiadas al ser un organismo modelo. En la levadura existen tres enzimas codificadas por los genes *APT1* para la actividad APRT, el gen *HPT1* para la actividad HGPRT y el gen *XPT1* para la actividad XPRT. La enzima Xpt1p es un 56% idéntica a Hprt1p, rescatando la sobreexpresión del primero la interrupción del segundo, por lo cual se considera que puede usar hipoxantina como sustrato (Guetsova *et al.*, 1999).

Las rutas de recuperación en *S. cerevisiae*, son asimétricas debido a que los derivados de adenina pueden ser convertidos en nucleótidos de guanina, mientras que el caso contrario no se da. Como consecuencia de esta asimetría, la reducción de la síntesis o la degradación son los únicos modos de disminuir la cantidad de derivados guanílicos. El equilibrio entre los nucleótidos de adenina y guanina es sutilmente regulado al nivel de la síntesis (Saint-Marc y Daignan-Fornier, 2004).

Para otros hemiascomicetos se toman como referencia los estudios realizados en *S. cerevisiae* al ser un organismo modelo y pertenecer al mismo grupo. Pero no en todos estos organismos se han estudiado las rutas de recuperación de nucleobases de purina. Un ejemplo de ello es el hongo *A. gossypii*, en el cual los mecanismos de reciclaje de las purinas no estaban estudiados.

II.2.2.3. Regulación de la biosíntesis de nucleótidos purinas

La concentración y el equilibrio entre los distintos tipos de nucleótidos es fundamental para el correcto desarrollo de una gran cantidad de procesos celulares; se ha descrito que la desregulación de la síntesis de nucleótidos de purina da lugar a una inestabilidad genética ocasionada por la pérdida de fidelidad en el proceso de síntesis de ADN (Kunz *et al.*, 1994) e impide el desarrollo normal de la célula (Ahmed *et al.*, 1999 Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012).

Por esta razón, la regulación de la síntesis de nucleótidos de purina es compleja y en ella se observan varios niveles de control. La biosíntesis de los nucleótidos de purina está regulada por retroalimentación negativa, tanto a nivel enzimático como genético.

Tres mecanismos principales de retroalimentación cooperan en la regulación de la velocidad global de síntesis *de novo* de los nucleótidos de purina y de la velocidad relativa de formación de los dos productos finales, AMP y GMP. El primero de estos mecanismos de control se ejerce sobre la síntesis de PRPP a partir de ribosa 5-fosfato; la acumulación de los nucleótidos difosfato (ADP y GDP) inhibe la síntesis PRPP. Aunque la inhibición enzimática no llega a ser total, ya que el PRPP es también requerido en la síntesis de histidina y de pirimidinas (Becker *et al.*, 1975).

La primera reacción específica de la síntesis de nucleótidos de purina es la transferencia de un grupo amino al PRPP para formar la 5-fosforribosilamina. Esta reacción está catalizada por la enzima alostérica glutamina-PRPP amidotransferasa, que es inhibida por los productos finales IMP, AMP y GMP. En *A. gossypii* y en *S. cerevisiae* esta enzima está codificada por el gen *ADE4* y su actividad se inhibe fuertemente por GTP y ATP. Por el contrario la concentración de los nucleótidos monofosfato apenas tiene efecto (Jiménez *et al.*, 2005; Reborá *et al.*, 2001). Sin embargo, los nucleótidos monofosfato tienen un efecto negativo en la síntesis de PRPP, ya que inhiben la actividad ribosa fosfato piroquinasa. El AMP y el GMP actúan de manera sinérgica en esta inhibición concreta. Así pues, siempre que el AMP o el GMP se acumulan en exceso, el primer paso de su biosíntesis a partir de PRPP se inhibe parcialmente.

En el segundo mecanismo de control, que se ejerce más adelante, tanto el exceso de GMP, XMP y AMP en la célula inhibe la formación de XMP a partir de IMP, catalizada por la IMP deshidrogenasa, sin afectar a la formación de AMP (Holmes *et al.*, 1974). Por el contrario, una acumulación de AMP, GDP y Pi inhibe la formación de adenilosuccinato por la adenilosuccinato sintetasa, sin afectar a la síntesis de GMP (Muirhead *et al.*, 1947).

En el tercer mecanismo de control viene determinando por las concentraciones de los nucleótidos GTP y ATP, ya que son estas moléculas las responsables de aportar la energía que se requiere para la formación de los productos finales. El GTP es necesario para la conversión de IMP en AMP, mientras que el ATP es necesario para la conversión de IMP en GMP, un control recíproco que tiende a equilibrar la síntesis de los dos ribonucleótidos (Figura 10).

Estudios de la regulación transcripcional de la biosíntesis de nucleótidos de purina en *S. cerevisiae* han revelado que todos los genes que codifican las enzimas requeridas para la síntesis de AMP a través de la ruta *de novo* son reprimidos por la presencia extracelular de adenina o hipoxantina (Daignan-Fornier, 1992; Denis *et al.*, 1998; Giani *et al.*, 1991; Manstala *et al.*, 1984) a nivel transcripcional. Del mismo modo que ocurre en la levadura, en *A. gossypii* el gen *ADE4* presenta una fuerte represión en presencia de

adenina (Jiménez *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2006). Los factores de transcripción Bas1p y Bas2p regulan la activación de los genes *ADE*, así como algunos genes implicados en la biosíntesis de histidina (un intermediario de la ruta es el AICAR), pues ambas rutas son correguladas (Daignan-Fornier y Fink 1992). Mutaciones en ambos factores alteran los niveles basales de expresión de los genes bajo su control y disminuyen el nivel de represión ejercido por la adenina. El mecanismo de corregulación no se debe a un efecto directo de Bas1p y Bas2p, sino a un efecto indirecto asociado al descenso en la concentración de purinas. Cuando los mutantes *bas1* y *bas2* crecen en un medio carente de adenina se produce un descenso en la concentración intracelular de purina y, específicamente, de ATP que limita la primera etapa de la ruta biosintética de histidina. La inactivación del gen *AgBAS1* en *A. gossypii*, da lugar a un fenotipo de sobreproducción de riboflavina (Mateos *et al.*, 2006). Mientras que el papel de AICAR en la regulación no está totalmente claro pero podría actuar de manera similar que el SAICAR, que solamente se produce en la ruta del IMP, es necesario tanto para la activación óptima de los genes *ADE* como para promover la interacción entre Bas1p y Bas2p en *S. cerevisiae* (Rébora *et al.*, 2001, Rébora *et al.*, 2003).

En *S. cerevisiae* el factor *GCN4* activa la expresión del gen *ADE4* y de varios aminoácidos en situaciones de carencia de nutrientes (Mosch *et al.*, 1991). A nivel transcripcional también está regulado el gen *IMD2* codificante de la actividad IMP deshidrogenasa (IMPDH), que cataliza la primera reacción de la biosíntesis de GMP. En *S. cerevisiae* hay una familia de cuatro genes que potencialmente codifican la IMPDH, genes *IMD1*, *IMD2*, *IMD3*, e *IMD4* y sólo cuando se delecionan los cuatro genes se consigue la eliminación total de la actividad IMPDH, aunque el gen *IMD1* parece comportarse como un pseudogen (Hyle *et al.*, 2003). En el gen *IMD2* se han descrito dos elementos reguladores en cis, GRE y NSE, necesarios para controlar la regulación del gen en presencia de guanina (Escobar-Henriques *et al.*, 2001; Escobar-Henriques *et al.*, 2003a) y en situación limitantes de nutrientes (Escobar-Henriques *et al.*, 2003b) respectivamente. Tanto el gen *IMD3* como el *IMD4* se expresan de manera constitutiva.

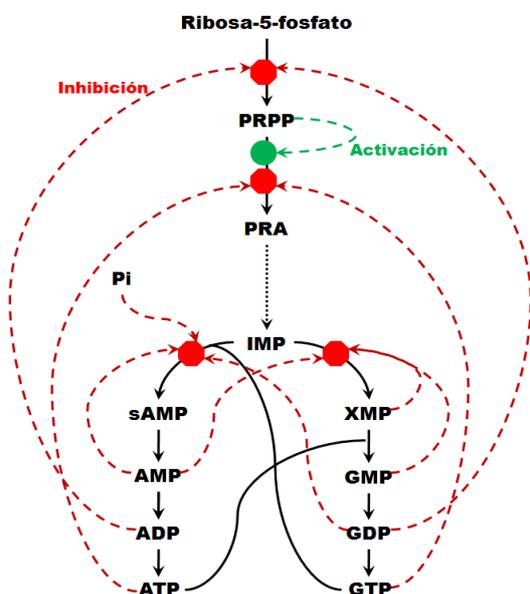


Figura 10. Representación esquemática de la regulación enzimática de la biosíntesis de purinas.

II.2.2.4. Farmacología y biosíntesis de purinas

Dado el importante papel que desempeñan los nucleósidos, cualquier modificación en su estructura puede resultar tóxica y/o mutagénica. Las nucleobases modificadas con estos efectos se las denomina análogos, antimetabólitos o citotóxicos (Freese, 1959). *In vivo* tales análogos pueden proceder del metabolismo celular normal o bien por acción de factores químicos y/o físicos como agentes alquilantes o radiaciones ionizantes. Por otro lado, antimetabólitos sintéticos con propiedades mutagénicas o inhibitorias se han utilizado como herramientas para el estudio de procesos celulares fundamentales tales como el mecanismo de replicación y reparación del ADN (Kozmin *et al.*, 2008)

Los análogos purínicos se emplean en farmacología para el control del crecimiento celular, bien sea por ser inhibidores competitivos de los intermediarios de la biosíntesis de purinas o por ser metabolizados a través de las vías de recuperación. Se han utilizado con éxito como agentes terapéuticos frente al cáncer, infecciones virales y en patologías ocasionadas por tripanosomas como la enfermedad del sueño. Como ejemplos de agentes antiproliferativos usados en la actualidad tenemos : 6-tioguanina (análogo de guanina), 5-fluorouracilo (análogo del uracilo) y 6-mercaptopurina, todos estos empleados en el tratamiento de la leucemia y el cáncer; AraA, Aciclovir y Ganciclovir frente a virus cuyo genoma es ADN; ribavirina y AZT contra retrovirus; alopurinol y pirimetamina contra infecciones por protozoos (Kolb, 1997).

Los principales compuestos utilizados en este trabajo son el ácido micofenólico, la 8-azaguanina, la 8-azaadenina y la 8-azaxantina (Figura 11).

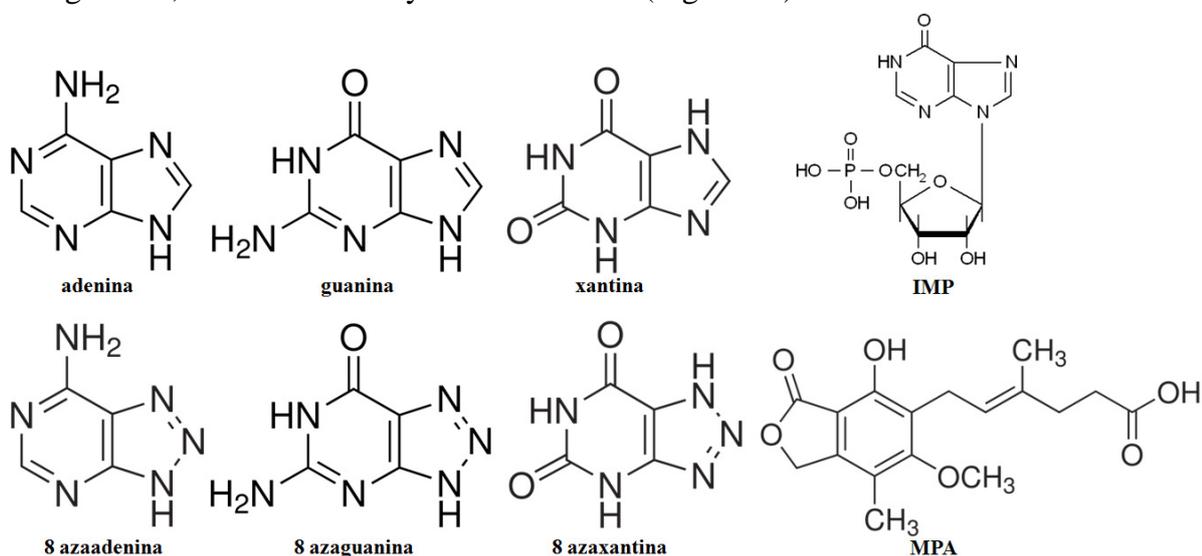


Figura 11. Estructura química de compuestos purínicos y sus antimetabolitos.

El ácido micofenólico (MPA) es un inhibidor potente, selectivo, no competitivo y reversible de la IMP deshidrogenasa que reduce drásticamente el contenido intracelular de GTP por debajo del 10% de los niveles normales, reduciendo la proliferación exponencial de varios tipos celulares. El MPA afecta particularmente a la división de los linfocitos y sin apenas efectos secundarios, por lo que es un inmunosupresor de uso común. A nivel

celular, el MPA inhibe la progresión del ciclo celular de los linfocitos deteniendo las células en G1. Aunque este efecto se correlaciona con la reducción de los nucleótidos guanílicos, la adicción de guanosina y 8-aminoguanosina no permite a la célula a reentrar G2/M. EL tratamiento con MPA también afecta a pasos posteriores del ciclo celular (Sagot *et al.*, 2005).

La 8-azaguanina es un triazol análogo de guanina e inhibidor de la biosíntesis de purinas. Fue el primer compuesto en el que se vio su potencial carcinostático, utilizándose originalmente como agente antitumoral. En las células la 8-azaguanina se metaboliza a 8-azaGMP por acción de la GPRT y a partir del nucleótido monofosfato se forma el nucleótido di- y tri-fosfato. El agente 8-azaguanina reduce la síntesis de nucleótidos de purina al inhibir parcialmente las actividades adenosina desaminasa y APRT, pero también inhibe las actividades xantina oxidasa y nucleósido fosforilasa (Feigelson y Davidson, 1956). Llega a incorporarse a los ácidos nucleicos, tanto al ARN como, en menor medida al ADN. Como agente intercalante de los ácidos nucleicos afecta a la función de las polimerasas. La importancia de las mutaciones por su incorporación al ADN depende de la esencialidad del gen o los genes afectados. Por su incorporación al ARN afecta a la síntesis de proteínas, este efecto está mediado por la incorporación del análogo al ARNm que interfiere con la estructura y función de traducción de los polisomas (Sanyal *et al.*, 1985; Rivest *et al.*, 1982).

La 8-azaxantina resulta menos tóxica que la 8-azaguanina. La sobreexpresión de la desaminasa de guanina reduce la toxicidad de la 8-azaguanina (Saint-Marc y Daignan-Fornier, 2004). La 8-azaadenina como análogo de la adenina, se metaboliza por la APRT. Puede dar lugar a derivados guanílicos tóxicos produciendo los mismos efectos que la 8-azaguanina. También induce eventos de rotura de la cromatina. Afecta a receptores adenosínicos y también a las transducción de señales al producir 8-azaAMPc (Smith *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2000; Giorgi *et al.*, 2008).

Cuando se aíslan mutantes espontáneos resistentes a estos análogos de las nucleobases de purina por exposición a los mismos, se ha observado que la causa más frecuente de resistencia está relacionada con una deficiencia de la actividad purina fosforribosiltransferasa correspondiente a la nucleobase análoga (Stuer-Lauridsen y Nygaard, 1998).

II.2.3. *Ashbya gossypii* en la producción industrial de riboflavina.

La riboflavina se ha producido a escala industrial por síntesis química pura o una mezcla de procesos que incluyen la biosíntesis de D-ribosa y su conversión química a riboflavina, o totalmente mediante fermentación dando lugar directamente a la vitamina.

Kuhn y Karrer desarrollaron en 1934 los procesos empleados para la síntesis química de riboflavina, empleando como sustrato D-ribosa y aloxano. El procedimiento más utilizado (Figura 12) comenzaba con la transformación de D-glucosa en D-ribosa,

sirviendo de base para la formación de ribitol, en una serie de pasos, para alguno de los cuales era necesario alcanzar 135° C. Con los avances hechos por los investigadores de TAKEDA entre 1974 y 1975, se pudo obtener D-ribosa empleando mutantes de *Bacillus subtilis* y *B. pumilus*, a menor coste que mediante síntesis química. Aunque el resto del proceso seguía siendo químico para la formación del núcleo de isoaloxacina, adicionando amidas aromáticas (xilidina y anilina) así como ácido barbitúrico.

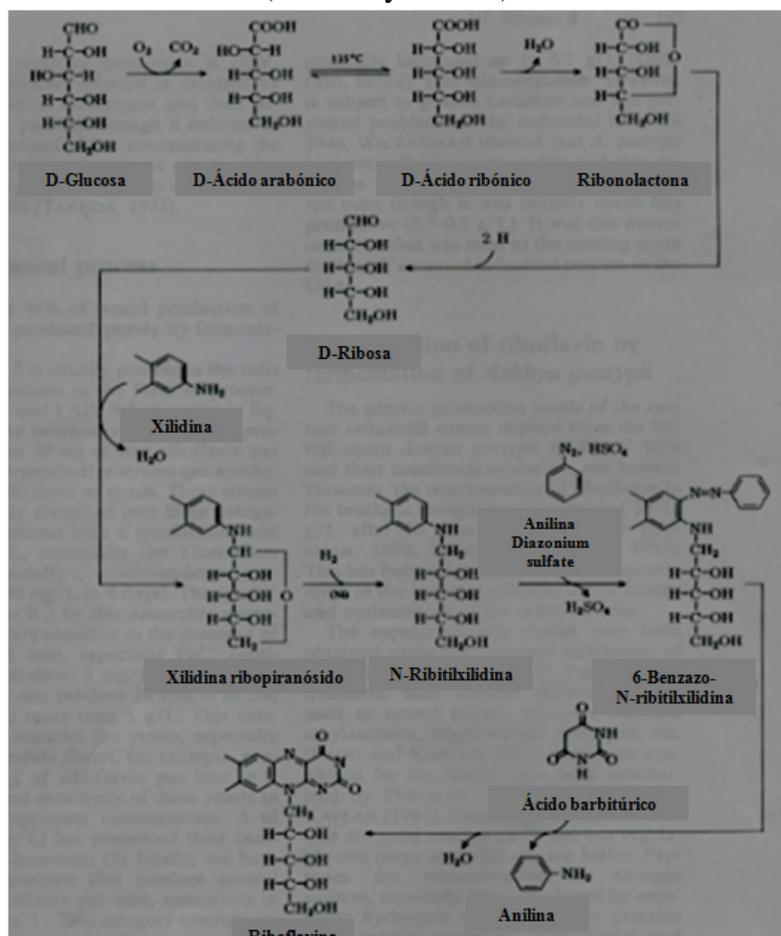


Figura 12. Esquema de la síntesis química de riboflavina.

La primera riboflavina comercial obtenida íntegramente por procesos fermentativos fue establecida con *Clostridium acetobutylicum* creciendo en purés de cereales o en suero (Meade *et al.*, 1947; Perlman, 1979). Este proceso tuvo éxito en 1940 por *E. ashbyi* y 1946 por *A. gossypii* (Perlman 1979; Wickerman *et al.*, 1946). En 1965 tres compañías, Commercial Solvents, Grain Processing Corporation y Premier Malt Products, produjeron riboflavina por fermentación. Tres años después las plantas de producción tuvieron que cerrar porque no podían competir con el proceso químico (Lago y Kaplan 1984). En 1974 se retomó el proceso fermentativo por MERK usando esta vez a *A. gossypii*; y desde entonces el empleo de los procesos fermentativos ha ido ganando terreno.

En la actualidad la síntesis biotecnológica representa un 90% de la producción. Esto se debe a que el método biotecnológico no solamente abarata los costos de producción, sino que es mucho más ecológico al reducir los residuos tóxicos generados por la industria química y los requerimientos energéticos, emplea recursos renovables

como azúcares y aceites vegetales y la calidad del producto es igual o superior (van Loon *et al.*, 1996). Las grandes compañías productoras de riboflavina son BASF (Alemania), ADM (USA), DSM (USA), Hoffmann-La Roche (Suiza) y Hubei Guangji Pharm (China). Estas tres últimas firmas emplean cepas modificadas de *B. subtilis*, ADM emplea la levadura *C. famata* y BASF emplea cepas mejoradas de *A. gossypii*. La producción de estas empresas se estima en 8000 toneladas anuales. La producción de *A. gossypii* representa un 30% del total (Stahmann *et al.*, 2000; Kato y Park 2012).

La producción de riboflavina en *A. gossypii* está afectada por los componentes del medio de crecimiento. De tal modo que se han ensayado diversos compuestos con los que mejorar el rendimiento biosintético. A nivel industrial los resultados óptimos se obtuvieron si la fuente de carbono era aceite de soja y el medio estaba suplementado con glicina; los datos se recogen en la Tabla 3 (Lim *et al.*, 2001). También se han ensayado con diversos desechos de otras industrias como los residuos de tierra de blanqueo activada (wABE) que se produce durante el refinamiento de aceite crudo obteniendo buenos resultados (Ming *et al.*, 2003).

Tabla 3. Producción de riboflavina en <i>A. gossypii</i> en diferentes condiciones de cultivo				
Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Suplementos	Producción de riboflavina (g/l)	Tiempo de cultivo (días)
Glucosa	Asparagina, glicina, tirosina	Tween 80, hipoxantina, biotina, tiamina, inositol	0,4-1,0	8
Aceite de maíz, aceite de soja	CSL, extracto de levadura, colágeno, proteínas	-	5,0	8
Aceite de soja, grasa ósea	CSL, gelatina	Glicina	5,0	8
Aceite de soja	CSL, gelatina, adhesivo cutáneo	Glicina	5,5	8

La cepa de *A. gossypii* originalmente descrita producía entre 0,3-0,5 g de riboflavina por litro de cultivo, pero cepas mejoradas posteriormente llegan a producir entre 10-15 g/l después de 10 días de fermentación (Demain, 1980). Con respecto a los medios más adecuados de cultivo, se ha descrito que la producción de riboflavina puede mejorarse suplementando dichos medios con precursores como glicina o ribitol (Mehta *et al.*, 1972) así como el uso de aceites vegetales (Ozbas y Kutsal, 1986) y la adición de purinas (Kato y Park 2011). La temperatura óptima de crecimiento está en torno a los 28°C y a un pH de 6,8. En la actualidad se desconocen las cepas utilizadas por la industria y por tanto la producción de éstas.

Para la obtención de las cepas industriales en un principio se usaron técnicas de mutación bien por luz ultravioleta o por agentes químicos, y su posterior selección por la acumulación de riboflavina claramente visible por su coloración amarilla. También el

empleo de análogos de la purinas como agentes mutagénicos han permitido el aislamiento de cepas con mayores capacidades de producción de riboflavina. En la actualidad estas técnicas se complementan o sustituyen por técnicas de ingeniería metabólica empleando manipulación génica.

Dentro de las mejoras por manipulación génica se han desarrollado cepas con modificaciones en la propia ruta de biosíntesis de riboflavina. Trabajos desarrollados en nuestro laboratorio han demostrado que la sobreexpresión de la ciclohidrolasa I (*RIB1*) conduce a un incremento de la producción de riboflavina en la cepa silvestre. Cuando esta sobreexpresión se realizó en cepas industriales resultó letal, debido a que la mayor parte del GTP sintetizado por la célula era secuestrado por la ruta biosintética de riboflavina, no dejando el suficiente disponible para la síntesis de otros metabolitos imprescindibles en la célula como ocurre con el ácido fólico. Otra modificación más exitosa fue la integración al azar en el genoma de una cadena que contenía los tres últimos genes participantes en la ruta de biosíntesis, *AgRIB3*, *AgRIB4* y *AgRIB5* mostró un incremento del 2,5% de producción en comparación con una cepa que solo poseía una copia de cada gen (Althöfer *et al.*, 1998). Como ocurre con la sobreexpresión del gen *RIB1*, otras modificaciones realizadas sobre los genes *RIB* o bien no tienen efectos en la producción de riboflavina o son perjudiciales en el crecimiento del hongo.

La mejora en el proceso de biosíntesis del precursor GTP, que conlleva un incremento en la producción de riboflavina, se ha desarrollado hasta el momento con modificaciones en la ruta de biosíntesis *de novo* de nucleótidos purínicos. Estas modificaciones están dirigidas a incrementar la actividad de la ruta *de novo*. La sobreexpresión del primer gen de la ruta *de novo*, gen *ADE4*, responsable de la amidotransferencia del PRPP conlleva la desregulación de la ruta, aboliendo la inhibición por producto final como son los nucleótidos, entre ellos el GTP. La producción de riboflavina de esta cepa es 10 veces superior a la silvestre (Jiménez *et al.*, 2005). También se consigue la desregulación de la ruta *de novo* al inactivar por completo el gen *BAS1* cuyo producto actúa de factor de transcripción responsable de regular la ruta en respuesta a la presencia de derivados purínicos, incrementando la producción 6 veces con respecto al silvestre. También eliminando el dominio *BIRD* (binding regulatory domain) del gen *BAS1* se consigue un incremento en la producción de riboflavina 12 veces superior a la silvestre (Mateos *et al.*, 2006). Además el incremento de PRPP disponible, empleado en el primer paso de la ruta *de novo*, aumenta la actividad de la misma. Esto se ha conseguido al sobreexpresar las sintetasas de PRPP, codificadas por los genes *PRS*. La sobreexpresión de la *PRS2,4* conlleva un incremento de la producción de 1,7 veces superior al de la cepa silvestre, mientras que la sobreexpresión de *PRS3* supone un incremento del 1,8 (Jiménez *et al.*, 2008).

Estos trabajos realizados encaminados al incremento de la síntesis de GTP en *A. gossypii*, se han desarrollado incrementando las actividades relacionadas con la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purina. Puesto que las rutas de recuperación de

nucleobases de purina están intrínsecamente involucradas en la síntesis de GTP, la identificación de los genes implicados en el reciclaje de las nucleobases de purina y el conocimiento de cómo influyen en el balance de la concentración intracelular del ribonucleótido, permitirán establecer nuevos modelos para la obtención de mutantes sobreproductores tanto del ribonucleótido como finalmente de riboflavina.

The page features two vertical grey lines, one on the left and one on the right. At the top of each line is a grey crosshair symbol, and at the bottom is another grey crosshair symbol. Two horizontal grey bars are positioned across the lines, one above and one below the main text.

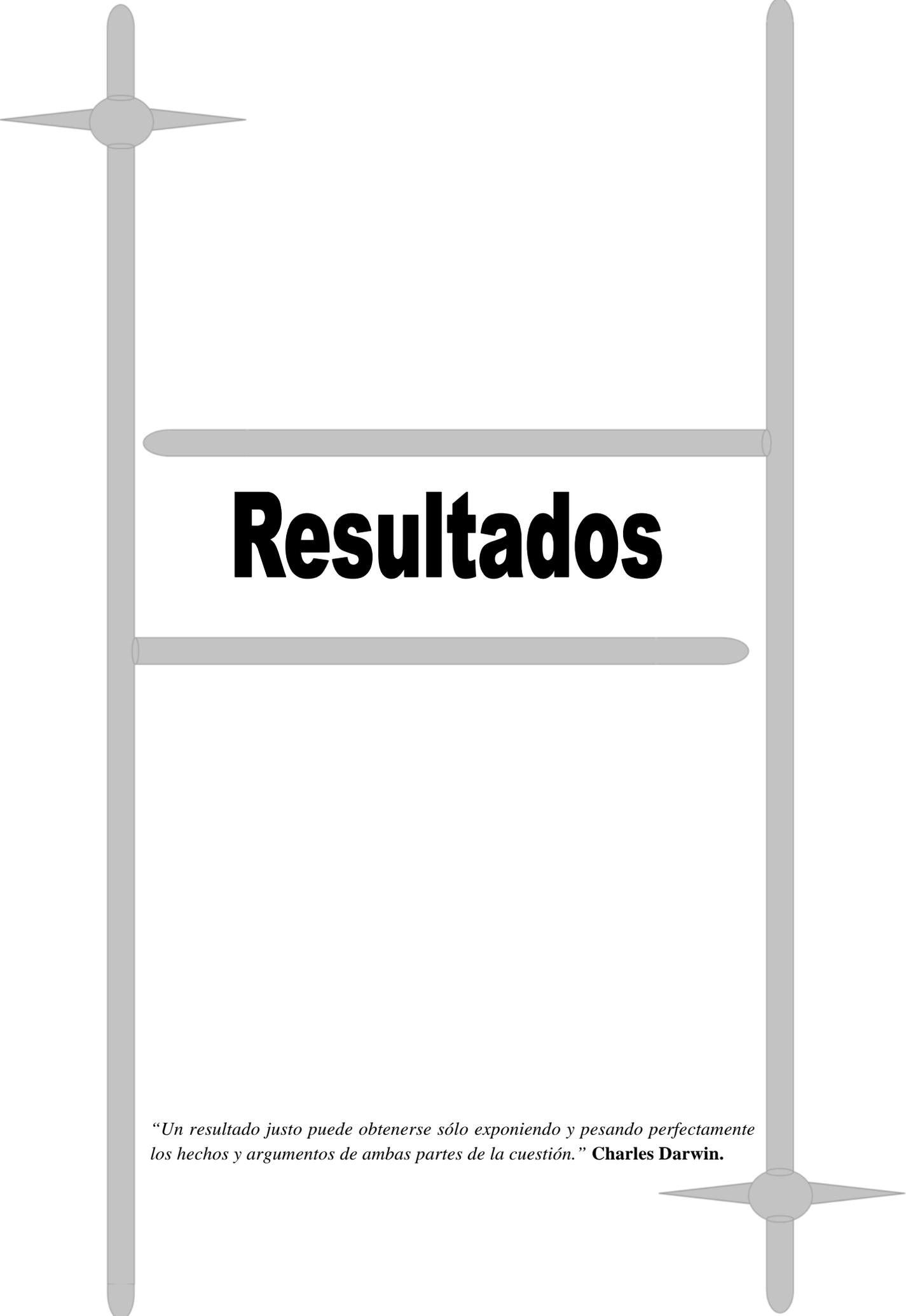
Objetivos

“No lo intentes. Hazlo, o no lo hagas, pero no lo intentes.” **Georges Lucas.**

Varios trabajos realizados con anterioridad en el laboratorio, a los que se ha hecho mención en el apartado anterior, han revelado que en *A. gossypii* la disponibilidad del precursor GTP es un factor limitante en la producción de riboflavina. En la célula, el nucleótido GTP puede sintetizarse a partir de fosforribosilpirofosfato y ribosa, a través de la ruta de síntesis *de novo*, o a partir de nucleobases libres, a través de las rutas de recuperación. A diferencia de la ruta de síntesis *de novo*, única y universal en todos los organismos celulares de vida libre, las rutas de recuperación constituyen una red de rutas interconectadas cuya complejidad varía de unos organismos a otros.

Dada la función que las rutas de recuperación tienen en la célula y su relación con la biosíntesis de riboflavina, en este trabajo nos hemos propuesto elucidar qué rutas son funcionales en *A. gossypii* y su relevancia en el proceso de producción de riboflavina. Para ello, fijamos dos objetivos concretos:

1. Identificar qué genes presentes en el genoma de *A. gossypii* están potencialmente implicados en las rutas de recuperación de las nucleobases de purina.
2. Caracterizar funcionalmente los genes identificados y establecer las rutas de recuperación de nucleobases de purina que son operativas en *A. gossypii*.



Resultados

“Un resultado justo puede obtenerse sólo exponiendo y pesando perfectamente los hechos y argumentos de ambas partes de la cuestión.” **Charles Darwin.**

I. DISECCIÓN GENÉTICA DE LAS RUTAS DE RECUPERACION DE NUCLEOBASES DE PURINAS EN *A. GOSSYPII*

I.1. GENES IMPLICADOS EN LAS RUTAS DE RECUPERACIÓN

En la identificación de los genes implicados en las rutas de recuperación se siguieron dos aproximaciones experimentales. Una de ellas consistió en la búsqueda en el genoma de *A. gossypii* de genes homólogos a genes ya caracterizados en otros organismos. En la segunda aproximación se recurrió al procedimiento clásico de complementación heteróloga, basado en el empleo de mutantes de la levadura *S. cerevisiae* y el uso de una genoteca genómica de *A. gossypii*.

I.1.1. Comparación de genomas: análisis de homología

La secuenciación y anotación del genoma de varias especies pertenecientes a la familia *Saccharomycetaceae*, entre los que se encuentran *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996) y *A. gossypii* (Dietrich *et al.*, 2004), ha permitido la creación de la aplicación informática “Yeast Gene Order Browser” (YGOB; Byrne y Wolfe, 2005). Esta aplicación, de acceso libre (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob>), permite buscar e identificar genes homólogos entre las especies de hemiascomicetos (Figura 13).

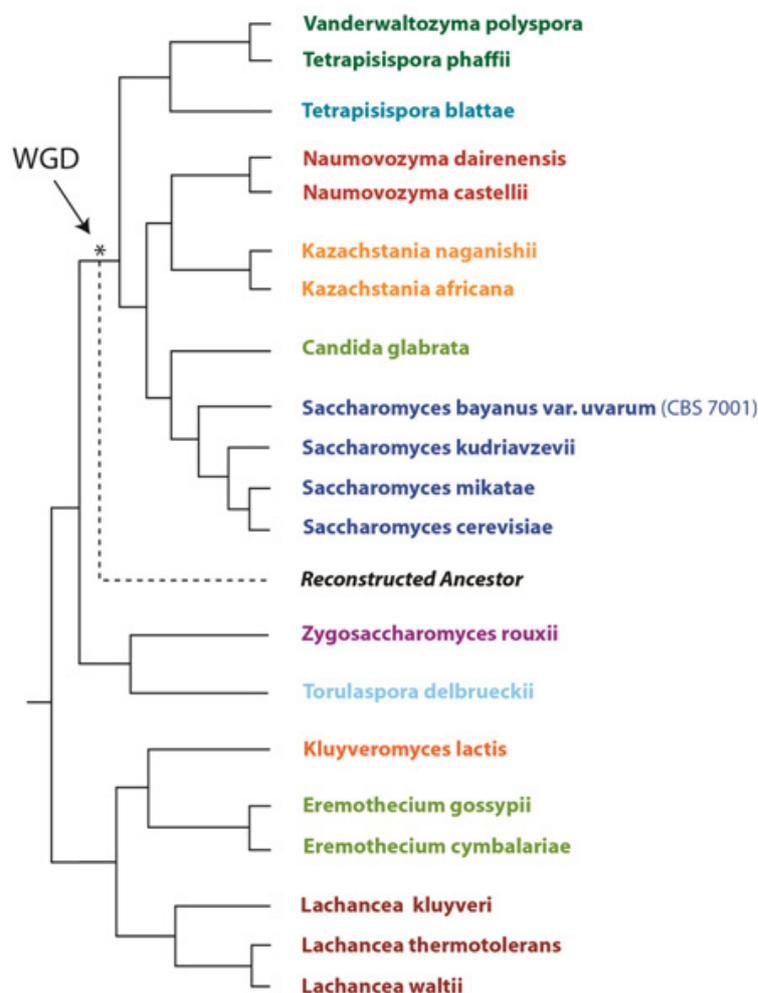


Figura 13. Árbol filogenético de los hemiascomicetos. Las relaciones evolutivas entre las diferentes especies de hemiascomicetos vienen marcadas por un proceso de duplicación del genoma completo **WGD** (whole-genome duplication), evento evolutivo que sufrieron parte de los miembros del taxón y que permite diferenciar dos grupos: aquellos que lo experimentaron y los que no.

En este árbol filogenético se utiliza la taxonomía más actualizada, por tanto se emplea el término *Eremothecium gossypii* en lugar de la sinonimia *Ashbya gossypii*.

Partiendo del conocimiento que actualmente se tiene sobre las rutas de recuperación de nucleobases de purina en *S. cerevisiae* y haciendo uso de la aplicación informática YGOB buscamos en el genoma de *A. gossypii* y en las diecinueve especies más de hemiascomicetos, homología para los genes ya identificados y caracterizados en la levadura de cerveza (Figura 14).

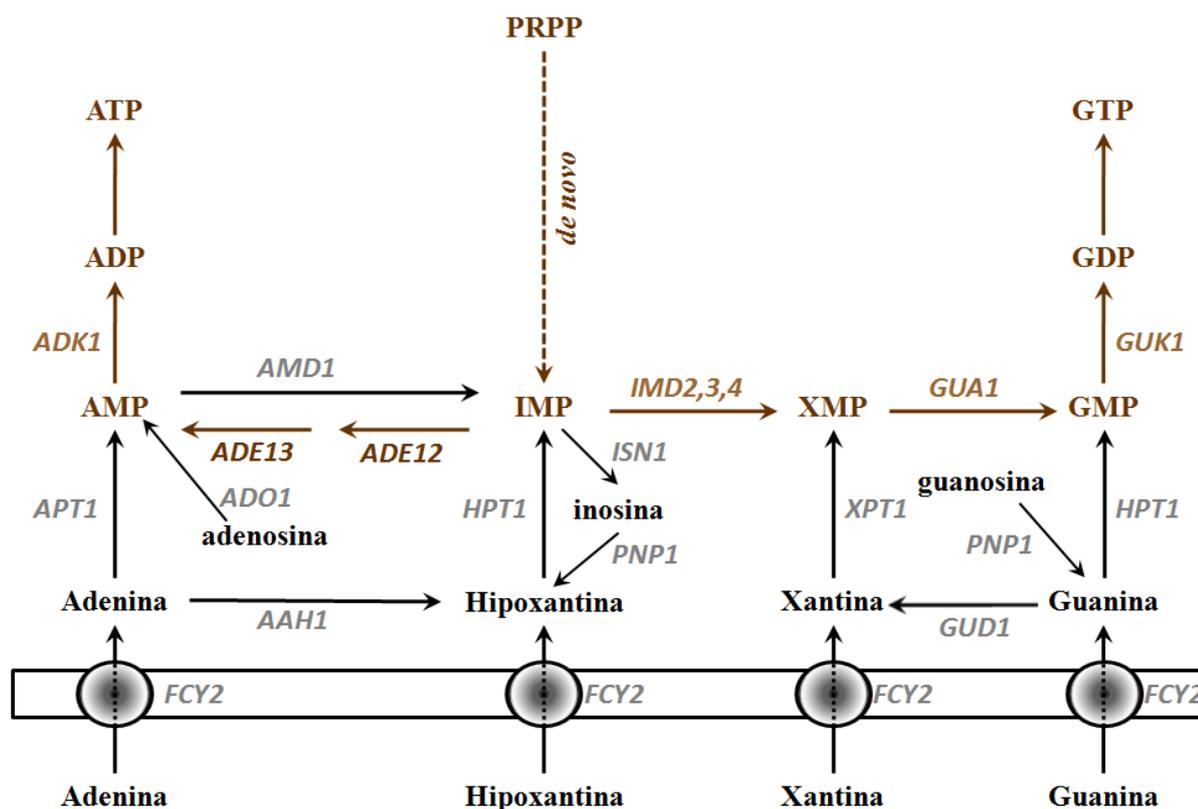


Figura 14. Genes implicados en las rutas de recuperación de los nucleótidos de purina en *S. cerevisiae*. En las rutas de recuperación, representadas con flechas negras, participan nueve genes (marcados en gris): *FCY2*, permeasa de purinas y citosina; *APT1*, APRT; *AAH1*, adenina desaminasa; *ADO1*, adenosina quinasa; *AMD1*, AMP desaminasa; *HPT1*, HGPRT; *ISN1*, IMP nucleotidasa; *PNP1*, inosina/guanosina fosforilasa; *XPT1*, XPRT; *GUD1*, guanina desaminasa. Las flechas marrones muestran las reacciones enzimáticas que conectan la ruta de síntesis *de novo*, con las rutas de recuperación. Los genes responsables de esas reacciones (color marrón claro) son: *ADE12*, adenilsuccinato sintetasa; *ADE13*, adenilsuccinato liasa; *ADK1*, AMP quinasa; *IMD2,3,4*, IMP deshidrogenasa; y *GUK1*, GMP quinasa.

En la búsqueda encontramos homología de secuencia para los genes *FCY2*, *APT1*, *XPT1*, *AMD1*, *ADO1*, *PNP1* e *ISN1* (Figura 15A). Sin embargo no encontramos ninguna secuencia genómica que diese homología con los genes *HPT1*, *AAH1* y *GUD1* (Figura 15B). La ausencia de estos tres genes queda restringida al género *Eremothecium*, y en *T. delbruekii* solo está ausente el gen *AAH1*, estando presentes en el genoma de las otras especies de hemiascomicetos. El resto de los genes están presentes en todos los demás organismos analizados, siendo excepciones el gen *FCY2* ausente en el genoma de *C. glabrata* pero que sin embargo presenta el gen *FCY22* con funciones similares (Hope *et al.*, 2004); y el gen *XPT1* ausente tanto en *Z. rouxii* y *T. delbruekii*.

También haciendo uso de las secuencias aminoacídicas conocidas, buscamos en el genoma de *A. gossypii* genes que pudiesen codificar las actividades enzimáticas hipoxantina oxidasa y GMP reductasa, presentes en muchas especies de bacterias y eucariotas superiores (Chaudhary et al., 2004; Hassan y Coombs, 1987; Xi et al., 2000; McKeran y Watts, 1976; Suzuki y Takahashi, 1974) y ausentes en *S. cerevisiae* (ver Figura 11). Esta búsqueda reveló que *A. gossypii*, al igual que *S. cerevisiae* y los otros hemiascomicetos, carece de genes homólogos a los genes que codifican las actividades hipoxantina oxidasa y GMP reductasa en otros organismos.

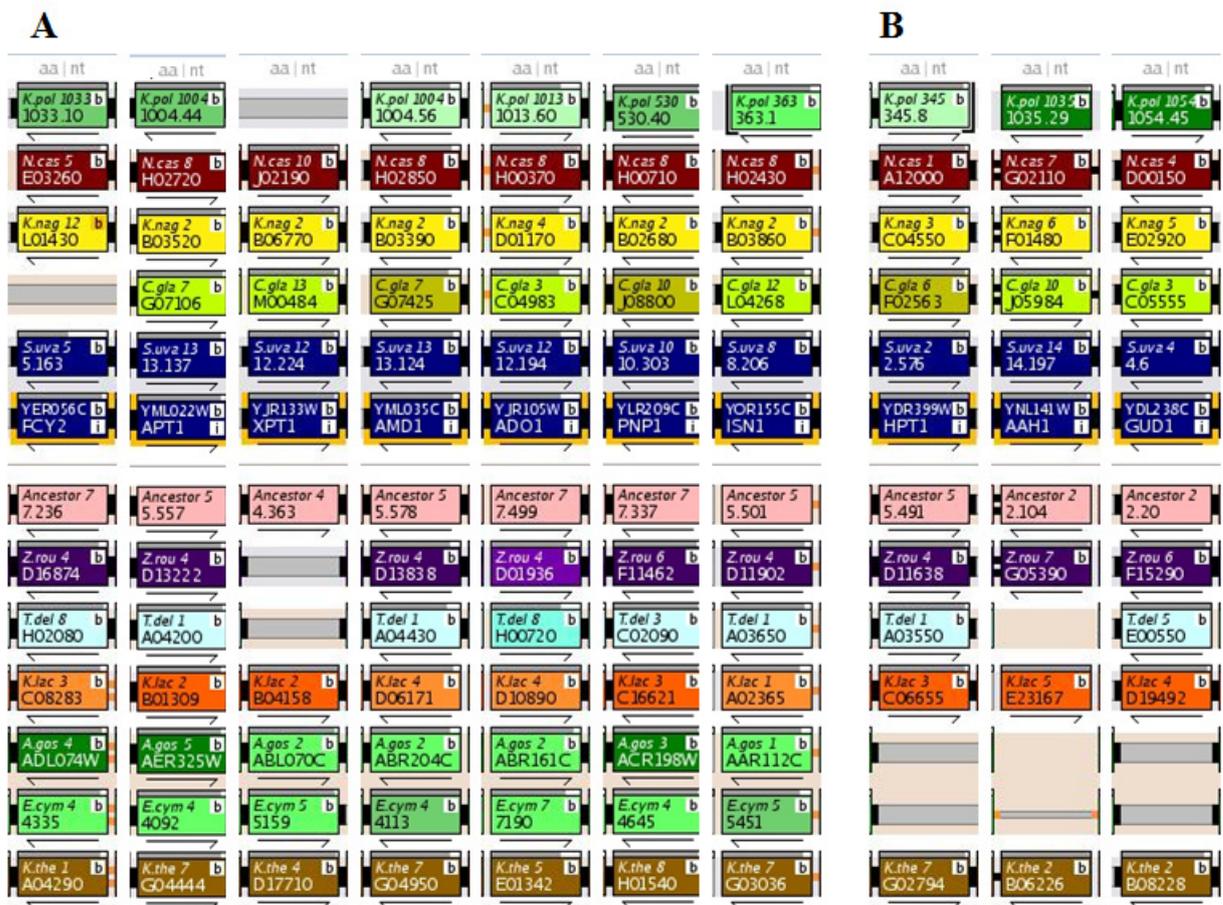


Figura 15. Identificación de los genes implicados en las rutas de recuperación de nucleobases de purina en *A. gossypii* mediante genómica comparada. Cada columna contiene la región genómica de cada especie (recuadro) que da homología de secuencia (nucleótidos, nt y aminoácidos aa) con cada uno de los genes de las rutas de recuperación de *S. cerevisiae* (genes *FCY2*, *APT1*, *XPT1*, *AMD1*, *ADO1*, *PNP1*, *ISN1*, *HPT1*, *AAH1* y *GUD1*). En cada recuadro se presenta la información asociada a cada locus en cada una de las especies: en la primera línea el nombre de la especie; en la segunda línea nombre con el que se ha designado la ORF; la letra **b** en la parte superior derecha del recuadro representa el link que abre una ventana en la que se muestra el alineamiento de secuencias; y la letra **i**, debajo de la letra **b**, en los loci de *S. cerevisiae* representa el link que abre una ventana en la que se muestra toda la información asociada al gen. **A)** Genes presentes en *A. gossypii*. **B)** Genes ausentes en *A. gossypii*.

En resumen, los análisis de homología sugieren, en principio, que *A. gossypii*, a diferencia de *S. cerevisiae* y cinco especies más de hemiascomicetos, carece de cuatro actividades enzimáticas: la actividad adenina desaminasa, codificada por el gen *AAH1* de *S. cerevisiae*; la actividad guanina desaminasa, codificada por el gen *GUD1*; y las actividades hipoxantina y guanina fosforribosiltransferasa, codificadas por el gen *HPT1*. Sin embargo, *A. gossypii* comparte con los otros once hemiascomicetos la carencia de las actividades enzimáticas necesarias para la formación de xantina a partir de hipoxantina y de IMP a partir de GMP, al no poseer secuencias aminoacídicas homólogas a las enzimas xantina oxidasa y GMP reductasa respectivamente que poseen otros organismos.

I.1.2. Estudios de complementación heteróloga

Trabajos realizados con anterioridad en el laboratorio habían revelado que es posible rescatar el fenotipo silvestre de mutantes auxotróficos, *ura3* o *rib5*, de *S. cerevisiae* cuando este organismo se transforma con vectores episómicos que portan el fragmento genómico de *A. gossypii* en el que está contenido el gen homólogo al gen responsable de la auxotrofia (Pompeius *et al.*, 1998; Revuelta *et al.*, 1994).

Basándonos en esa experiencia consideramos que experimentos de complementación heteróloga, empleando una genoteca genómica de *A. gossypii* y mutantes de *S. cerevisiae* afectados en cada una de las rutas de recuperación de nucleobases de purina, nos permitirían confirmar la funcionalidad de los genes identificados por homología de secuencia así como descubrir nuevos genes, en caso de que existiesen, no encontrados mediante genómica comparada. Con este propósito procedimos a la construcción de una genoteca genómica de *A. gossypii* y a la obtención de las cepas de *S. cerevisiae* defectivas en cada una de las rutas.

I.1.2.1. Rutas de recuperación de adenina

Para generar mutantes en las rutas de recuperación que presentasen un fenotipo fácilmente identificable y pudiesen emplearse en los experimentos de complementación fue necesario bloquear la ruta *de novo*. Dada la disponibilidad en el laboratorio de la cepa Y14244 (*Mat α; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YDR408c::kanMX4*) procedente de la colección de deletantes de EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>) que tiene bloqueada la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purina por la delección del gen *ADE8* (*YDR408c::kanMX4*), decidimos utilizarla como cepa de partida para generar los mutantes defectivos mediante la inactivación de las diferentes rutas. Esta cepa a partir de adenina solo puede sintetizar AMP y GMP por dos rutas posibles (Figura 14). Una ruta implica la fosforribosilación de adenina y desaminación de AMP, mediada por los productos de los genes *APT1* y *AMD1*, respectivamente (Alfonzo *et al.*, 1995; Merkler, *et al.*, 1989). La otra ruta va vía desaminación de adenina, actividad codificada por el gen *AAH1* (Deeley, 1992), y fosforribosilación de hipoxantina generando IMP, actividad codificada por el gen *HPT1* (Guetsova *et al.*, 1999).

Por tanto, de acuerdo a la red de rutas de recuperación que posee la levadura, para obtener mutantes en la ruta de recuperación de la nucleobase adenina se procedió en la cepa Y14244 a la inactivación de los *APT1*, *AAH1*, *AMD1* y *HPT1*, siguiendo la estrategia empleada en el proyecto de delección del genoma de la levadura (Saccharomyces genome deletion project http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/PCR_strategy). La estrategia está basada en el método de delección en un paso mediado por PCR (One-step PCR-mediated for deletion, Grant *et al.* 1990). Mediante PCR, empleando parejas de oligonucleótidos (up/down) de 65 nucleótidos de longitud, cuya secuencia en sus 45 primeros nucleótidos es idéntica a los 45 nucleótidos que preceden y siguen a la ORF de cada gen (up, cadena con sentido y down, cadena que se transcribe) y sus últimos 20 residuos idénticos a la secuencia de un marcador de selección, obtuvimos un módulo de inactivación para cada gen. Posteriormente, la transformación de la levadura con el módulo de inactivación e integración en el locus de interés, en un proceso de recombinación homóloga, nos permitió generar los alelos mutantes para cada uno de los genes, en los que la ORF de cada gen queda delecionada en su totalidad y reemplazada por el marcador de selección.

En la Tabla 4 se recoge los módulos de inactivación construidos, las cepas mutantes generadas con cada módulo.

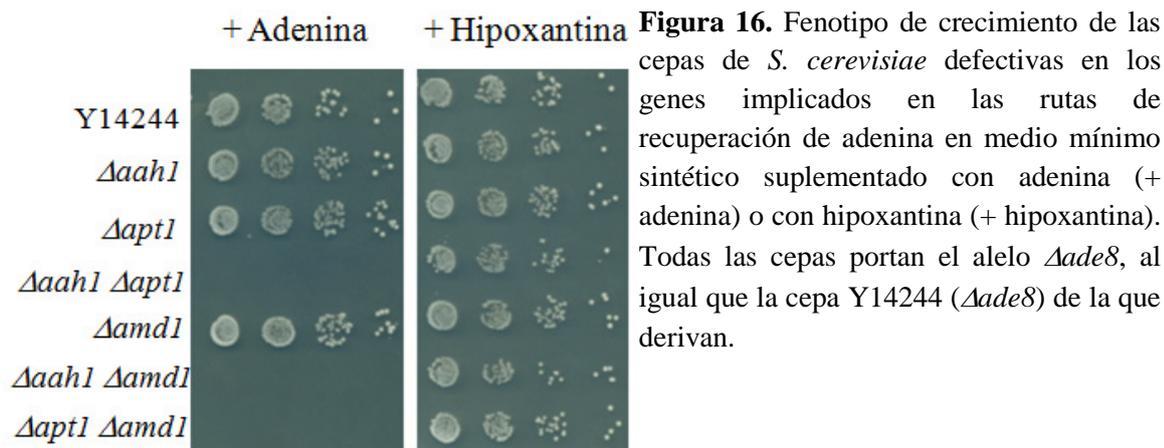
Tabla 4. Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> defectivas en los genes de las rutas de recuperación de adenina				
Gen/es Inactivado/s	Módulo de inactivación empleado en la transformación	Cepas Fondo Y14244	Fenotipo de crecimiento	
			Adenina	hipoxantina
<i>AAH1</i>	<i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-824 ($\Delta aah1$)	+	+
<i>APT1</i>	<i>UP45-HIS3-DOWN45</i>	Y-825 ($\Delta apt1$)	+	+
<i>AAH1</i> , <i>APT1</i>	<i>UP45-URA3-DOWN45</i> <i>UP45-HIS3-DOWN45</i>	Y-826 ($\Delta aah1$, $\Delta apt1$)	-	+
<i>AMD1</i>	<i>UP45-HIS3-DOWN45</i>	Y-831 ($\Delta amd1$)	+	+
<i>AAH1</i> , <i>AMD1</i>	<i>UP45-URA3-DOWN45</i> <i>UP45-HIS3-DOWN45</i>	Y-832 ($\Delta aah1$, $\Delta amd1$)	-	+
<i>APT1</i> , <i>AMD1</i>	<i>UP45-URA3-DOWN45</i> <i>UP45-HIS3-DOWN45</i>	Y-853 ($\Delta apt1$, $\Delta amd1$)	-	+
<i>HPT1</i>	<i>UP45-URA3-DOWN45</i>	inviabile	----	----

*La secuencia de los oligonucleótidos empleados en la obtención de cada módulo se detalla en el apartado IV de Materiales y Métodos. Los marcadores *URA3* e *HIS3* se obtuvieron de los plásmidos pESC-URA y pFA6a-His3MX6-pGAL1-GFP respectivamente.

Con todos los módulos de inactivación construidos fue posible obtener cepas mutantes para cada uno de los genes, a excepción del módulo que porta la delección del

gen *HPT1* (*UP45-URA-DOWN45*) acorde a los resultados de otros autores (Woods, *et al.*, 1983; Guetsova, *et al.*, 1997), quienes ya habían evidenciado la esencialidad del gen *HPT1* cuando la síntesis *de novo* de IMP está bloqueada.

De acuerdo a los resultados esperados las deleciones simples ($\Delta apt1$; $\Delta aah1$ y $\Delta amd1$) permiten el crecimiento tanto en presencia de adenina como de hipoxantina (Figura 16). Sin embargo, las cepas que portan las deleciones dobles ($\Delta aah1$, $\Delta apt1$; $\Delta aah1$, $\Delta amd1$ y $\Delta apt1$, $\Delta amd1$) son incapaces de utilizar adenina para la síntesis de nucleótidos de purina y requieren del aporte de hipoxantina para su crecimiento.



Así, los dobles deletantes fueron empleados para los ensayos de complementación con la genoteca genómica de *A. gossypii* (construida según se indica en Materiales y Métodos) en la búsqueda de los genes responsables de la recuperación de adenina. La transformación de cada una de estas tres cepas se realizó con 25 μ g de ADN de la genoteca genómica y la selección de transformantes se efectuó en medio sintético sin hipoxantina y con adenina.

El análisis de los plásmidos recuperados en los diferentes clones obtenidos reveló que para la complementación de la cepa $\Delta aah1$, $\Delta apt1$ solamente era necesaria la presencia del gen *AER325W*, el homólogo al gen *APT1* de *S. cerevisiae*. Que en los experimentos de complementación no se hubiesen aislado clones portadores de fragmentos genómicos pertenecientes a regiones cromosómicas diferentes a la región cromosómica a la que pertenecen los fragmentos genómicos capaces de soportar el crecimiento de la cepa $\Delta aah1$, $\Delta apt1$ en adenina, sugiere que *A. gossypii* no posee la capacidad de formar hipoxantina a partir de adenina, careciendo por tanto de una de las dos rutas presentes en *S. cerevisiae*. Este resultado era concordante con la ausencia de homología en el genoma de *A. gossypii* para el gen *AAH1* de *S. cerevisiae*.

La ausencia de complementación de la mutación $\Delta aah1$ también la encontramos en la cepa $\Delta aah1$, $\Delta amd1$. Los fragmentos cromosómicos de los plásmidos aislados de los diferentes clones obtenidos contenían el gen *ABR204C*, anotado en la base de datos como homólogo sinténico del gen *AMD1* de *S. cerevisiae*, el cual codifica la enzima AMP desaminasa.

Por último, el análisis de los plásmidos recuperados de los 15 clones obtenidos por transformación de la cepa $\Delta apt1$, $\Delta amd1$ confirmó que la mutación $\Delta apt1$ y $\Delta amd1$ de *S. cerevisiae* son complementadas respectivamente por los genes *APT1* y *ABR204C* de *A. gossypii*.

I.1.2.2. Rutas de recuperación de xantina y guanina

Las rutas de recuperación de las nucleobases guanina y xantina en *S. cerevisiae* están implicados tres genes: el gen *HPT1* que codifica la actividad hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, responsable de la formación de GMP a partir de guanina y de IMP a partir de hipoxantina (Ali y Sloan, 1982); el gen *GUD1*, que codifica la actividad guanina desaminasa, responsable de la formación de xantina a partir de guanina (Saint-Marc y Daignan-Fornier, 2004); y el gen *XMP1* que codifica la actividad xantina fosforribosiltransferasa, responsable de la formación del nucleótido XMP, intermediario en la ruta de síntesis *de novo* de GMP (Guetsova, *et al.*, 1999). Dada la conexión que existe entre estas rutas y la ruta *de novo* (Ver Figura 14), no fue posible seguir la estrategia empleada para la construcción de cepas defectivas en las rutas de recuperación de adenina. Así, si se bloquea la ruta de síntesis *de novo* por la mutación $\Delta ade8$ no se forma IMP, siendo necesaria la presencia de adenina o de hipoxantina para la síntesis tanto del nucleótido AMP como GMP. Si adenina o hipoxantina están presentes en el medio de cultivo la célula, a través de las rutas de recuperación de adenina, sintetizaría IMP y a partir de éste nucleótido, vía síntesis *de novo*, se formaría XMP y GMP, no dando fenotipo mutante alguno en las cepas en las que estuviese inactivado cualquiera de los genes responsables de las rutas de recuperación de xantina y guanina. Ante esta situación, la única opción para inactivar las rutas de recuperación y obtener mutantes viables que pudiesen ser empleados en los experimentos de complementación fue bloquear la actividad enzimática IMP deshidrogenasa (IMPDH), responsable de la conversión de IMP a XMP. Así, la ausencia de actividad IMPDH condicionaría el crecimiento de la célula a la presencia de guanina o de xantina.

S. cerevisiae tiene una familia de cuatro genes que potencialmente codifican IMPDH, genes *IMD1*, *IMD2*, *IMD3*, e *IMD4* (Escobar-Henriques y Daignan-Fornier, 2001). Sólo cuando se delecionan tres de los cuatro genes se consigue la eliminación total de la actividad IMPDH, ya que el gen *IMD1* es un pseudogen (Hyle *et al.*, 2003). Adicionalmente, la actividad IMPDH de la levadura se puede inhibir con ácido micofenólico (MPA), originalmente identificado como droga inmunosupresora en humanos (Allison y Eugui, 1993). La inhibición de la actividad IMPDH se produce por la unión no covalente del MPA al complejo enzima-sustrato (IMPDH-IMP) (Allison y Eugui, 2000). Aunque la actividad IMPDH de las tres proteínas funcionales de *S. cerevisiae* (Imd2p, Imd3p e Imd4p) se ve inhibida *in vitro* por MPA en su totalidad (McPhillips *et al.*, 2004), *in vivo* se requiere, además, inactivar el gen *IMD2* ($\Delta imd2$) para abolir toda la actividad enzimática celular, exhibiendo solamente las cepas deletantes $\Delta imd2$ sensibilidad a la presencia de MPA (Hyle, *et al.*, 2003). Puesto que bloquear la

actividad IMPDH en *S. cerevisiae* por inactivación génica requiere delecionar los genes *IMD2*, *IMD3*, e *IMD4*, optamos por recurrir a la acción del MPA para inhibir la actividad IMPDH celular, por lo que se hizo necesario proceder, en primer lugar, a delecionar el gen *IMD2* en la cepa silvestre de levadura BY4742.

Una vez bloqueado el flujo de nucleótidos a través de la ruta *de novo* y de recuperación de adenina procedimos a bloquear las rutas de recuperación de xantina y guanina. Para esto, y siguiendo la estrategia de delección de la ORF completa, obtuvimos diferentes módulos de delección con los que construimos un total de seis cepas (Tabla 5). Estas cepas portan la mutación $\Delta imd2$ y las mutaciones de los genes *HPT1*, *GUD1* y *XPT1*. Tres de las cepas portan las delecciones sencillas $\Delta hpt1$; $\Delta gud1$ y $\Delta xpt1$; dos cepas llevan combinaciones de dos mutaciones $\Delta xpt1$, $\Delta hpt1$ y $\Delta xpt1$, $\Delta gud1$; y otra cepa porta tres mutaciones $\Delta hpt1$, $\Delta xpt1$, $\Delta gud1$. La capacidad de todas estas cepas de utilizar las rutas de recuperación para sintetizar GMP, se manifiesta por su fenotipo de crecimiento o no crecimiento en presencia de las bases xantina y guanina cuando la ruta *de novo* se bloquea por la adición al medio de MPA.

Los fenotipos de crecimiento de las cepas obtenidas se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> defectivas en los genes de las rutas de recuperación de guanina				
Gen/es Inactivado/s	Módulo de inactivación empleado en la transformación*	Cepas	Fenotipo de crecimiento en MPA	
			+ guanina	+ xantina
<i>IMD2</i>	<i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-1181 ($\Delta imd2$)	+	+
<i>XPT1</i> <i>IMD2</i>	<i>UP45-KanMX4-DOWN45</i> <i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-1182 ($\Delta imd2$, $\Delta xpt1$)	+	-
<i>HPT1</i> <i>IMD2</i>	<i>UP45-HIS3-DOWN45</i> <i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-1183 ($\Delta imd2$, $\Delta hpt1$)	-	+
<i>XPT1</i> <i>HPT1</i> <i>IMD2</i>	<i>UP45-KanMX4-DOWN45</i> <i>UP45-HIS3-DOWN45</i> <i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-1184 ($\Delta imd2$, $\Delta xpt1$, $\Delta hpt1$)	-	-
<i>GUD1</i> <i>IMD2</i>	<i>UP45-LEU2-DOWN45</i> <i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-1188 ($\Delta imd2$, $\Delta gud1$)	+	+
<i>GUD1</i> <i>XPT1</i> <i>IMD2</i>	<i>UP45-LEU2-DOWN45</i> <i>UP45-KanMX4-DOWN45</i> <i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-1189 ($\Delta imd2$, $\Delta gud1$, $\Delta xpt1$)	+	-
<i>GUD1</i> <i>XPT1</i> <i>HPT1</i> <i>IMD2</i>	<i>UP45-LEU2-DOWN45</i> <i>UP45-KanMX4-DOWN45</i> <i>UP45-HIS3-DOWN45</i> <i>UP45-URA3-DOWN45</i>	Y-1190 ($\Delta imd2$, $\Delta gud1$, $\Delta xpt1$, $\Delta hpt1$)	-	-

*La secuencia de los oligonucleótidos para la obtención de cada módulo se detalla en el apartado IV de Materiales y Métodos. Los marcadores *LEU2*, *URA3* e *HIS3* se obtuvieron de los plásmidos pJR1742, pESC-URA y pFA6a-His3MX6-pGAL1-GFP respectivamente.

Solo la inactivación conjunta de los genes *XPT1* y *HPT1* elimina la capacidad de la célula de sintetizar GMP a través de las rutas de recuperación ya que las cepas que portan la inactivación de ambos genes, cepa $\Delta xpt1$, $\Delta hpt1$ y cepa $\Delta gud1$, $\Delta xpt1$, $\Delta hpt1$ no crecen ni con xantina ni con guanina (Figura 17). Las cepas que tienen inactivado sólo uno de los genes, cepas $\Delta xpt1$ y $\Delta hpt1$, o las cepas que tienen inactivados cualquiera de éstos en combinación con la mutación $\Delta gud1$ pueden sintetizar GMP bien desde guanina, cepas $\Delta xpt1$ y $\Delta gud1$, $\Delta xpt1$ o desde xantina, cepas $\Delta hpt1$ y $\Delta gud1$, $\Delta hpt1$. Como era de esperar, la inactivación sólo del gen *GUD1* no modifica la capacidad de la célula de sintetizar GMP, la cepa $\Delta gud1$ crece en presencia de xantina con igual eficiencia que lo hace en presencia de guanina (Figura 17).

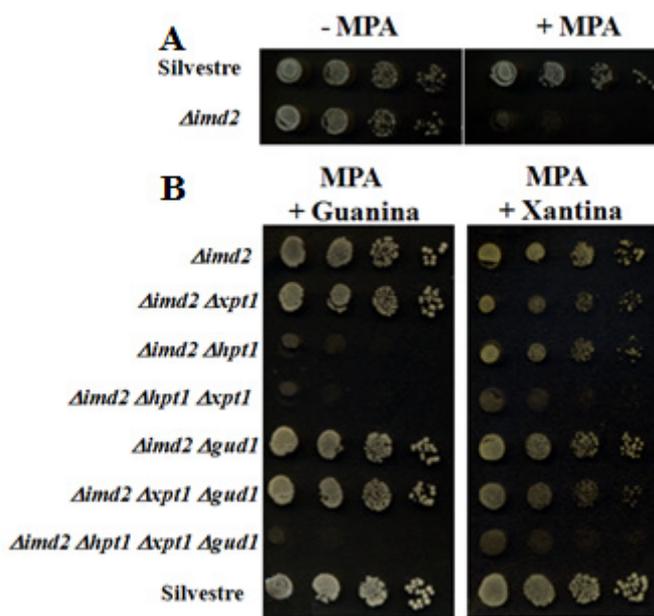


Figura 17. Fenotipo de crecimiento de cepas defectivas en las rutas de recuperación de las nucleobases xantina y guanina en *S. cerevisiae*. **A)** Efecto del MPA en la inhibición de la actividad IMPH celular en la cepa silvestre WT (*IMD1*, *IMD2*, *IMD3* e *IMD4*) y en la cepa mutante $\Delta imd2$ (*IMD1*, *IMD2::URA3*, *IMD3*, *IMD4*), ensayo mediante un test de crecimiento en el que se empleó medio sintético suplementado (+) o no (-) con MPA. **B)** Fenotipo de crecimiento de las cepas defectivas en los genes implicados en las rutas de recuperación en medio sintético más MPA suplementado con guanina (+ guanina) o suplementado con xantina (+ xantina).

Cinco de estas cepas de levadura fueron empleadas para identificar las rutas de recuperación presentes en *A. gossypii* mediante la complementación heteróloga con la genoteca del hongo.

Los fragmentos genómicos obtenidos de los clones de la cepa $\Delta xpt1$ (que no puede utilizar xantina para la síntesis de GMP) transformados con la genoteca contenían el gen completo *ABL070C*, homólogo sinténico del gen *XPT1* de *S. cerevisiae*.

También, al analizar los fragmentos genómicos que complementaban la mutación $\Delta hpt1$, obtuvimos el mismo resultado que el obtenido en los experimentos de complementación en la cepa $\Delta xpt1$. Los fragmentos genómicos capaces de complementar la mutación $\Delta hpt1$ presentaban los mismos patrones de restricción que los fragmentos genómicos que complementaban la mutación $\Delta xpt1$. Este resultado sugería, en principio, que la expresión del gen *ABL070C* de *A. gossypii* en *S. cerevisiae* era responsable de la fosforribosilación tanto de xantina como de guanina. Sin embargo, no podíamos descartar que la complementación de la mutación $\Delta hpt1$ fuese debida a una sobreexpresión del gen *ABL070C*, ya que en *S. cerevisiae* se ha descrito que la sobreexpresión del gen *XPT1* rescata el fenotipo mutante $\Delta hpt1$ (Guestova *et. al.*, 1999). Esta posibilidad fue descartada

cuando realizamos la transformación de la cepa $\Delta xpt1$, $\Delta hpt1$ con la genoteca genómica del hongo. Ya que el único gen que aislamos fue el gen *ABL070C* de *A. gossypii*. Siendo, por tanto, este gen el responsable de la complementación de las mutaciones $\Delta hpt1$ y $\Delta xpt1$ de *S. cerevisiae*.

Finalmente, los experimentos de complementación de la mutación $\Delta gud1$, realizados con la finalidad de identificar algún gen de *A. gossypii* con la misma función que realiza el gen *GUDI* de *S. cerevisiae*, resultaron infructuosos. La transformación de la cepa $\Delta gud1$, $\Delta hpt1$, $\Delta xpt1$ con la genoteca genómica de *A. gossypii* y selección de los transformantes en un medio con MPA y guanina siempre generaba clones transformantes que invariablemente portaban fragmentos genómicos pertenecientes al locus *ABL070C*.

En resumen, los resultados obtenidos en los experimentos de complementación heteróloga y que se recogen en la Tabla 6, revelaron que *A. gossypii* carece de los genes homólogos a los genes *GUDI* y *AAH1* de *S. cerevisiae*. Y a diferencia de la levadura solo un gen es responsable de la fosforribosilación de las nucleobases hipoxantina, guanina y xantina, gen *ABL070C* homólogo sinténico del gen *XPT1* de *S. cerevisiae*.

Tabla 6. Genes de <i>A. gossypii</i> implicados en la recuperación de nucleobases de purina identificados por complementación heteróloga	
Cepas de <i>S. cerevisiae</i> defectivas en las rutas de recuperación	Genes de <i>A. gossypii</i> que rescatan el fenotipo silvestre
<i>\Delta apt1</i>	<i>AER325W (AgAPT1)</i>
<i>\Delta amd1</i>	<i>ABR204C (AgAMD1)</i>
<i>\Delta xpt1</i>	<i>ABL070C (AgXPT1)</i>
<i>\Delta hpt1</i>	<i>ABL070C (AgXPT1)</i>
<i>\Delta aah1</i>	No encontrado
<i>\Delta gud1</i>	No encontrado

I.2. ANÁLISIS FUNCIONAL

A fin de conocer la dinámica de las rutas de recuperación de las nucleobases de purina en *A. gossypii* y poder establecer en qué medida estas rutas contribuyen a la síntesis de riboflavina en el hongo, procedimos a determinar la funcionalidad de cada uno de los genes identificados en los experimentos de complementación, comenzando con la inactivación génica.

I.2.1. Inactivación de los genes *AgAPT1*, *AgXPT1* y *AgAMD1*

Al igual que en la levadura, la inactivación génica en *A. gossypii* se realizó a partir de un módulo de delección, con el que se reemplaza el alelo silvestre mediante un proceso de transformación por recombinación homóloga por el alelo delecionado. Aunque este proceso de recombinación es similar en ambos organismos (Steiner *et al.*, 1995), el proceso de transformación difiere en la permeabilización a la entrada del ADN y en la obtención final de transformantes.

A diferencia del carácter unicelular que presenta *S. cerevisiae* a lo largo de su ciclo de vida, en *A. gossypii* el único estadio que puede considerarse tal es la fase de espora, un solo núcleo por citoplasma, ya que el resto de estadios por los que pasa a lo largo de su ciclo biológico lo hace en forma de micelio cenocítico. Esto implica que en cualquier modificación génica que se quiera realizar en el hongo, mediante transformación, lleve asociado el someter a los transformantes primarios a un proceso de esporulación para, después, seleccionar las esporas que contengan los núcleos verdaderamente transformados, ya que los clones obtenidos tras el proceso de transformación son heterocariontes, poseen núcleos transformados y núcleos sin transformar. Sólo las esporas seleccionadas al germinar generarán cepas homocariontes, en las que todos los núcleos de las hifas son iguales, ya que se han formado a partir de un único núcleo por divisiones sucesivas.

Otra diferencia importante en el proceso de transformación entre *S. cerevisiae* y *A. gossypii* es la capacidad de recombinación homóloga. Mientras en la levadura es suficiente la presencia de secuencias de 45 pb flanqueando al marcador de selección para la integración en el locus deseado del módulo de inactivación, en el hongo aunque se ha demostrado esa posibilidad (Wendland *et al.*, 2000), no siempre es suficiente, requiriendo en la mayoría de casos secuencias de más de 100 pb para que se dé la recombinación homóloga. Así, partiendo de las particularidades de *A. gossypii* procedimos a la inactivación de los dos genes.

Para la construcción de estos módulos (Figura 18), el primer paso fue la amplificación de la ORF completa del gen a deleccionar, junto con aproximadamente unas 400 pb anteriores al extremo 5' y la misma cantidad posteriores al extremo 3'. En todos los casos se empleó como molde ADN genómico de *A. gossypii*. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Figura 18 para cada construcción. El fragmento obtenido de la PCR se clonó en el plásmido pGEM-T. Después de verificar mediante secuenciación la correcta secuencia del gen, se diseñó y construyó un módulo de delección en el que el marcador *G418^R* quedaba flanqueado por secuencias del gen a deleccionar. La construcción del módulo consistió en una digestión enzimática que permite liberar una región interna de la ORF, empleando en cada caso una o dos enzimas (dependiendo de los sitios de corte). Cuando los sitios de corte no eran compatibles con los del marcador *G418^R* se procedió a un tratamiento con el fragmento “klenow” de la ADN polimerasa I de *E. coli* con la que se obtienen extremos romos, en los cuales se ligó el fragmento 2112 pb (también de extremos romos, cuando fue menester) en el que está contenido el marcador *G418^R*, previamente liberado del plásmido JR1566 con la enzima *SalI* (corte *SalI-SalI*). Una vez construido el módulo de delección procedimos a su liberación del plásmido que lo contiene mediante la digestión con las enzimas *SpeI* y *SacII* en la mayoría de los casos; y posteriormente a la transformación de esporas germinadas de *A. gossypii*. El análisis de los clones transformantes, aislados por siembra de la mezcla de transformación en placas de medio rico suplementado con el aminoglucósido G418, se realizó mediante PCR analíticas de micelio empleando oligonucleótidos internos y externos al módulo de

delección tanto en el extremo 5' como en el 3'. Este procedimiento nos permitió discernir qué clones tienen el alelo silvestre reemplazado por el módulo de delección. Tras la obtención de esporas de uno de estos transformantes primarios y su posterior análisis, aislamos un clon homocariote portador de la mutación, que ha pasado a formar parte de la colección de cepas del laboratorio, asignando un nombre según el orden de construcción.

Mediante este procedimiento realizamos la inactivación de los genes candidatos de *A. gossypii* responsables del reciclaje de las nucleobases de purina, genes *AgXPTI*; *AgAPT1* y *AgAMD1* en la cepa silvestre (A4). Denominándose en la colección de cepas de *A. gossypii* del laboratorio como A166, A167 y A168 respectivamente.

Habiendo construido estas cepas procedimos con posterioridad a la construcción de una nueva cepa defectiva en los genes *AgXPTI* y *AgAPT1*. Para ello se procedió a la transformación de la cepa defectiva en el gen *AgXPTI* con un módulo de delección para la interrupción génica del gen *AgAPT1*, construido con el mismo procedimiento descrito para las cepas simples, pero en este caso el marcador fue *HYG^R*. Esta cepa se guardó en la colección bajo el nombre de A254.

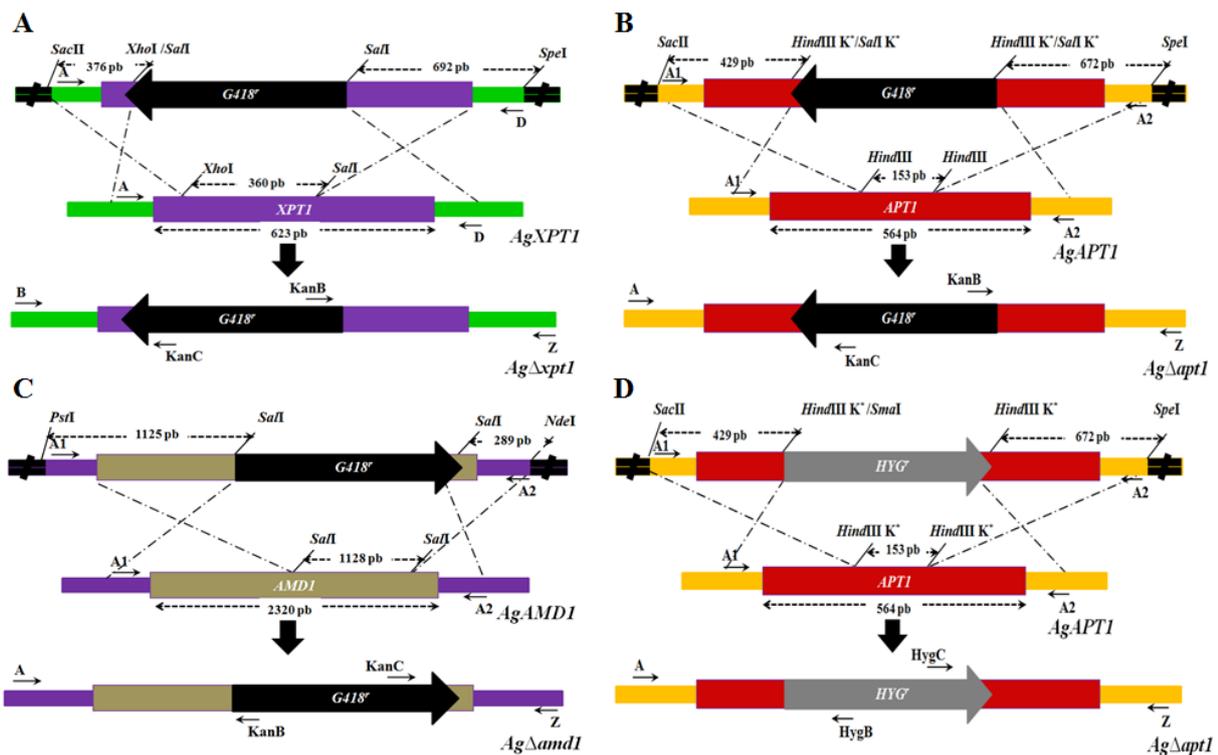


Figura 18. Módulos de delección empleados para la inactivación de los genes responsables de las rutas de recuperación en *A. gossypii*. **A)** Módulo empleado para la inactivación del gen *AgXPTI*. **B)** *AgAPT1*. **C)** *AgAMD1*. **D)** *AgAPT1* con marcador de resistencia a *HYG^R*. En cada uno de ellos se indican las enzimas empleadas para la construcción de cada módulo, indicando el símbolo K* tratado con el fragmento klenow la ADN polimerasa. Los oligonucleótidos se indican con una flecha y una letra que hace referencia al nombre que se le dio a cada uno y cuya secuencia se recoge en Materiales y Métodos. En segmentos de líneas discontinuas acotadas por puntas de flechas se hace referencia de las longitudes: de las ORFs, del corte interno para la interrupción del gen y de los fragmentos que flanquean la disrupción para permitir la recombinación. ≠ indica las secuencias del vector pGEM-T que flanquean al módulo de delección.

Una vez obtenidas las cepas portadoras de las mutaciones en las PRTs de purinas presentes en *A. gossypii* y la AMP desaminasa, procedimos, en primer lugar, a caracterizar el fenotipo de crecimiento asociado a cada mutación frente a los agentes genotóxicos 8-azaguanina, 8-azaadenina y 8-azaxantina, análogos de las nucleobases guanina, adenina y xantina, respectivamente. En *S. cerevisiae* se ha descrito que los mutantes defectivos en la actividad HGPRT codificada por el gen *HPT1*, son resistentes al análogo de guanina 8-azaguanina (Guetsova 1997); los mutantes carentes de la actividad APRT, codificada por el gen *APT1* presentan resistencia al análogo de adenina 8-azaadenina (Woods *et al.*, 1984); los mutantes que no poseen actividad XPRT, codificada por el gen *XPT1*, son resistentes al análogo de xantina 8-azaxantina (Guetsova *et al.*, 1997 y Woods *et al.*, 1984).

El test de crecimiento, realizado con las cepas mutantes (Figura 19), reveló que en medio rico todas las cepas crecen con igual eficiencia a como lo hace la cepa silvestre. Por el contrario, en presencia de los agentes genotóxicos el fenotipo de crecimiento varía con cada cepa. En presencia de 8-azaadenina, sólo crece el mutante *AgΔapt1* y en presencia de 8-azaguanina sólo es capaz de crecer el mutante *AgΔxpt1*. Sin embargo, en presencia de 8-azaxantina se observa crecimiento en todas las cepas, pero solo el mutante *AgΔxpt1* crece con igual eficiencia a como lo hace en ausencia de la droga, mientras que en el resto de las cepas en presencia de 8-azaxantina muestran una capacidad de crecimiento reducido, no alcanzando las colonias el tamaño que muestran las colonias en el medio sin droga. La doble delección de ambas PRTs tiene el fenotipo conjunto de ambas, presentando resistencia tanto a 8-azaadenina como a 8-azaguanina. La delección del gen *AgAMD1* se comporta como el silvestre.

El fenotipo de crecimiento de las cepas silvestre; *AgΔapt1*; *AgΔxpt1*; *AgΔapt1*, *AgΔxpt1* y *AgΔamd1* en los medios con 8-azaadenina y 8-azaguanina, demuestra la funcionalidad de los genes *AgAPT1* y *AgXPT1* en la cepa silvestre a la vez que permite asignar la actividad celular APRT al gen *AgAPT1* y la actividad GPRT al gen *AgXPT1* en concordancia con los resultados obtenidos en los experimentos de complementación. El fenotipo de crecimiento en presencia de 8-azaxantina no permite asignar una actividad XPRT al gen *AgXPT1*, ya que todas las cepas que llevan este gen funcional, son capaces de crecer en presencia de la droga, aunque este crecimiento difiere con respecto al crecimiento que las cepas presentan en medio rico. Sin embargo, el fenotipo de crecimiento de la cepa mutante *AgΔxpt1* en presencia de 8-azaxantina sí sugiere pérdida de la actividad XPRT, ya que las colonias alcanzan el mismo desarrollo tanto en presencia como en ausencia de 8-azaxantina.

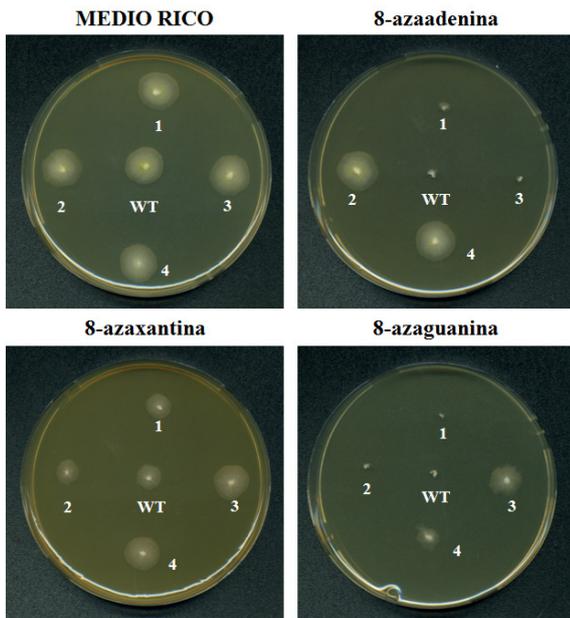


Figura 19. Análisis de la incorporación de nucleobases de purina. La capacidad de metabolizar las nucleobases se analizó en la cepa silvestres (WT) y en cepas defectivas en diferentes genes de las rutas de recuperación (1, *AgΔamd1*; 2, *AgΔapt1*; 3, *AgΔxpt1*; y 4, *AgΔapt1, AgΔxpt1*) mediante la adición al medio de cultivo de antimetabolitos análogos de las nucleobases: 8-azaadenina análogo de adenina, 8-azaxantina de xantina y 8-azaguanina de guanina.

I.2.2. Actividades enzimáticas

A fin de determinar, en algunos casos, y confirmar, en otros, las actividades enzimáticas asociadas a las rutas de recuperación de nucleobases de purina en *A. gossypii*, procedimos a realizar ensayos enzimáticos *in vitro*, empleando extractos proteicos de la cepa silvestre y de las cepas portadoras de las deleciones génicas, realizadas con anterioridad.

Un total de ocho actividades enzimáticas se ensayaron con cada uno de los extractos, empleando diferentes sustratos de reacción, nucleobases o nucleótidos, de acuerdo a la actividad a ensayar (ver apartado IX.2. de Materiales y Métodos). La detección de los productos de reacción, mediante resolución de las mezclas de reacción por cromatografía en capa fina (Figura 20), permitió conocer las actividades asociadas a cada uno de los extractos proteicos.

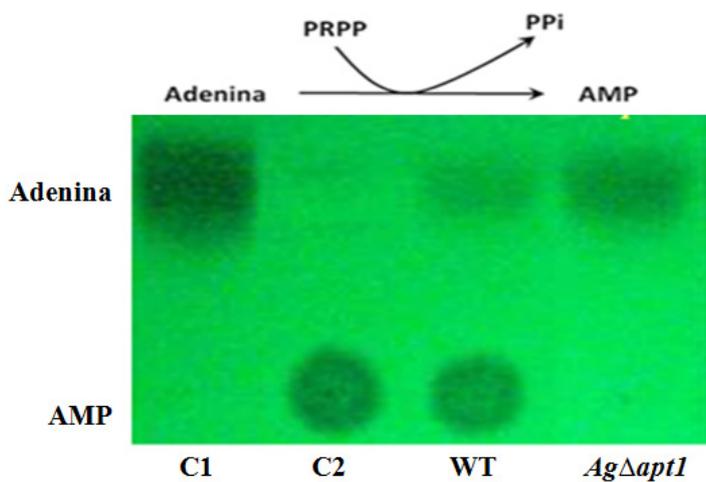


Figura 20. Análisis de la actividad APRT por cromatografía en capa fina. En la parte superior se esquematiza la reacción ensayada. La posición de la base y el ribonucleótido se indica en la parte izquierda. Las mezclas de reacción que presentan son: C1 y C2, muestras control sin extracto celular, 1, con el sustrato empleado y 2, con el producto esperado; WT y *AgΔapt1* reacciones con extractos celulares, WT de la cepa silvestre y *AgΔapt1* de la cepa de deleción.

Los resultados obtenidos, Tabla 7, revelan que de las ocho actividades enzimáticas ensayadas, *A. gossypii* sólo posee cinco de ellas, adenina-PRT (APRT), hipoxantina-PRT (HPRT), xantina-PRT (XPRT), guanina-PRT (GPRT) y AMP desaminasa, careciendo de las actividades desaminasa de adenina y guanina así como la actividad desaminasa del nucleótido GMP.

Tabla 7. Actividad enzimática asociada a los genes implicados en la ruta de recuperación de nucleobases de purina

Cepa	APRT	HPRT	GPRT	XPRT	Adenina desaminasa	Guanina desaminasa	AMP desaminasa	GMP desaminasa
<i>APT1 XPT1</i>	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>APT1, Δxpt1</i>	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Δapt1, XPT1</i>	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Δamd1</i>	+	+	+	+	-	-	-	-

I.2.3. Modulación de las actividades enzimáticas

Con el propósito de conocer en qué medida podía contribuir cada una de las nucleobases a la formación de los nucleótidos de purina en *A. gossypii*, procedimos a determinar la cinética de las actividades, APRT, HPRT, XPRT y GPRT, asociadas tanto a los extractos proteicos de la cepa silvestre como a los extractos de las tres cepas que tienen inactivada alguna (cepa *AgΔapt1* y cepa *AgΔxpt1*) o todas las rutas (cepa *AgΔapt1*, *AgΔxpt1*) de recuperación.

Siguiendo el mismo procedimiento que empleamos para los ensayos de actividad, pero en este caso usando como sustrato nucleobases marcadas con el isótopo ¹⁴C (ver Apartado IX.2.1), cuantificamos las diferentes actividades fosforribosiltransferasas asociadas a los extractos proteicos obtenidos de cultivos líquidos en los que el crecimiento activo había cesado y había comenzado la fase de producción de riboflavina. La resolución de las mezclas de reacción por cromatografía en capa fina de muestras tomadas a diferentes tiempos y posterior cuantificación de los nucleótidos formados nos permitió conocer las curvas de avance para cada una de las reacciones (Figura 21).

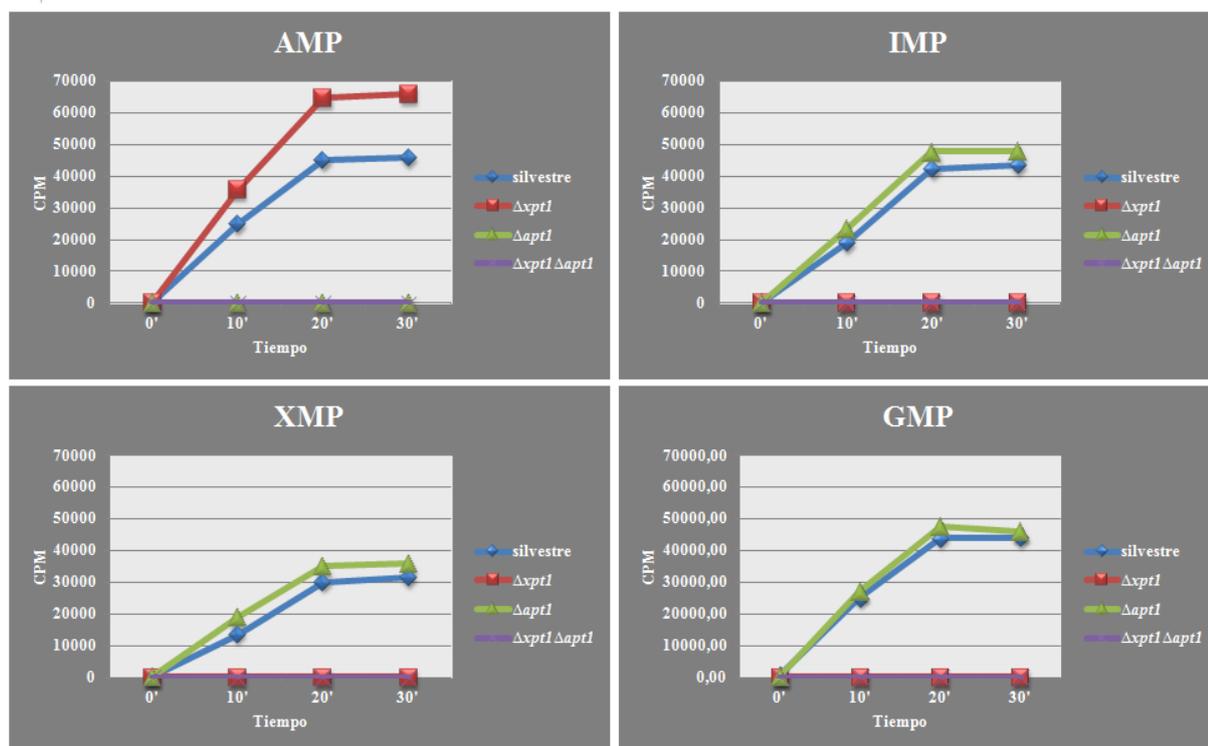


Figura 21. Cinética de formación de los ribonucleótidos de purina en la cepa silvestre y las cepas de delección. La formación de ribonucleótido en las reacciones ensayadas ($[^{14}\text{C}]$ Adenina + PRPP \rightarrow $[^{14}\text{C}]$ AMP + PPi; $[^{14}\text{C}]$ Hypoxhantine + PRPP \rightarrow $[^{14}\text{C}]$ IMP + PPi; $[^{14}\text{C}]$ Xhantine + PRPP \rightarrow $[^{14}\text{C}]$ XMP + PPi; $[^{14}\text{C}]$ Guanina + PRPP \rightarrow $[^{14}\text{C}]$ GMP + PPi), empleando 25 μg de extractos proteicos e idénticas concentraciones de sustrato (180 μM , actividad específica 50 mCi/mmol), se monitorizó durante 30 minutos. A intervalos de 10 minutos se tomaron muestras, se paró la reacción y la mezcla se cromatografió en Etanol: H_2O (70:30) hasta que el frente migró 5-8cm. La placa se secó y se expuso a una película radiográfica. Tras localizar los ribonucleótidos, la porción de la placa que los contenía se recortó y la radiactividad contenida se cuantificó en un contador de centelleo (Wallac LSC 1409).

En la cepa silvestre, las curvas revelan que las cuatro actividades fosforribosiltransferasa contribuyen a la formación de nucleótidos de purina en el mismo orden de magnitud (actividades específicas entre 1,2 y 2,3 mmoles de nucleótido/miligramo de proteína y por minuto, Tabla 8), si bien, la cantidad de nucleótido formado varía con las diferentes nucleobases. Los valores máximos se alcanzan con las nucleobases adenina, guanina y hipoxantina (aproximándose 180 μM), y los mínimos con xantina (133 μM).

Tabla 8. Actividad Específica (mmoles \times mgprote. $^{-1}$ \times m $^{-1}$) de las rutas de recuperación de nucleobases de purinas

	APRT	HPRT	XPRT	GPRT
Silvestre	2 \pm 0,09	1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	2,3 \pm 0,3
<i>AgΔapt1</i>	ND	1,5 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3	2,5 \pm 0,4
<i>AgΔxpt1</i>	2,9 \pm 0,3	ND	ND	ND
<i>AgΔxpt1 AgΔapt1</i>	ND	ND	ND	ND

ND no detectada.

Sin embargo, las curvas de avance obtenidas para las cepas de delección, *AgΔapt1* y *AgΔxpt1*, difieren de la cepa silvestre. La cinética revela un incremento en aquellas o aquellas actividades PRT que prevalecen en cada cepa (Figura 21). Así pues, en la cepa *AgΔxpt1*, que carece de las actividades HXGPRT, la actividad APRT está incrementada entre 1,5 (10') y 1,4 (20') veces con respecto a la cepa silvestre. Del mismo modo, en la cepa *AgΔapt1*, sin actividad APRT, las actividades HXGPRT son mayores que las que muestran la cepa silvestre, aunque, en este caso, la diferencia es menor, 1,09 para la actividad GPRT y 1,25 para las actividades HPRT y GPRT.

Los ensayos de cinética enzimática realizados con las nucleobases marcadas con el isótopo ^{14}C , también permitieron detectar actividad PRT inespecífica asociada a los productos de los genes *AgAPT1* y *AgXPT1*. En los ensayos hechos con las diferentes nucleobases y extractos celulares de las cepas de delección se observó la formación del ribonucleótido AMP en la cepa *AgΔapt1* y GMP, IMP y XMP en la cepa *AgΔapt1* (Figura 22). La no detección de ninguno de los ribonucleótidos en los ensayos realizados con los extractos celulares de la cepa portadora de la doble delección, cepa *AgΔapt1*, *AgΔxpt1*; indica que son los genes funcionales *AgXPT1*, en la cepa *AgΔapt1* y *AgAPT1* en la cepa *AgΔxpt1* son los responsables de la formación de los ribonucleótidos formados. Por tanto, de acuerdo a estos resultados podemos decir que *A. gossypii*, en ausencia de la enzima *AgApt1p*, puede utilizar la proteína *AgXpt1p* para formar el ribonucleótido AMP y viceversa, si bien, la cantidad de ribonucleótidos formado por estas actividades inespecíficas es de tres órdenes de magnitud inferior al que se obtiene con las actividades específicas propias de cada enzima (enzima *AgApt1p*: actividad APRT 2 U, actividad HPRT $1,1 \cdot 10^{-3}$ U; actividad XPRT $1 \cdot 10^{-3}$ U y actividad GPRT $2,2 \cdot 10^{-3}$ U; enzima *AgXpt1p*: actividad HPRT y XPRT 1,2 U, actividad GPRT 2,3 U y actividad APRT $1,9 \cdot 10^{-3}$ U).

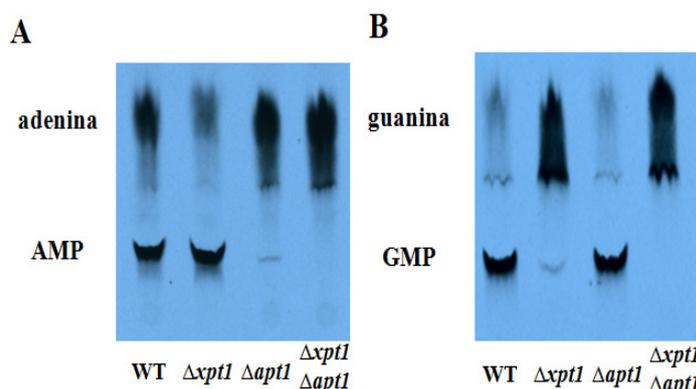


Figura 22. Detección en película radiográfica de las actividades PRT. En la parte inferior de las placas se indican las cepas a la que pertenecen los extractos celulares empleados en cada ensayo. En la parte izquierda se detalla la posición del sustrato y producto correspondientes a: **A)** ensayo de la actividad APRT y **B)** ensayo de la actividad GPRT.

1.2.4. Relación funcional de las rutas de recuperación y la ruta *de novo*

Está descrito en la literatura que la pérdida de actividad de la enzima HGPRT en humanos es la causa determinante del síndrome de Lesch-Nyhan (McKeran y Watts, 1976) y que en ausencia de esa actividad la síntesis de nucleótidos a través de la ruta *de novo* se ve favorecida (Torres y Puig, 2007). En concreto, la pérdida de actividad de la enzima HGPRT se ha asociado con un incremento de la actividad PRPP amidotransferasa,

una de las primeras actividades que se requiere en la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purina (ver Figura 7). En base a estas observaciones, procedimos a estudiar la posible correlación funcional de las rutas de recuperación y la ruta *de novo* en *A. gossypii*, incorporando a nuestros estudios la cepa *AgΔade4* defectiva en la actividad PRPP amidotransferasa y construida en trabajos realizados en el laboratorio con anterioridad (Jiménez 2001; Jiménez *et al.*, 2005).

Así, empleando extractos celulares de las cepas silvestre; *AgΔapt1*; *AgΔxpt1*; *AgΔxpt1*, *AgΔapt1*; y *AgΔade4* realizamos un ensayo *in vitro* de actividad PRPP amidotransferasa de acuerdo a la reacción: $[^{14}\text{C}]\text{Glutamina} + \text{PRPP} \rightarrow \text{PRA} + \text{PPi} + [^{14}\text{C}]\text{Glutamato}$. La resolución por cromatografía en capa fina de los productos de reacción, obtenidos con los extractos celulares de cada una de las cepas (Figura 23) y posterior cuantificación, permitió conocer las actividades específicas PRPP amidotransferasa asociadas a cada una de las muestras.

Tabla 9. Actividad Específica (mmoles x mgprote. ⁻¹ x m ⁻¹) PRPP amidotransferasa	
Cepa	Actividad específica
<i>AgΔade4</i>	ND
Silvestre	0,3±0.09
<i>AgΔapt1</i>	0,6±0.2
<i>AgΔxpt1</i>	0,9±0.1
<i>AgΔxpt1 AgΔapt1</i>	0,15±0.08

ND no detectada.

Los resultados obtenidos revelan que, en *A. gossypii*, al igual que en humanos, la inactivación de las rutas de recuperación de las nucleobases guanina e hipoxantina, cepa *AgΔxpt1*, conlleva un incremento en la actividad PRPP amidotransferasa que se triplica (0,9 U/mg) respecto a la actividad de la cepa silvestre (0,3 U/mg). También, la inactivación de la ruta de recuperación de la nucleobase de adenina, cepa *AgΔapt1*, determina una mayor actividad PRPP amidotransferasa 0,6 U/mg, doble que la actividad obtenida en la cepa silvestre. Sin embargo, la inactivación de todas las rutas de recuperación, cepa *AgΔxpt1*, *AgΔapt1*, afecta negativamente a la actividad PRPP amidotransferasa, obteniéndose la mitad de actividad (0,15 U/mg) que la que se obtiene en la cepa silvestre (0,3 U/mg).

Adicionalmente, la comparación de la actividad específica PRPP amidotransferasa de la ruta *de novo* con las actividades PRT de las rutas de recuperación (Tabla 8) en la cepa silvestre revelan que ambas vías, *de novo* y recuperación, contribuyen de forma desigual a la formación de ribonucleótidos en la célula. Mientras que la actividad PRT de las rutas de recuperación en la cepa silvestre está entre 2 y 2,4 U/mg de extracto celular la actividad PRPP amidotransferasa es de 0,3 U/mg, si bien esta actividad se incrementa en las cepas de delección *AgΔxpt1* y *AgΔapt1*.

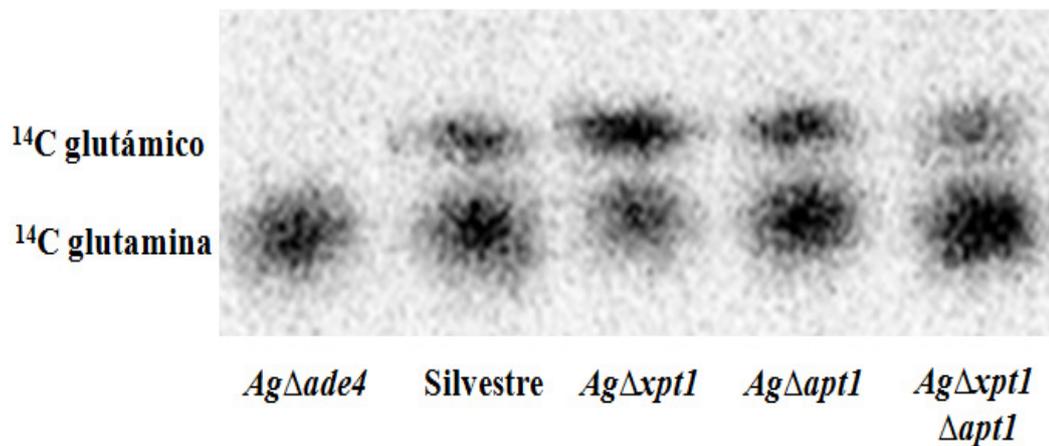


Figura 23. Efecto de la inactivación de las rutas de recuperación en la funcionalidad de la ruta *de novo*. La actividad PRPP amidotransferasa responsable de la formación del primer intermediario de la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purina se valoró en la cepa silvestre y en las cepas defectivas en las rutas de recuperación (cepas *AgΔxpt1*; *AgΔapt1*; y *AgΔxpt1, AgΔapt1*), empleando 200 µg de extractos celulares y glutamina marcada con el isótopo ^{14}C (100 µM, actividad específica 50 mCi/mmol). Como control negativo se emplearon los extractos celulares de la cepa *AgΔade4* defectiva en la actividad PRPP amidotransferasa. La identificación de los productos de cada una de las reacciones, indicada en la parte izquierda de la imagen, se realizó a partir de la radiografía que se obtuvo después de exponer la placa cromatográfica que contenía las mezclas de reacción resueltas (ver apartado IX).

I.2.5. Recuperación de la nucleobase no convencional AICA

AICA, 4-amino-5-imidazolecarboxamida, es una nucleobase de origen abiótico. Aunque originalmente se consideró un intermediario de la síntesis de purinas (Stetten y Fox, 1945; Shive *et al.*, 1947), en la actualidad se sabe que es el ribonucleótido AICAR, y no la nucleobase, el intermediario de la ruta de síntesis *de novo* (ver Figura 14). Sin embargo, se ha demostrado que la biosíntesis del AICAR a partir de AICA es posible por dos mecanismos diferentes de acuerdo a las siguientes reacciones:

1. $\text{AICA} + \text{ribosa 1-fosfato} \rightarrow \text{AICA ribonucleósido} \rightarrow \text{AICA ribonucleótido (AICAR)}$
2. $\text{AICA} + \text{PRPP} \rightarrow \text{AICA ribonucleótido (AICAR)}$

Ambos mecanismos, caracterizados originalmente por el grupo de Buchanan (Korn y Buchanan, 1952; Flaks *et al.*, 1957), requieren diferentes actividades enzimáticas. En la primera reacción se necesitan dos actividades, la actividad nucleósido fosforilasa para formar el ribonucleósido y la actividad quinasa para formar el ribonucleótido. En la segunda reacción sólo se requiere una actividad AICA-PRT, que en los organismos estudiados está actividad recae en la enzima adenina-PRT (Korn y Buchanan, 1952; Flaks *et al.*, 1957).

Así, a fin de determinar si *A. gossypii* puede biosintetizar nucleótidos de purina a partir de AICA hicimos un ensayo de crecimiento con cepas que tienen bloqueada la ruta *de novo* (cepas *AgΔade4* y *AgΔbas1*); la ruta de recuperación de adenina (cepa $\Delta apt1$); y ambas rutas, *de novo* y de recuperación de adenina, (cepa *AgΔade4, AgΔapt1*). Como se ha visto en el apartado anterior, en la cepa *AgΔade4* la ruta *de novo* está bloqueada en la primera etapa al ser defectiva en la actividad PRPP amidotransferasa. La cepa *AgΔbas1*, caracterizada en un trabajo realizado con anterioridad (Mateos *et al.*, 2006), no expresa los genes *ADE* de la ruta *de novo* por carecer del factor de transcripción, *AgBas1p*, necesario para la correcta expresión de dichos genes. La cepa *AgΔade4, AgΔapt1*; se obtuvo por transformación de la cepa *AgΔade4* con el módulo que porta la delección del gen *AgAPT1* y el marcador de selección que confiere resistencia a higromicina.

A diferencia de la cepa *AgΔade4*, la cepa *AgΔbas1* no puede crecer con ninguna de las nucleobases, apoyando que no sólo la transcripción de los genes *ADE* de la ruta *de novo* sino también la del gen *AgAMD1* de la ruta de recuperación de adenina está mediada por *AgBAS1*.

El efecto negativo que la nucleobase adenina ejerce sobre el crecimiento de la cepa silvestre de *A. gossypii*, y que no se observa en *S. cerevisiae*, puede explicarse por la bajada en los niveles de transcripción de los genes de la ruta *de novo*, pues se ha reportado tanto en *A. gossypii* como en *S. cerevisiae* que la nucleobase adenina actúa como regulador negativo en la transcripción de los genes de la ruta *de novo* (Daignan-Fornier, 1992; Denis *et al.*, 1998; Giani *et al.*, 1991; Manstala *et al.*, 1984). También la nucleobase AICA afecta negativamente al crecimiento de *A. gossypii*, aunque en menor medida, sugiriendo que AICA podría mimetizar, en parte, a la nucleobase adenina.

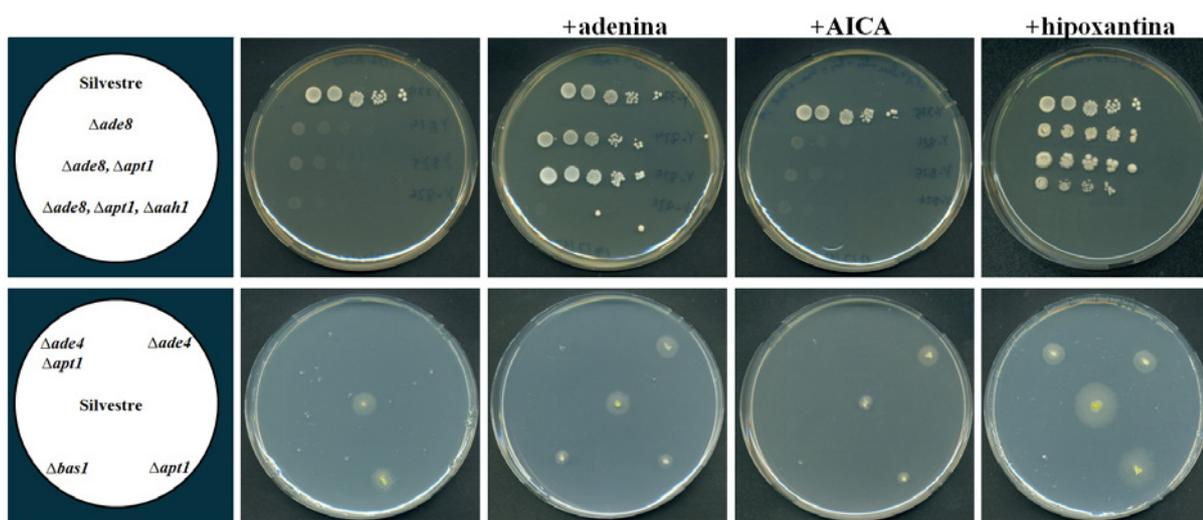


Figura 24. Ensayos de recuperación de la nucleobase AICA en mutantes defectivos en la síntesis de nucleótidos de purina. Fenotipo de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* (parte superior) y de *A. gossypii* (parte inferior) en ausencia o en presencia (+) de cada nucleobase. La concentración en el medio mínimo sintético de cada nucleobase fue siempre la misma (0.3 mM). De cada cepa de *S. cerevisiae* se sembraron 5 μ l de diluciones seriadas (DO: 1; 0,1;0,01;0,001) hechas a partir de un cultivo fresco saturado. La siembra de *A. gossypii* se hizo por transferencia de micelio fresco de colonias de las diferentes cepas crecidas en medio rico.

También, los ensayos de crecimiento revelan que la capacidad del *A. gossypii* de poder biosintetizar los nucleótidos de purina a partir de la nucleobase AICA es dependiente de la funcionalidad del gen *AgAPT1*, ya que sólo la cepa *AgΔade4*, y no el doble mutante *AgΔade4, AgΔapt1*, puede crecer con AICA. Este resultado, de acuerdo a los dos mecanismos propuestos para la formación del ribonucleótido (Korn y Buchanan, 1952; Flaks *et al.*, 1957), sugería que en *A. gossypii* la formación del ribonucleótido AICAR a partir de AICA sería por fosforribosilación directa de la nucleobase y no a través de la formación del ribonucleósido intermediario. Para confirmar esto, procedimos a realizar ensayos de actividad enzimática AICA-PRT, empleando extractos celulares de cada una de las cepas usadas en el experimento de crecimiento. Los resultados obtenidos del análisis cromatográfico de cada una de las mezclas de reacción (apartado IX), y que se recogen en la Tabla 10, permitieron identificar ribonucleótido AICAR en las reacciones que contenían los extractos celulares de la cepa silvestre, la cepa *AgΔade4* y la cepa *AgΔbas1* pero no en la cepa *AgΔapat1* ni en la cepa *AgΔade4, AgΔapt1*.

Tabla 10. Actividad enzimática AICA-PRT	
Cepa	Actividad
Silvestre	+
<i>AgΔade4</i>	+
<i>AgΔbas1</i>	+
<i>AgΔapt1</i>	-
<i>AgΔade4 AgΔapt1</i>	-

+ Actividad presente, - Actividad ausente.

I.2.6. Localización subcelular de las enzimas implicadas en las rutas de recuperación

Las proteínas ortólogas de *AgXpt1p* y *AgApt1p*, en los organismos estudiados, presentan una localización celular variable. En *S. cerevisiae* se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo (Huh *et al.*, 2003) y en *Toxoplasma gondii*, con dos isoformas de la enzima HXGPRT, una es predominantemente citosólica y la otra está asociada a membrana (Chaudhary *et al.*, 2005).

Con el fin de dilucidar la localización celular de las proteínas *AgXpt1p* y *AgApt1p* en *A. gossypii* y determinar si su localización varía con los estadios de desarrollo del hongo, se construyeron las cepas recombinantes *AgAPT1-GFP(S65T)* y *AgXPT1-GFP(S65T)* en las que la ORF de cada gen queda en fase con la ORF del gen de la proteína verde GFP(S65T) (Wach *et al.*, 1997). Para la construcción de estas cepas, se partió de un módulo de etiquetado en el que las secuencias ORF *GFP(S65T)*, el terminador *ScADHI* y el marcador *kanMX6* quedan flanqueados en su extremo 5' por las 45 pb que preceden al codón de parada del gen a etiquetar (*AgXPT1* o *Ag XPT1*) y en su extremo 3' por las 45 pb que siguen al codón de parada (Figura 25). Cada módulo, obtenido por PCR, empleando los oligonucleótidos R1 y F2 y el plásmido pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 como molde (Logtine *et al.*, 1998), se introdujo por electroporación junto con el plásmido que portaba el gen completo, pGEM-T-*AgXPT1* o pGEM-T-

AgAPT1, en células competentes de la cepa DY331 de *E. coli* (Yu *et al.*, 2000). La recombinación entre los extremos del módulo de etiquetado y el plásmido, mediado por el sistema de recombinación del profago λ , generó el plásmido en el que cada gen quedó etiquetado con la proteína GFP. La selección posterior de células resistentes a kanamicina y ampicilina permitió recuperar el plásmido de interés. Después de verificar por secuenciación la secuencia correcta, el fragmento de ADN que contenía la versión recombinada de cada gen se liberó del vector y se usó para transformar esporas germinadas de la cepa silvestre. Las cepas recombinantes homocariontes A-223 (*AgAPT1-GFP(S65T)*) y A-226 (*AgXPT1-GFP(S65T)*) se obtuvieron a partir de transformantes primarios en los que se produjo el correcto reemplazamiento del locus silvestre por la versión etiquetada. La expresión de las proteínas recombinantes permitió inferir la localización subcelular de las proteínas AgApt1p y AgXpt1p.

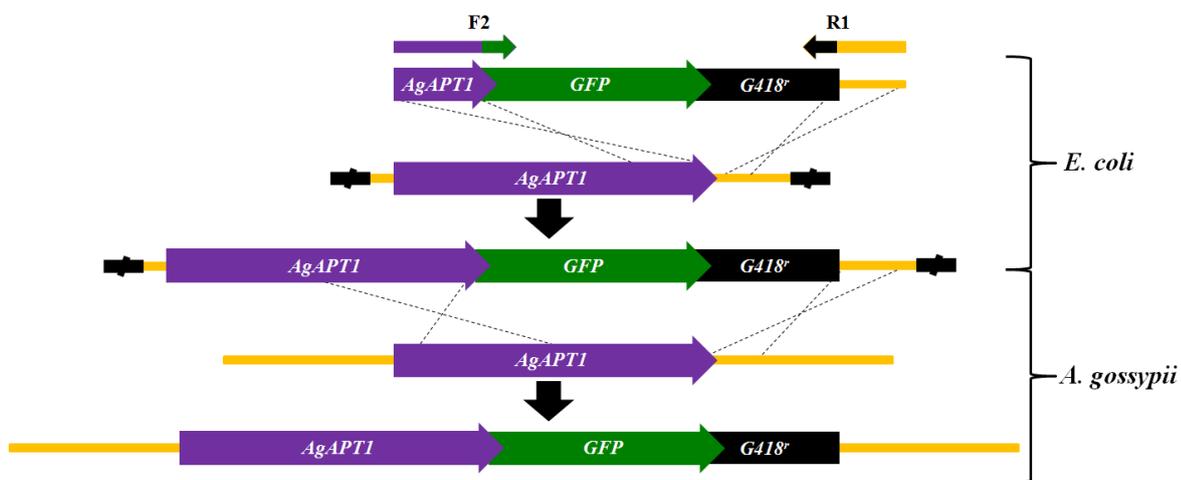


Figura 25. Construcción del módulo de etiquetado del gen *AgAPT1*. Marcado con el epítipo GFP en el extremo carboxilo terminal, junto con el marcador de selección $G418^R$ Cepa A226 de la colección. El módulo empleado para el gen *AgXPT1* se construyó de manera similar (Cepa A223).

El análisis directo mediante microscopía de fluorescencia de muestras tomadas a diferentes tiempos (8, 16, 24 y 36 horas) de cultivos líquidos iniciados a partir de esporas permitió conocer los patrones de fluorescencia asociados a las proteínas AgApt1-GFP(S65T)p y AgXpt1-GFP(S65T)p. La distribución de la fluorescencia en ambas cepas, *AgAPT1-GFP(S65T)* y *AgXPT1-GFP(S65T)*, fue idéntica para todas las muestras analizadas, localizándose de forma uniforme en el citosol y quedando excluida de las vacuolas y los septos (Figura 26). Aunque, si bien, el patrón de fluorescencia fue idéntico en ambas cepas, siempre se detectó mayor intensidad en la cepa que expresa la proteína AgXpt1-GFP(S65T)p que en la cepa que expresa la proteína AgApt1-GFP(S65T)p, sugiriendo mayor concentración celular de la proteína responsable de la recuperación de las nucleobases hipoxantina, xantina y guanina que de la proteína implicada en la recuperación de la nucleobase adenina.

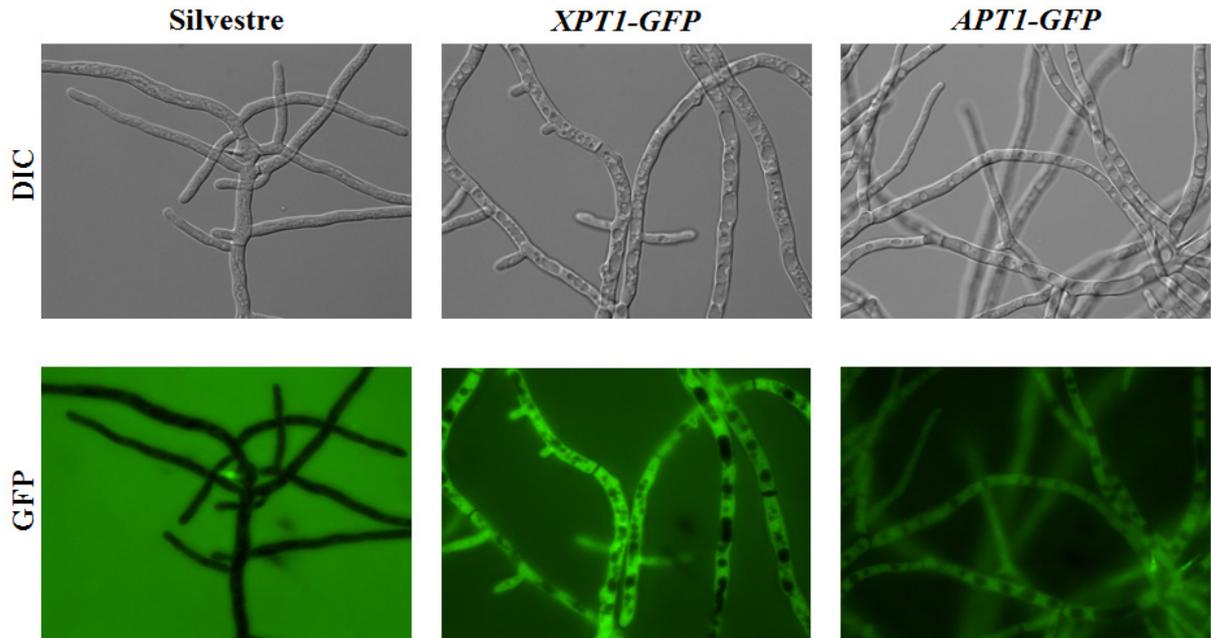


Figura 26. Localización subcelular de las proteínas recombinantes AgXpt1-GFP y AgApt1p-GFP por microscopía de fluorescencia. Las micrograffías corresponden a muestras tomadas a las 18 horas después de que se iniciase el cultivo. El análisis de cada una de las muestras se realizó con el microscopio Nikon Eclipse 90i, (60x), empleando la microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y el filtro GFP (Excitación 460-500 nm.).

Si bien el patrón de fluorescencia encontrado indicaba que ambas proteínas AgXpt1p y AgApt1p tenían una distribución citosólica, quisimos determinar si aún en el citosol podría haber una distribución desigual entre las regiones de crecimiento activo y aquellas en las que el crecimiento había cesado. Para esto comparamos el patrón de fluorescencia GFP con el que se obtiene al teñir el micelio con calcoflúor, compuesto fluorescente que se une a la quitina de la pared y marca aquellas zonas donde el crecimiento es más activo. El análisis al microscopio de fluorescencia de muestras tomadas a diferentes tiempos de cultivos de las cepas que expresan la GFP, *AgAPT1-GFP(S65T)* y *AgXPT1-GFP(S65T)*, reveló que no existe correlación entre las zonas de crecimiento activo, marcado por la fluorescencia del calcoflúor, con una variación en la fluorescencia asociada las proteínas AgXpt1p y AgApt1p (Figura 27). La superposición de las imágenes obtenidas con el filtro de GFP y las imágenes obtenidas con el filtro de calcoflúor no revelan una colocalización de la fluorescencia.

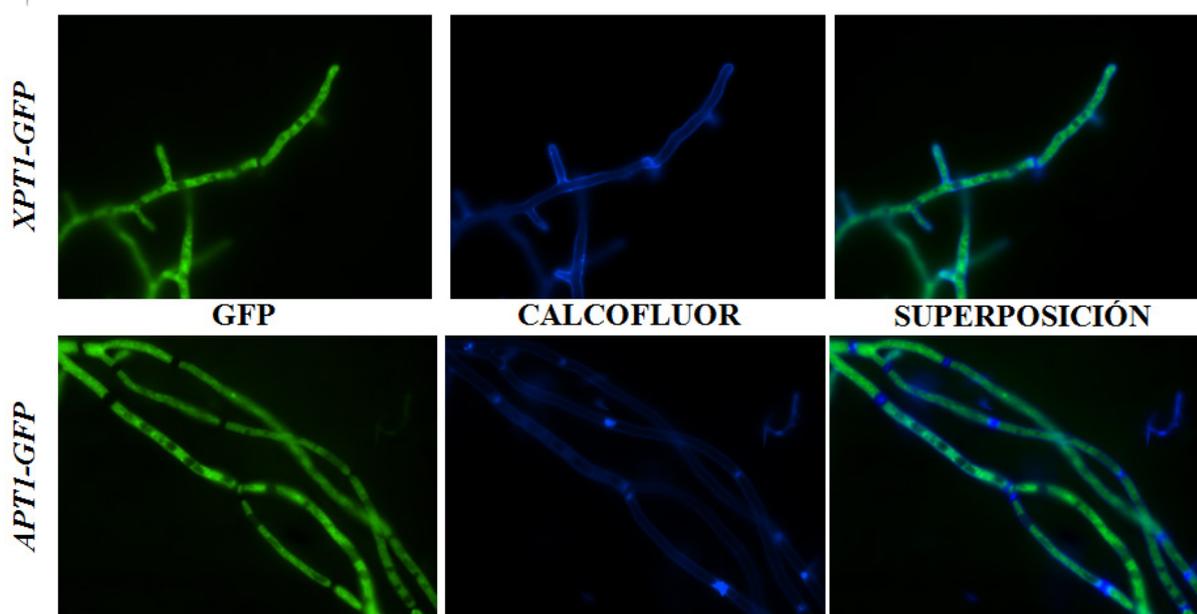


Figura 27. Patrones de fluorescencia, GFP y calcofluór, asociados a las cepas que expresan las proteínas recombinantes AgApt1-GFPp y AgXpt1-GFPp. Micrografías obtenidas con el microscopio Nikon Eclipse 90i, (60x) de muestras de cultivo (20 horas) teñidas con calcofluór (5µg/ml). Los filtros empleados fueron GFP (Ex. 460-500 nm) para la detección de la fluorescencia asociada a la proteínas recombinantes y DAPI (Ex. 340-380 nm) para la observación de la unión del calcofluór a las estructuras miceliales. Las imágenes corresponden a un tiempo de exposición de 500 mseg.

I.2.7. Excreción de derivados purínicos en cepas defectivas en las rutas de recuperación

Desde que se descubrió que en el hombre el síndrome de Lesch-Nyhan (Lesch y Nyan 1964) es debido a la deficiencia en la actividad HGPRT (Seegmiller *et al.*, 1967) y que dicha deficiencia conduce a la acumulación y excreción de hipoxantina (McKeran y Watts, 1976), se ha podido constatar que la falta de actividad de HGPRT en otros sistemas estudiados no siempre conlleva la acumulación de hipoxantina, sino que es posible la acumulación de otros derivados purínicos (de Groodt *et al.*, 1971; Woods *et al.*, 1983; Guetsova *et al.*, 1997).

A fin de conocer si la pérdida de las actividades APRT o/y HGPRT en *A. gossypii* lleva asociada la acumulación y excreción de algún derivado purínico se procedió a valorar la presencia de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos en cultivos de las cepas: Ag Δ pt1; Ag Δ xpt1; y Ag Δ pt1, Δ xpt1. Para ello, se realizó un ensayo de alimentación cruzada empleando las cepas Sc Δ ade4 y Sc Δ gual de *S. cerevisiae*, auxotróficas para adenina y guanina, respectivamente. Ambas cepas tienen bloqueada la ruta de síntesis *de novo*, la cepa Sc Δ ade4 en el primer paso de la ruta, carece de la actividad PRPP amidotransferasa, y la cepa Sc Δ gual en el último paso, en el que a partir del nucleótido XMP se forma GMP (Figura 14).

Antes de proceder al ensayo, analizamos mediante un test nutricional la capacidad de diferentes derivados purínicos de rescatar el fenotipo silvestre en las cepas *ScΔade4* y *ScΔgua1* de *S. cerevisiae*. Como se puede ver en la Figura 28, el test revela que la cepa *ScΔade4* crece con igual eficiencia que la cepa silvestre con la nucleobase adenina, el nucleósido inosina, y los nucleótidos AMP e IMP. No crece con el nucleótido ATP y aunque en menor medida que la cepa silvestre también puede crecer con el nucleósido adenosina. Por el contrario, la cepa *ScΔgua1* sólo crece bien con la nucleobase guanina y presenta un ligero crecimiento con los nucleótidos IMP y GMP. Los mismos resultados se obtuvieron en el test nutricional hecho en paralelo con las cepas *AgΔade4* y *AgΔgua1* de *A. gossypii*, a excepción de la cepa *AgΔade4* que a diferencia de *S. cerevisiae* puede también crecer con el nucleótido AMP.

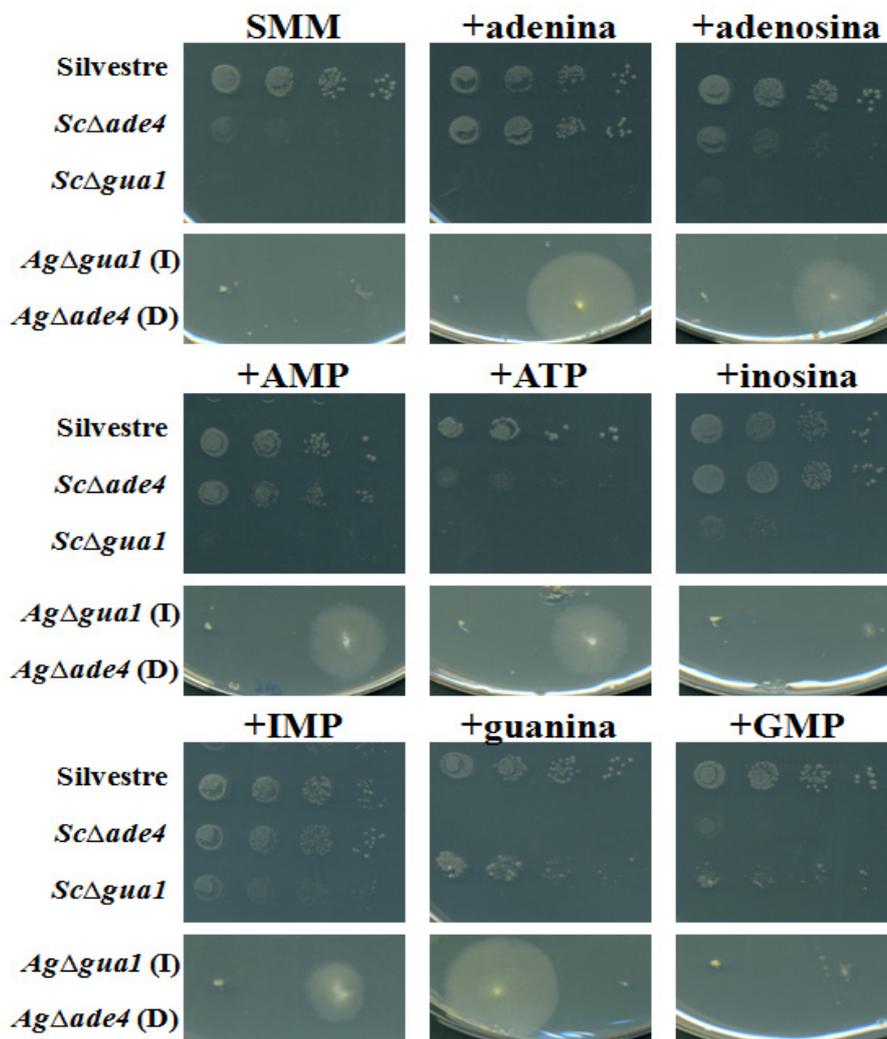


Figura 28. Test nutricional en cepas de *A. gossypii* y *S. cerevisiae* bloqueadas en diferentes etapas de la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purina. Las cepas empleadas de cada organismo (*Sc*, *S. cerevisiae* y *Ag*, *A. gossypii*) se indican en la parte izquierda de la figura. Los derivados purínicos usados en el test se indican en la parte superior de las imágenes y la cantidad añadida al medio de cultivo fue idéntica para todos ellos (0,3 mM). La posición de las cepas *AgΔgua1* y *AgΔade4* en todas las placas fue izquierda (I) y derecha (D), respectivamente.

Una vez determinados qué derivados purínicos pueden rescatar el crecimiento en las cepas mutantes de *S. cerevisiae*, se procedió al ensayo de alimentación cruzada. El ensayo se realizó en placas con medio sin derivado purínico alguno en las que se extendió un césped de células de la levadura y sobre el que se colocaron discos de papel de celofán con el micelio de las cepas de *A. gossypii* en las que se quería determinar la posible excreción de derivados purínicos (Figura 29). Después de incubar las placas para permitir el crecimiento de la levadura en condiciones óptimas de crecimiento de la levadura, el ensayo reveló que las tres cepas de *A. gossypii*, *AgΔapt1*; *AgΔxpt1*; y *AgΔapt1, AgΔxpt1*, permiten el crecimiento de la cepa *ScΔade4* de levadura mientras que la cepa silvestre y la cepa *AgΔamd1* no lo hacen al no generar ningún halo de crecimiento en su contorno (Figura 29, placa B y B'). Sin embargo, sólo la cepa *AgΔxpt1* y la cepa que porta la doble delección, *AgΔapt1, AgΔxpt1*, permiten el crecimiento de la cepa *ScΔgual* (Figura 29, placa C y C').

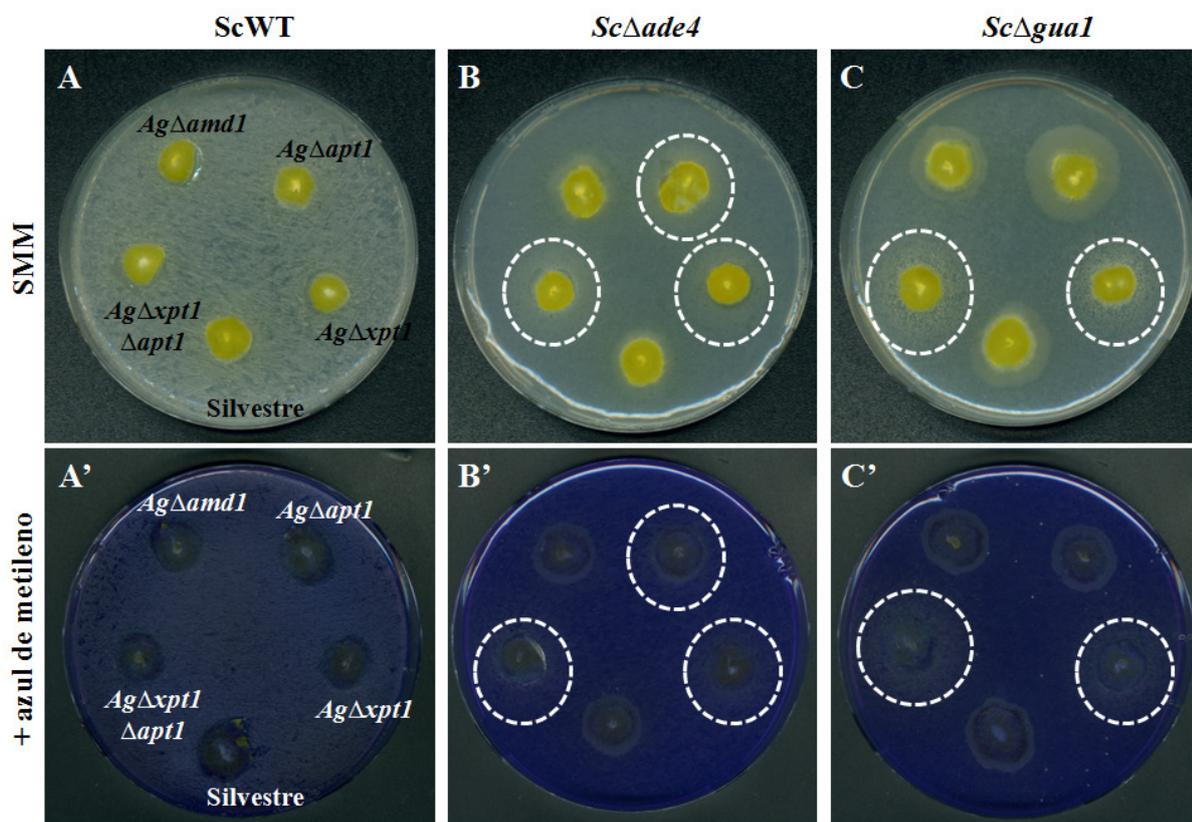


Figura 29. Ensayo de alimentación cruzada. Discos de micelio de las cepas silvestre, *AgΔapt1*; *AgΔxpt1*; *AgΔamd1* y *AgΔxpt1, AgΔapt1*; de *A. gossypii*, se depositaron sobre un césped de células de cepas de *S. cerevisiae*: placa A, cepa silvestre (ScWT); placa B, cepa *ScΔade4*; y placa C, cepa *ScΔgual*. Las placas se incubaron durante 4 días a 28°C, se fotografiaron y se tiñeron con azul de metileno para resaltar el crecimiento de la levadura.

Así, teniendo en cuenta los requerimientos nutricionales de las cepas *ScΔade4* y *ScΔgual*, los resultados obtenidos en el ensayo de alimentación cruzada demuestran que en *A. gossypii* tanto la pérdida de la actividad APRT (*AgΔapt1* y *AgΔapt1, AgΔxpt1*) como

de la actividad HXGPRT (*AgΔxpt1* y cepa *AgΔapt1*, *AgΔxpt1*) conduce a la excreción de derivados purínicos. Sin embargo, la pérdida de la actividad AMP desaminasa (*AgΔamd1*) no lleva asociado ningún fenotipo de excreción, comportándose igual que la cepa silvestre (Figura 29, placa B, B', C y C'). Aunque el ensayo no revela qué derivados purínicos están asociados a la pérdida de cada una de las actividades, sí se puede inferir que la falta de actividad APRT en *A. gossypii* conlleva la excreción de, al menos, alguno de los derivados que rescatan el fenotipo silvestre en la cepa *ScΔade4* de *S. cerevisiae* y que la ausencia de la actividad HXGPRT conduce a la excreción de alguno de los derivados que permiten el crecimiento de la cepa *ScΔgual* de levadura.

I.2.8. Efecto de las nucleobases de purina en el crecimiento

En el desarrollo del trabajo habíamos constatado que *A. gossypii*, al menos, la presencia de nucleobase adenina en el medio de cultivo tiene un efecto negativo en el crecimiento de la cepa silvestre, ya que el tamaño de las colonias del hongo se ve reducido. Este efecto inhibitorio, asociado a la nucleobase adenina, también se ha observado en cepas que tiene bloqueado algún paso de la ruta de síntesis *de novo* e incluso en cepas que expresan versiones génicas modificadas de algunos de los genes de la ruta.

A fin de profundizar en qué medida la presencia de nucleobases afecta al crecimiento del hongo procedimos, en un primer experimento, a determinar en presencia de qué nucleobases el crecimiento del hongo se veía afectado. En el experimento empleamos la cepa silvestre, las cepas defectivas en las rutas de recuperación (*AgΔapt1*; *AgΔxpt1*; y *AgΔxpt1*, *AgΔapt1*) y cepas que tienen modificada la ruta de síntesis *de novo* y son auxotróficas para adenina en mayor o menor grado, bien por carecer de alguna enzima esencial, cepa *AgΔade4* (Jiménez *et al.*, 2005), o bien por tener desregulada la ruta al carecer del factor de transcripción AgBas1p, cepa *AgΔbas1* (Mateos *et al.*, 2006), tenerlo modificado, cepa *AgΔbirBAS1* (Mateos *et al.*, 2006) o sobreexpresar una versión modificada del gen *AgADE4*, cepa *AgGPDp-ADE4^{wvq}* (Jiménez *et al.*, 2005). El análisis de las placas de cultivo (Figura 30), aunque no es concluyente porque al estar todas las cepas en la misma placa el crecimiento de unas cepas interfiere con las cepas adyacente, si demuestra, al menos, que la presencia de la nucleobase adenina determina un menor desarrollo en las cepas que no son auxotróficas para adenina.

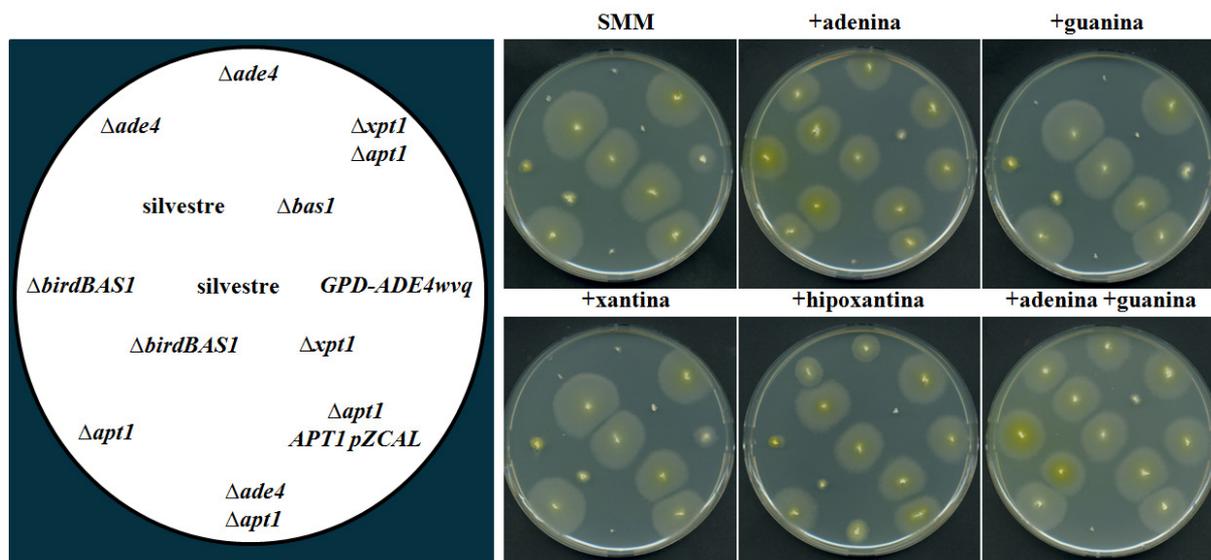


Figura 30. Crecimiento de *A. gossypii* en presencia de las diferentes nucleobases. Las cepas empleadas así como su disposición en las placas de cultivo se muestran en la parte izquierda de la figura. El medio de cultivo fue medio mínimo sintético (SMM) suplementado con las nucleobases que se indican en concentraciones idénticas (0,3 mM). El inóculo de las cepas en todas las placas se hizo a partir de micelio fresco de forma simultánea. Las placas se incubaron durante 7 días, tiempo al que corresponde las fotografías que se presentan.

Para una valoración precisa del grado de inhibición que las nucleobases tienen sobre el crecimiento, procedimos de igual manera que en el experimento anterior pero en este caso inoculando una única cepa en el centro de cada placa. Transcurrido el periodo de incubación, el crecimiento de cada colonia se midió en ambos ejes de coordenadas a intervalos de 2, 6 y 11 días, hasta que el crecimiento cesó. La representación gráfica del valor de la media de las dos medidas del tamaño que alcanza cada colonia (eje de ordenadas y eje de abscisas) a lo largo del tiempo de cultivo nos permitió conocer y comparar el efecto de las nucleobases de purina sobre el crecimiento (Figura 31).

Las curvas de crecimiento de colonias de las cepas ensayadas revelan que en general todas las cepas modificadas reducen su crecimiento en el medio mínimo sintético en comparación con cepa silvestre (Figura 31, SMM). Si exceptuamos las cepas que son parcial (*AgΔbirBAS1* y *AgGPDp-ADE4^{wvq}*) o totalmente auxotróficas para adenina (*AgΔade4* y *AgΔbas1*) vemos que la cepa que carece de todas las actividades PRT (*AgΔapat1*, *AgΔxpt1*) es en la que más reduce su crecimiento, siendo el tamaño de sus colonias un 17,5% inferior al tamaño que alcanzan las colonias de la cepa silvestre. Sin embargo, la cepa con la actividad APRT (cepa *AgΔxpt1*) sólo reduce su crecimiento un 6,25% y la cepa con la actividad HXGPRT (cepa *AgΔapt1*) lo hace en un 16,6%.

La presencia de las nucleobases en el medio afecta de forma diferente a cada una de las cepas. Mientras que la nucleobase adenina reduce el crecimiento en un 25% en la cepa silvestre, guanina lo hace en sólo en un 6,5%, y cuando están presentes en el medio

ambas nucleobases la reducción es de 16,6%. Por el contrario, en las cepas *AgΔapt1* y *AgΔxpt1* adenina y guanina tienen un efecto opuesto, adenina reduce mucho el crecimiento de la cepa *AgΔapt1* (42,8% respecto a la cepa silvestre) pero apenas tiene efecto sobre el crecimiento de la cepa *AgΔxpt1*, y guanina reduce mucho el crecimiento de la cepa *AgΔxpt1* (44,4% respecto a la cepa silvestre) y prácticamente no afecta al crecimiento de la cepa *AgΔapt1*. Sin embargo, cuando las dos nucleobases están presentes en el medio el crecimiento de ambas cepas, *AgΔapt1* y *AgΔxpt1*, es idéntico. La cepa que porta la doble delección, cepa *AgΔapt1, AgΔxpt1*, se comporta igual que las cepas con las delecciones simples, viéndose su crecimiento afectado en presencia de adenina como ocurre en la cepa *AgΔapt1* y en presencia de guanina como *AgΔxpt1*.

En cuanto a las cepas con modificaciones en la ruta *de novo*, vemos que adenina rescata totalmente el crecimiento sólo en la cepa la *AgΔade4*, que llega a ser ligeramente superior (5%) que el que presenta la cepa silvestre. Las cepas *AgΔbas1*, *Ag* y *AgGPDp-ADE4^{wvq}* nunca alcanzan valores de crecimiento de la cepa silvestre, siendo la cepa *AgGPDp-ADE4^{wvq}* y la cepa *AgΔbas1* las que presentan los valores más bajos, respectivamente.

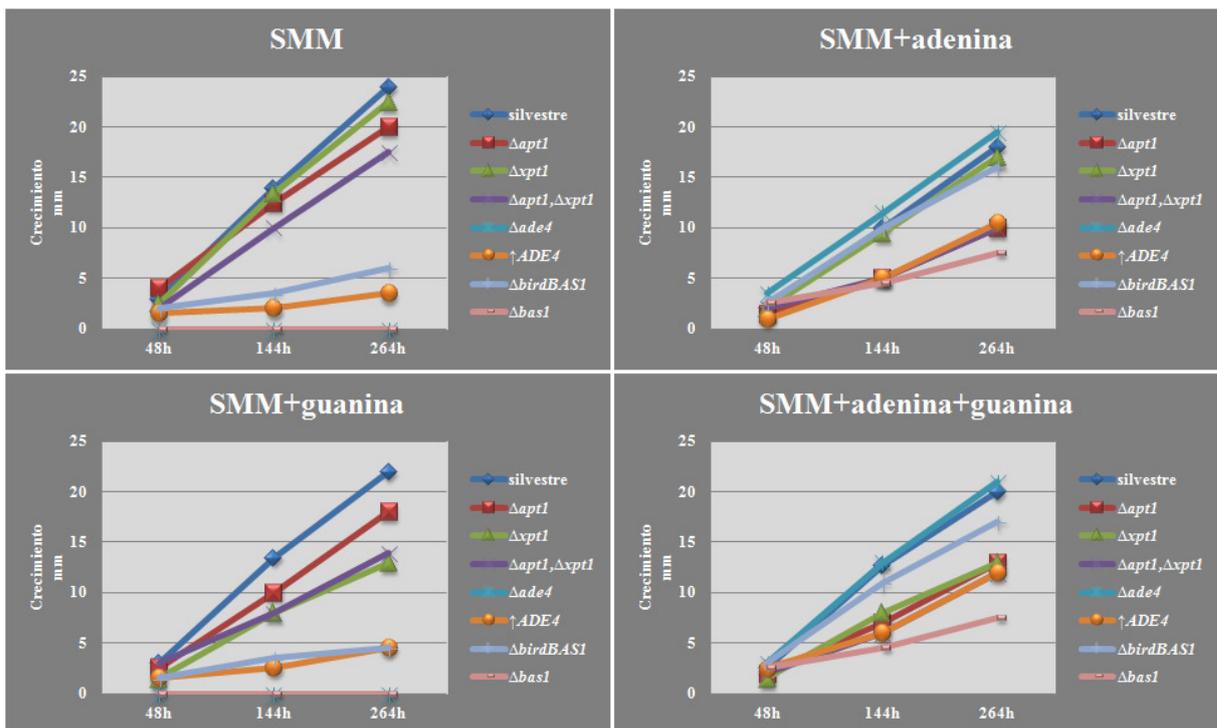


Figura 31. Efecto de las nucleobases en el crecimiento de *A. gossypii*. Las gráficas se obtuvieron representando los valores del tamaño que alcanzan las colonias en el tiempo de cada una de las cepas ensayadas en el medio que se indica en la parte superior de la gráfica. El crecimiento se determinó en la cepa silvestre, las cepas defectivas en las rutas de recuperación (*AgΔapt1*; *AgΔxpt1*; *AgΔxpt1, AgΔapt1*) y las cepas con modificaciones en la ruta *de novo* y que son total (*AgΔade4*) o parcialmente (*AgGPDp-ADE4^{wvq}*, *AgΔbirBAS1* y *AgΔbas1*) auxotróficas para adenina. Para cada cepa se empleó una placa. Todas las cepas se inocularon en el centro de la placa a partir de micelio fresco. El tamaño de cada colonia (mm) se obtuvo del promedio de los valores del diámetro medido en el eje imaginario de abscisas y de ordenadas. La inoculación, incubación y medición se hizo simultáneamente con todas las cepas.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran: 1) que las nucleobases adenina y guanina tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, siendo mayor el que ejerce adenina (el crecimiento se reduce en un 25%) que el que ejerce guanina (6,5%), si bien la inhibición que ejerce adenina se corrige con la presencia de guanina; 2) que la nucleobase tiene mayor poder inhibitorio que su nucleótido, ya que las cepas que carecen de alguna o todas las actividades PRT son las que más reducen su crecimiento; y 3) las cepas *AgΔbas1*, *AgΔbirBAS1* son insensibles a la acción inhibitoria de las bases, ambas crecen igual con adenina que con adenina más guanina, constatando la implicación del factor de transcripción Bas1p en mediar la respuesta celular a la presencia de nucleobases de purina (Mateos *et al.*, 2006).

I.2.9. Perfiles de transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de nucleótidos de purina

I.2.9.1 Expresión diferencial en la fase trófica y fase de producción

Habiendo observado, mediante el análisis de las actividades enzimáticas, como la inactivación de una de las rutas de recuperación repercute en un incremento de la actividad tanto de la ruta de recuperación funcional como de la ruta *de novo*, decidimos analizar si este incremento de actividad se correlacionaba con un incremento de la tasa de transcripción. Para ello analizamos a través de PCRs cuantitativas la respuesta transcripcional de las cepas defectivas en las rutas de recuperación *AgΔapt1*; *AgΔxpt1* y *AgΔapt1*, *AgΔxpt1*, junto con la cepa silvestre y la cepa defectiva en la ruta *de novo* *AgΔade4*. Los genes analizados en este estudio fueron para la ruta *de novo* *AgADE4*, *AgIMD3* y *AgGUA1*, y para las rutas de recuperación los genes *AgAPT1* y *AgXPT1*. El micelio, del cual se extrajo el ARN, se recogió de cultivos líquidos en medio rico a las 24 y 48 horas. La metodología empleada se detalla en el apartado VII.4 de Materiales y Métodos.

Los resultados (Figura 32) difieren en las dos franjas temporales seleccionadas. A las 24 horas del cultivo la cepa silvestre es la que presenta una mayor expresión de todos los genes, con la salvedad del gen *AgADE4*, cuya tasa de transcripción es mayor en la cepa *AgΔxpt1*. Al contrario de lo que ocurre a las 24 horas, a las 48 observamos como la cepa silvestre tiene reducida la expresión de sus genes por debajo de todas las demás cepas, salvo la cepa que tiene interrumpida ambas rutas de recuperación que siempre tiene la transcripción menor de todas las cepas estudiadas. La reducción de la tasa de transcripción de los genes estudiados en la cepa silvestre a las 48 horas es aproximadamente de un 80%, a excepción del gen *AgXPT1* donde esta reducción es menos drástica, reduciéndose un 25% con respecto a las 24 horas. Todas las cepas siguen un patrón parecido, siendo el gen *AgXPT1* el que menos ve reducida su expresión a tiempos mayores. Así pues, atendiendo a los genes implicados en las rutas de recuperación podemos indicar que mientras a 24 horas predominan los transcritos del gen *AgAPT1* con respecto a *AgXPT1* a las 48 horas sucede todo lo contrario, teniendo mayor relevancia *AgXPT1*.

Al comparar las diferentes cepas analizadas, en el tiempo de 48 horas podemos indicar que la cepa *AgΔade4* es la que tiene una mayor tasa de transcripción de los genes implicados en las rutas de recuperación, lo cual representa la necesidad de estas rutas para la síntesis de nucleótidos purínicos que no es capaz de sintetizar a partir de la ruta *de novo*. En el caso de *AgΔapt1* tiene una expresión del gen *AgXPT1* dos veces mayor respecto a la de la cepa silvestre. De manera similar ocurre en la cepa *AgΔxpt1*, en la cual la expresión del gen *AgAPT1* se ve duplicada. En ambas cepas se aprecia un incremento de la tasa de transcripción de los genes implicados en la transformación de nucleótidos de adenina a los de guanina, genes *AgIMD3* y *AgGUA1*. Lo cual, puede implicar un incremento en la formación de GTP y finalmente un aumento de la biosíntesis de riboflavina, en las cepas con interrupción de uno de los genes responsables del reciclaje de nucleobases de purinas.

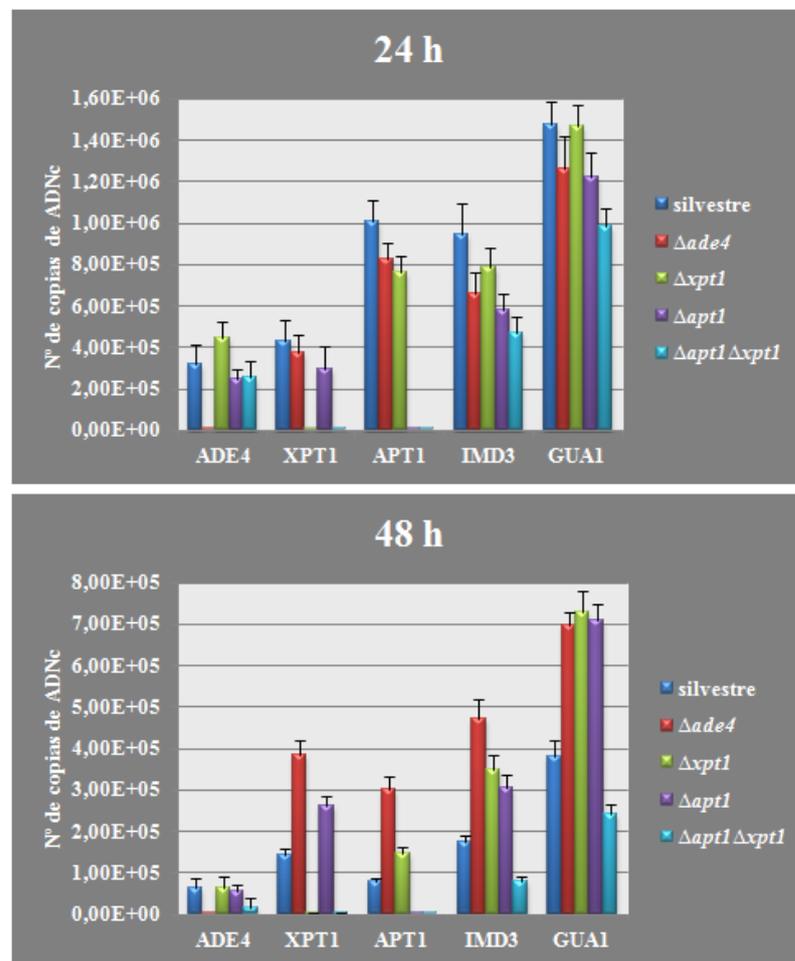


Figura 32. Perfil transcripcional de cepas defectivas en la biosíntesis de nucleótidos de purina. Representación gráfica de la respuesta transcripcional de los genes *AgADE4*, *AgAPT1*, *AgXPT1*, *AgIMD3* y *AgGUA1*, en las cepas de *A. gossypii* silvestre, $\Delta ade4$; $\Delta apt1$; $\Delta xpt1$ y $\Delta apt1 \Delta xpt1$. Tanto a 24 horas como 48 horas de cultivo en medio rico.

I.2.9.2 Modulación de la transcripción por las nucleobases de purina

El efecto represor que tiene la adenina sobre los genes implicados en la ruta de *de novo* de síntesis de nucleótidos de purina en *A. gossypii* ha sido analizado con anterioridad (Jiménez *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2006). Así como, la represión del gen *ADE4* por la presencia extracelular de guanina (Jiménez *et al.*, 2005). Quisimos comprobar si la presencia de las bases no solamente reprime la síntesis *de novo*, sino también la influencia que ejerce sobre los genes responsables de su utilización para la formación de nucleótidos. Como en los ensayos de crecimiento comprobamos que el efecto más notable se da en medio mínimo, éste fue el seleccionado para estos análisis.

Puesto que queríamos un conocimiento general del comportamiento de las rutas el ensayo se realizó con la cepa silvestre. Los genes analizados fueron: *AgADE4* de la ruta *de novo*; *AgAPT1* y *AgXPT1* de las rutas de recuperación; y los genes *AgAMD1*, *AgIMD3* y *AgGUA1* comunes a ambas rutas (Figura 33). Las medidas se tomaron a partir de cultivos líquidos tras 48 horas de incubación y siguiendo el protocolo detallado en el apartado VIII.2. de Materiales y Métodos.

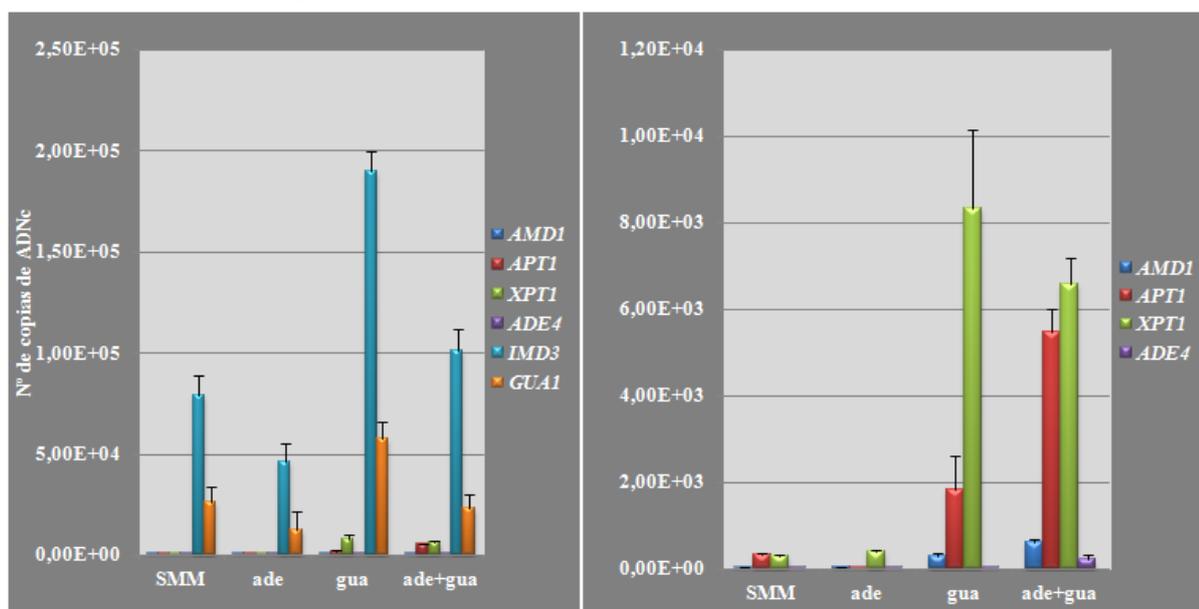


Figura 33. Respuesta transcripcional de los genes *AgAMD1*, *AgAPT1*, *AgXPT1*, *AgADE4*, *AgIMD3* y *AgGUA1*, frente a fuentes extracelulares de purinas. En el gráfico de la izquierda se representa la respuesta de todos los genes del estudio. En el de la derecha se representan aquellos genes que debido a las unidades no se observan detalladamente en el de la izquierda.

La adición de adenina supone una reducción de la transcripción de los genes empleados en el estudio salvo en el caso del gen *AgXPT1* sobre el cual no ejerce ningún efecto. Y el incremento al doble del gen *AgAMD1*. Sorprende la reducción de unas 200 veces el número de copias del transcrito del gen *AgAPT1*.

Cuando añadimos guanina al medio, el resultado es totalmente contrario a la adición de adenina, pues en este caso, se produce un incremento de la transcripción de los genes objeto de estudio. Siendo el gen *AgXPT1* el más afectado, percibiendo un

incremento 20 veces mayor que en medio mínimo. También destacamos el incremento de 6 veces la transcripción del gen *AgAPT1*. La excepción de estos incrementos es el gen *AgADE4* cuya tasa de transcripción se reduce a la mitad, efecto que se había comprobado en estudios anteriores (Jiménez *et al.*, 2005).

La adición de ambas bases al medio reduce el efecto represor que tiene la adenina sobre los genes analizados, en algunos casos como en el caso del gen *AgGUA1* no se llega a recuperar el nivel de transcripción existente en medio mínimo. En el caso del gen *AgIMD3*, el nivel de transcripción aun siendo mayor que en medio mínimo no llega al nivel que se presenta con la presencia en solitario de la guanina. El caso contrario es el experimentado por el gen *AgAPT1* cuya expresión se incrementa 17 veces con respecto al medio mínimo. De modo similar se comporta el gen *AgAMD1*.

En resumen, podemos indicar que la adenina ejerce un papel inhibitorio en la transcripción de los genes implicados en la síntesis de nucleótidos de purina, con la salvedad de los genes *AgAMD1* y *AgXPT1*, los cuales se ven estimulados. Y la guanina ejerce un efecto activador en la síntesis de estos nucleótidos, salvo por la represión del gen *AgADE4* (Figura 34).

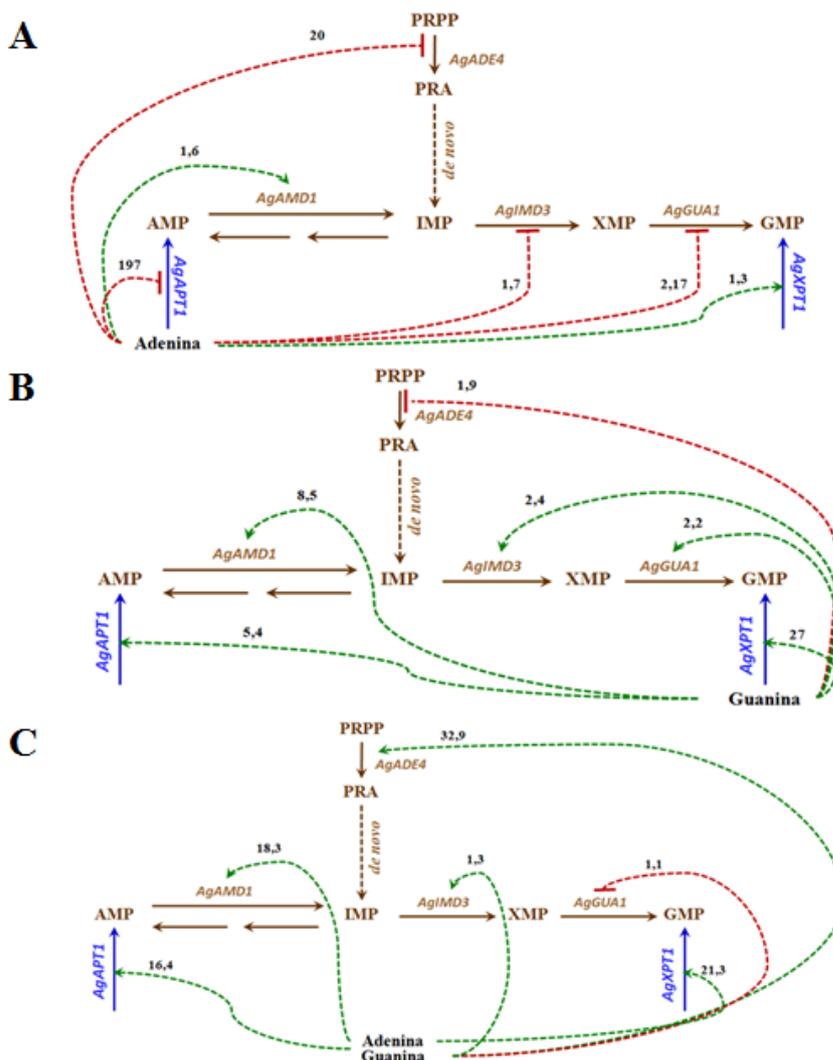


Figura 34. Efecto de las nucleobases de purina en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de los nucleótidos AMP y GMP. Las líneas discontinuas representa el efecto de activación (verde) o inhibición (rojo) y los números corresponden a la relación del número de copias de ARNm en ausencia y en presencia de la nucleobase. Los genes correspondientes a las rutas *de novo* y de recuperación se indican en diferente color (*de novo*, marrón y de recuperación azul). **A**, **B**, y **C**, efecto de la nucleobase adenina, guanina y adenina más guanina, respectivamente.

II. POTENCIALES TRASPORTADORES DE NUCLEOBASES DE PURINA EN *A. GOSSYPII*

Como se recoge en la introducción (Página 15), los sistemas de transporte de nucleobases de purina varían de unos organismos a otros, pudiéndose diferenciar tres grandes familias: la familia NAT (Nucleobase Ascorbate Transporter) o familia NCS2 (Nucleobase Cation Symporter 2) que incluye transportadores con diferente especificidad en hongos (Diallinas *et al.*, 1995) y bacterias (Karatzá y Frillingos, 2005); la familia ENT (Equilibrative Nucleoside Transporters) implicados tanto en el transporte de nucleobases como de nucleósidos en mamíferos (Karatzá y Frillingos, 2005; Rivas *et al.*, 2008) y protozoos (Baldwin *et al.*, 2004; Burchmore *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005); y la familia PUP (Purine Uptake Permease) y UPS (Ureidin Permease) específica de plantas (Mansfield *et al.*, 2009; Jelesko, 2012).

Dada la importancia de la presencia intracelular de las nucleobases de purina en *A. gossypii*, no sólo por ser sustratos para la síntesis de ribonucleótidos sino también por su acción inhibitoria del crecimiento, procedimos a la búsqueda de los transportadores que podían mediar la entrada de nucleobases en el hongo.

II.1. IDENTIFICACIÓN DE GENES POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE PURINAS

La disponibilidad y accesibilidad a través del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y el EMBL (European Molecular Biology Laboratory) a secuencias génicas y aminoacídicas de transportadores de purinas, ya estudiados y caracterizados en diferentes organismos, nos permitió hacer búsquedas de homología de secuencia en el genoma de *A. gossypii*. En la búsqueda, empleando herramientas informáticas tales como BLAST Nucleotide y BLAST Protein del NCBI, PSI-Search, ClustalW2, Needle y LAlign del EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute), identificamos tres genes, *AgADL074W* (*AgFCY2*), *AgAFR622W*, *AgACR289W*, con homología significativa a transportadores de nucleobases purinas, si bien el gen *AgADL074W* había sido identificado ya con anterioridad (Figura 15).

La traducción conceptual del gen *AgADL074W* dio una proteína relacionada con los transportadores de nucleobases de purina, *Fcy2*, *Fcy21* y *Fcy22*, de *S. cerevisiae* (55-59% de identidad y 70-74% de similitud). Dado que el mayor porcentaje de identidad y similitud lo encontramos con la proteína *ScFcy2*, el gen *AgADL074W* pasamos a denominarlo *AgFCY2*. Aunque el gen *ScFCY2* de *S. cerevisiae* es homólogo a *ScFCY21* y *ScFCY22*, los mutantes *Scfcy2* no son complementados ni por *ScFCY21* ni por *ScFCY22*, sugiriendo una funcionalidad diferente para cada uno de los productos génicos (Nelissen *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2001). *ScFCY2* posee la firma típica de los transportadores de

la familia ENT (11 dominios transmembrana) y, de hecho, la mutación *Scfcy2* se complementa por la expresión de proteínas ENT1 y ENT2 de mamíferos (Yao, *et al.*, 2002).

La proteína del gen *AgAFR622W* presentó un 31% de identidad y un 48% de similitud con el transportador específico de la nucleobase hipoxantina de la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* (de la Riva *et al.*, 2008). Además, encontramos que la proteína *AgAFr622Wp* está relacionada con una amplia variedad de proteínas de la familia NAT. A diferencia de los genes *AgFCY2* y *AgACR289C*, el gen *AgAFR622W* no tiene gen homólogo en *S. cerevisiae*.

La proteína derivada del gen *AgACR289W* dio homología con transportadores de la familia ENT que engloba los transportadores responsables tanto del transporte de nucleobases como de nucleósidos en mamíferos y protozoos (Baldwin *et al.*, 2004; Burchmore *et al.*, 2003). El mayor porcentaje de identidad y similitud para la proteína del gen *AgACR289W* (38% y 57%, respectivamente) la encontramos con el transportador de nucleósidos *ScFUN26* de *S. cerevisiae* que se encuentra en la membrana vacuolar (38% de identidad y 55% (Vickers *et al.*, 2000). Pero también presenta un alto porcentaje de identidad y similitud con los transportadores bien caracterizados CfNt1p y CfNt2p del protozoo *Crithidia fasciculata* (Liu *et al.*, 2005). A partir de ahora denominaremos al gen *AgACR289W* como *AgFUN26* por presentar homología de secuencia con al gen *ScFUN26* de *S. cerevisiae*.

Una vez identificadas las ORFs que potencialmente podían tener una función en el transporte de nucleobases de purinas en *A. gossypii* procedimos a su clonación y posterior interrupción génica para proceder a su caracterización funcional (Figura 35). Empleando oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes y ADN genómico, amplificamos, mediante PCR, los fragmentos genómicos correspondientes, los clonamos en el vector pGEM-T (Promega Biotech Ibérica), identificamos los fragmentos clonados por secuenciación y, finalmente, procediendo a la construcción de módulos de delección y posterior obtención de las cepas que expresan las versiones delecionadas de cada uno de los genes (Figura 35). Además, empleando el módulo de delección del gen *AgFCY2* que lleva el marcador *HYG^R* y por transformación de las cepas que portan las delecciones *Ag Δ acr289W* y *Ag Δ fun26* obtuvimos los dobles deletantes *Ag Δ fcy2*, *Ag Δ acr622W* (A295) y *Ag Δ fcy2*, *Ag Δ fun26*(A303).

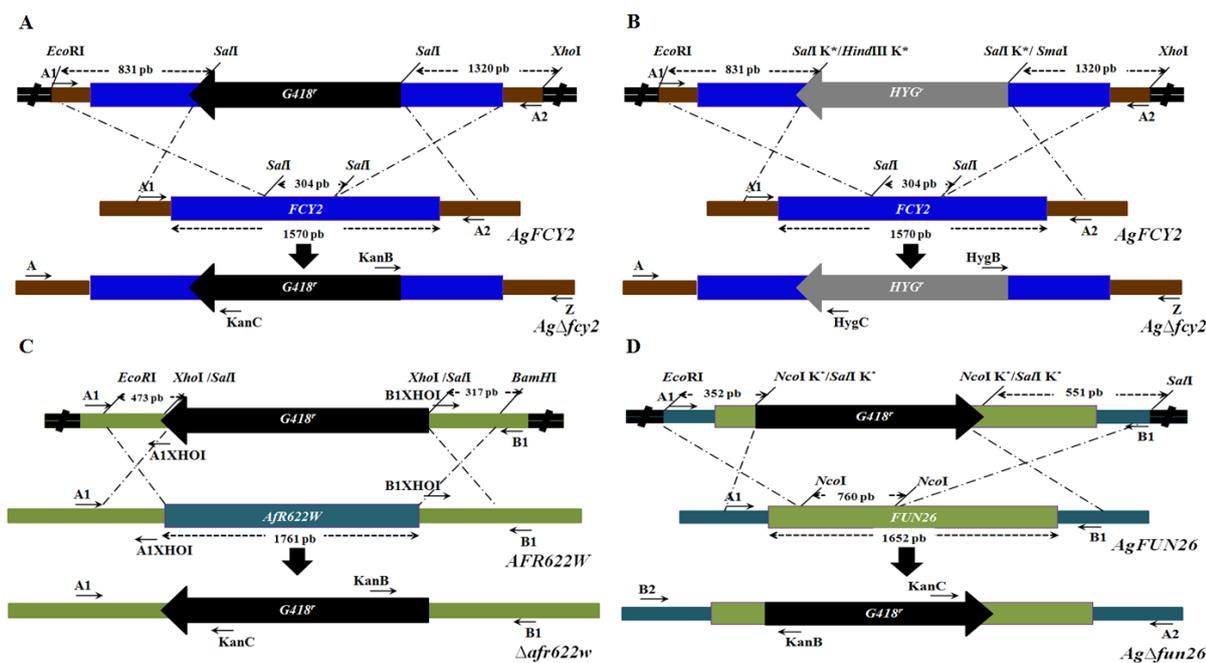


Figura 35. Módulos de delección empleados para la inactivación génica de los genes responsables del transporte de nucleobases de purinas en *A. gossypii*. **A)** Módulo empleado para la inactivación del gen *AgFCY2* con el marcador de resistencia a geneticina (Cepa construida A146). **B)** *AgFCY2* con marcador de resistencia a *HYG^R* (A294). **C)** *AgAFR622W* (A288). **D)** *AgFUN26* (A271). En cada uno de ellos se indican las enzimas empleadas para la construcción de cada módulo, indicando el símbolo K* que el sitio ha sido klenado. Los oligonucleótidos se indican con una flecha y el nombre cuya secuencia se indica en Materiales y Métodos. En segmentos de líneas discontinuas acotadas por puntas de flechas se hace referencia de las longitudes: de las ORFs, del corte interno para la interrupción del gen y de los fragmentos que flanquean la interrupción para permitir la recombinación. ≠ indica las secuencias del vector pGEM-T que flanquean al módulo de delección.

II.2 FUNCIÓN DEL GEN *AGFCY2* EN EL TRANSPORTE DE NUCLEOBASES DE PURINA EN *A. GOSSYPII* Y EN *S. CEREVISIAE*

Uno de los fenotipos esperado para las cepas portadoras de la delección de los potenciales transportadores de nucleobases era la resistencia parcial o total a los análogos 8-azaguanina y 8-azaadenina, ya que estos compuestos mimetizan el comportamiento de las nucleobases pero su incorporación al material hereditario resulta letal. De hecho, está recogido en la literatura que la inactivación del gen *ScFCY2* en *S. cerevisiae* genera resistencia no sólo a 8-azaadenina y 8-azaguanina sino también a 5-fluorocitosina, 5-fluorouracilo y a cisplatino (Guetsova *et al.*, 1997; Escobar-Henriques y Daignan-Fornier, 2001; Huang *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando analizamos la capacidad de crecimiento de la cepa mutante $\Delta fcy2$ de *A. gossypii*, en presencia de los análogos de nucleobases (8-azaadenina y 8-azaguanina) no encontramos diferencias significativas con la cepa silvestre, ambas se comportan igual en presencia de los compuestos genotóxicos 8-azaadenina y 8-azaguanina (Figura 36 A).

Tampoco encontramos diferencias cuando comparamos el crecimiento de la cepa silvestre y la cepa en la que combinamos el alelo de delección *AgΔfcy2* con el alelo *AgΔade4* que confiere auxotrofia para la nucleobase adenina y que, por tanto, requiere de del aporte extracelular de adenina para crecer (Figura 36 B). Los dos resultados asociados a la delección del gen *AgFCY2*, no ganancia de la función de resistencia a los análogos de base (8-azaadenina y 8-azaguanina) y no efecto en la capacidad de transporte, al menos de la base adenina, sugerían que la función del gen *AgFCY2* de *A. gossypii*, diferían de la función asociada al gen *ScFCY2* de la levadura, si bien ambas proteínas *AgFcy2p* y *ScFcy2p* conservan un alto porcentaje de similitud (74%).

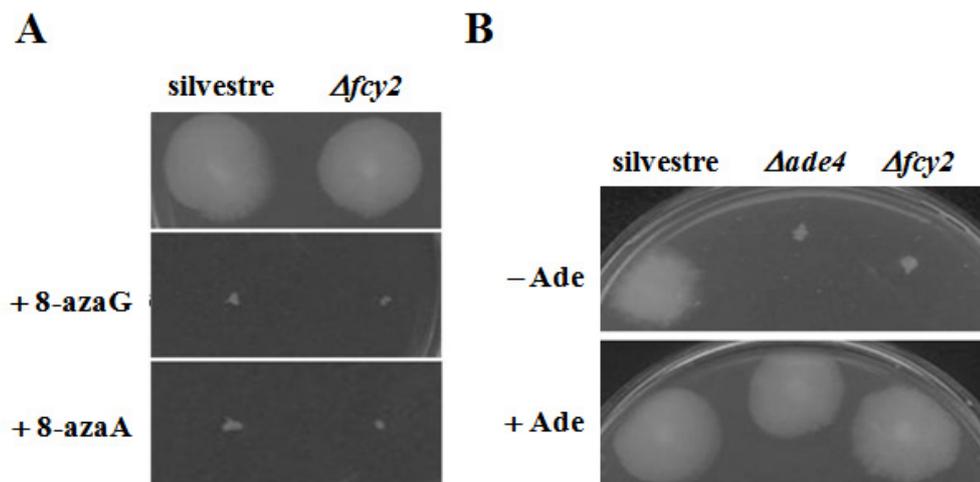


Figura 36. Análisis de la capacidad de internalizar nucleobases purina los mutantes *AgΔfcy2*. **A)** Efecto en el crecimiento del análogo de guanina, 8-azaguanina (8-azaG) y del análogo de adenina 8-azaadenina (8-azaA) en la cepa silvestre *AgFCY2* y en la cepa portadora de la delección, *AgΔfcy2*. **B)** Test de crecimiento en medio mínimo sintético en ausencia (- Ade) y presencia (+ Ade) de adenina de la cepa silvestre *AgFCY2*, *AgADE4*, la cepa auxotrófica para adenina *Agade4*, y la cepa que porta ambas mutaciones *AgΔfcy2*, *Agade4*.

En un intento de validar los resultados obtenidos con la delección del gen *AgΔfcy2* y contrastarlos con los fenotipos de resistencia descritos para *S. cerevisiae*, (Guetsova *et al.*, 1997; Escobar-Henriques y Daignan-Fornier, 2001, entre otros) se procedió a analizar el efecto que 8-azaadenina y 5-fluorocitosina tenía sobre el crecimiento en tres cepas de la levadura, la cepa silvestre BY4741, la cepa que lleva la delección completa de la ORF del gen *FCY2* (*Δfcy2*) y la cepa que carece de la actividad APRT (*Δapt1*), cepas disponibles en el laboratorio y procedentes de la colección de deletantes (SGDP, http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deleEon_project/deleEons3.html). El test de crecimiento reveló que las tres cepas, BY4741, *Δfcy2* y *Δapt1* crecen con igual eficiencia tanto en ausencia como en presencia de 8-azaadenina (Figura 37 A). Sin embargo, la presencia de 5-fluorocitosina inhibe el crecimiento de la cepa silvestre y de la cepa *Δapt1* y sólo la cepa *Δfcy2* es capaz de crecer en presencia de la droga. Por el contrario, el mismo ensayo nutricional, empleando el mismo medio de cultivo que el usado con la levadura dio resultados diferentes en *A. gossypii* (Figura 37 B). Ni la cepa

silvestre de *A. gossypii* ni la cepa $\Delta fcy2$ crecen cuando 8-azaadenina está presente en el medio, en contraste con la cepa $\Delta apt1$ que crece eficientemente con independencia de la presencia o ausencia del análogo de adenina.

En cuanto al efecto que tiene el compuesto 5-fluorocitosina sobre el crecimiento de *A. gossypii* y de *S. cerevisiae*, el test de crecimiento revela que es más drástico en *S. cerevisiae* que en *A. gossypii*. Mientras que en *S. cerevisiae* sólo la cepa que no tiene funcional el gen *FCY2*, cepa $\Delta fcy2$, es totalmente refractaria a la presencia del análogo de citosina, en *A. gossypii* tanto la cepa silvestre como la cepa $Ag\Delta apt1$ pueden crecer aunque con menor eficiencia que lo hace la cepa $Ag\Delta fcy2$ (Figura 37 B).

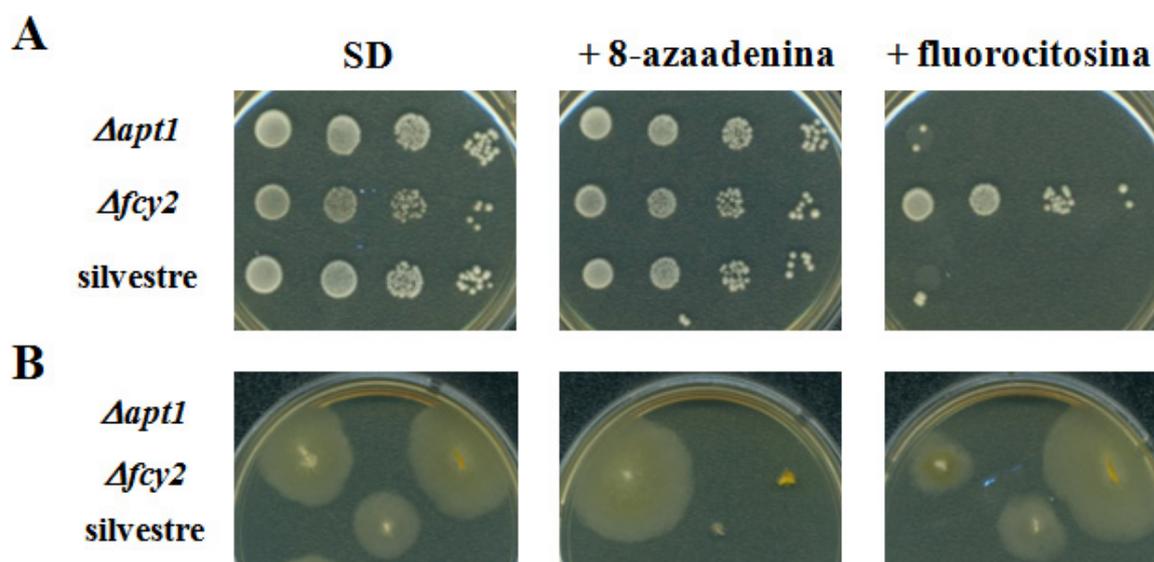


Figura 37. Efecto de 8-azaadenina y 5-fluorocitosina en el crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* y *A. gossypii*. **A)** Crecimiento de la cepa silvestre, y de las cepas mutantes $\Delta fcy2$ y $\Delta apt1$ de *S. cerevisiae*, empleando cuatro diluciones para cada cepa (DO: 1; 0,1; 0,01; 0,001). **B)** Crecimiento de las cepas *A. gossypii* con genotipo equivalente al que tienen las cepas de levadura.

Por último, para determinar si el gen *AgFCY2* podía tener alguna función más relevante en el transporte de la nucleobase guanina del que ya habíamos determinado con la nucleobase adenina procedimos a realizar un ensayo de crecimiento en presencia de ácido micofenólico (MPA). La adición al medio de cultivo de MPA en *A. gossypii* genera auxotrofia para guanina (Mateos *et al.*, 2006), ya que la droga inhibe la formación de GMP desde IMP e impide el crecimiento celular pero en presencia de las nucleobases guanina o xantina se restaura el crecimiento puesto que la célula puede sintetizar GMP directamente por fosforribosilación de las nucleobases. En *S. cerevisiae* también el MPA genera auxotrofia para guanina pero sólo en cepas *ScΔimd2* como ya se vio en los ensayos de complementación (Apartado I.1.2.2.)

El ensayo de crecimiento realizado en paralelo con cepas de *S. cerevisiae* y *A. gossypii* (Figura 38), reveló que la entrada de la nucleobase guanina a la célula no es dependiente de la funcionalidad del gen *FCY2* ni en la levadura ni en el hongo (Figura 38,

medio MPA+G). La nucleobase guanina en *S. cerevisiae* rescata el crecimiento con igual eficiencia tanto en la cepa *ScΔimd2* con el transportador funcional *Fcy2p* como en la cepa *ScΔimd2, ScΔfcy2* que carece del transportador. Un comportamiento similar encontramos en *A. gossypii* si comparamos el crecimiento en el medio con MPA y el medio que lleva MPA más guanina, ambas cepas silvestre *AgFCY2* y mutante *Δfcy2* crecen con guanina, incluso el mutante sin el transportador *AgFcy2p* crece mejor que la cepa silvestre, si bien en ninguna de las cepas mutante *Δfcy2* y silvestre *AgFCY2* la nucleobase guanina es capaz de rescatar totalmente el crecimiento debido a que la concentración mínima inhibitoria del MPA en *S. cerevisiae* y *A. gossypii* varía en dos orden de magnitud como se demostró experimentalmente después (5 µg/ml para *S. cerevisiae* en medio sólido frente a 0,05 µg/ml para *A. gossypii*).

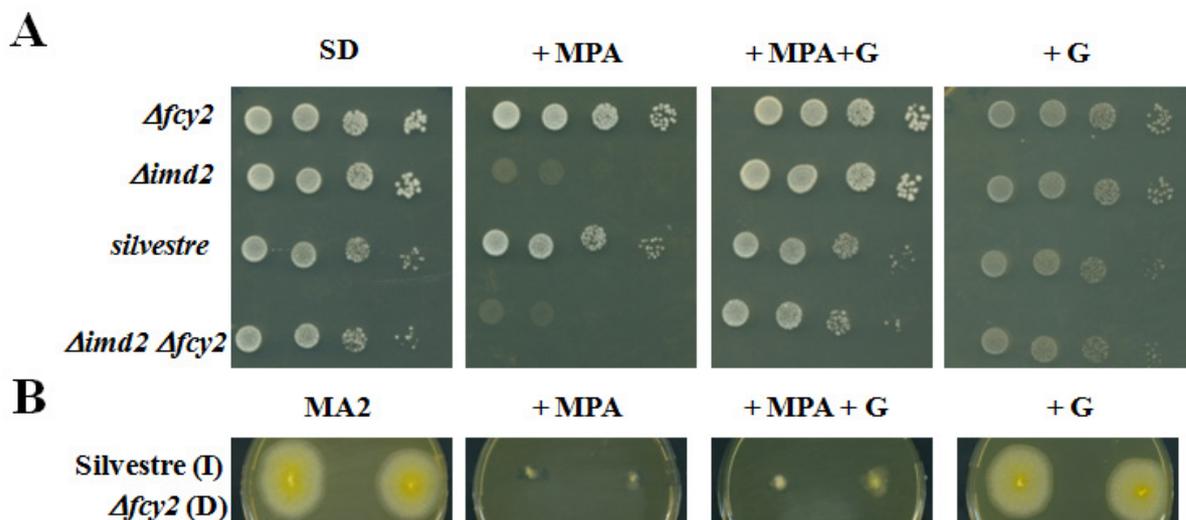


Figura 38. Efecto de la inactivación del gen *FCY2* en la entrada de guanina al interior celular en *S. cerevisiae* y en *A. gossypii*. **A)** Crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* que indicadas en el margen izquierdo de la figura en medio sintético (SD) sin y con ácido micofenólico (+MPA). Los medios con la nucleobase guanina se indican con + G. Para cada cepa se sembraron 5 µl de diluciones seriadas (DO: 1; 0,1; 0,01; 0,001). La cepa *ScΔimd2, ScΔfcy2* se construyó por transformación de la cepa *ScΔimd2* (Y-1181) con el módulo de delección *Scfcy2::kanMX4* obtenido por PCR de la cepa (Y-952). **B)** Crecimiento de las cepas de *A. gossypii* silvestre (I) y mutante *AgΔfcy2* (D), parte izquierda y derecha de la placa, respectivamente. Para el crecimiento del hongo se emplearon los mismos medios que para levadura pero en vez de usar SD se usó medio rico (MA2). La concentración de MPA y guanina empleada fue 10 µg/ml y 0,2 mg/ml, respectivamente.

II.3 CONTRIBUCIÓN DE LOS GENES *AGFCY2*, *AGAFR622W* Y *AGFUN26* AL TRANSPORTE DE NUCLEOBASES.

Las cepas que portan las deleciones de los potenciales transportadores *AgAFR622W* y *AgFUN26*, identificados por homología de secuencia, en presencia de los análogos de nucleobases se comportan igual que los mutantes de deleción del gen *AgFCY2* (datos no mostrados). Puesto que el fenotipo de sensibilidad a los análogos podría deberse a que los tres potenciales transportadores contribuyesen parcialmente a la entrada de las nucleobases y que ,por tanto, la falta de uno de ellos no fuese suficiente para bloquear la entrada a la célula de las nucleobases procedimos a analizar el fenotipo de crecimiento en medio mínimo sintético tanto de las cepas que carecen de cada uno de los transportadores como de las cepas que combinan la falta de *AgFCY2* con los otros dos (Figura 39).

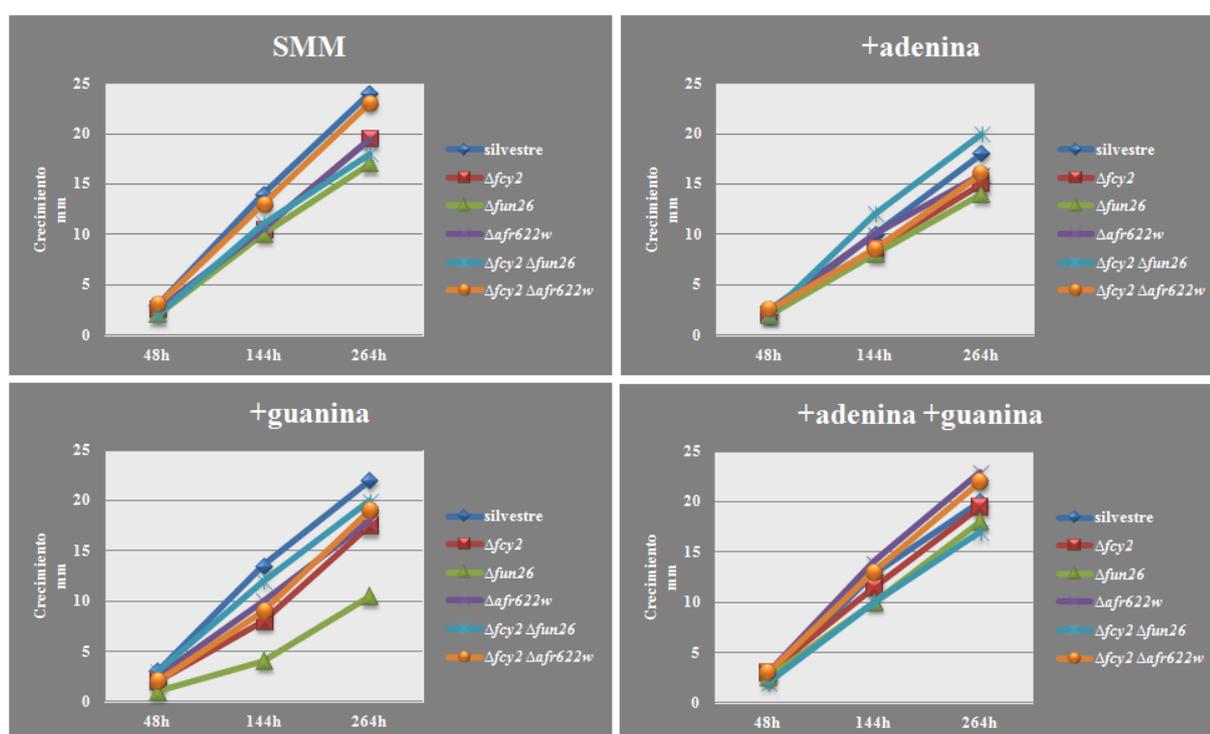


Figura 39. Efecto de la presencia de nucleobases sobre el crecimiento en cepas defectivas en el transporte. En el eje de ordenadas se representa el crecimiento del micelio dado en milímetros y en el de abscisas el tiempo al cual se realizaron las medidas dado en horas.

El resultado del crecimiento en medio mínimo sintético en ausencia y en presencia de las diferentes nucleobases (Figura 39), revela que la deleción de cualquiera de los transportadores modifica la capacidad de crecimiento no sólo en presencia de las nucleobases sino también cuando no hay nucleobases en el medio (Figura 39, SMM).

En ausencia de nucleobases la deleción de cualquiera de los transportadores modifica la capacidad de crecimiento, reduciéndose el tamaño de las colonias entre un 28 y un 20% respecto a la cepa silvestre, a excepción de la cepa *AgΔfcy2*, *AgΔafr622w* que crece igual que la cepa silvestre. Este comportamiento sugiere que la falta de cualquiera

de los genes *AgFCY2*, *AgAFR622W* y *AgFUN26* altera la permeabilidad de la célula bien a la entrada de algún requerimiento presente en el medio (sales, glucosa o al aminoácido asparragina) o bien a la salida de algún metabolito cuya acumulación en la célula pueda ser perjudicial. Sin embargo, la alteración de la permeabilidad que provoca la delección del gen *AgAFR622W* se contrarresta con la delección del gen *AgFCY2*, sugiriendo una función antagónica de ambos genes.

La reducción de la tasa de crecimiento de los mutantes *AgΔfcy2*, *AgΔafr622w* y *AgΔfun26* en presencia de cualquiera de las nucleobases adenina o guanina con respecto a la tasa de crecimiento de la cepa silvestre en los mismos medios sugiere que las tres cepas mutantes alcanzan mayor concentración intracelular de las nucleobases, indicando que en realidad los transportadores *AgFCY2*, *AgAFR622W* y *AgFUN26* actuarían como bombas de expulsión. Así pues, la célula requeriría de los tres transportadores para mantener una concentración intracelular de nucleobases idónea. Esto se ve corroborado por el hecho de que tanto la presencia de adenina como de guanina inhibe el crecimiento de las tres cepas que carecen de alguno de los transportadores, siendo menor el efecto de inhibición cuando faltan dos de ellos como sucede en las cepas *AgΔfcy2*, *AgΔfun26* y *AgΔfcy2*, *AgΔafr622w* que incluso presentan tasas de crecimiento mayores que la cepa silvestre, al menos, en presencia de adenina y de adenina más guanina.

La función de bombas de expulsión sugerida de las tasas de crecimiento que presentan las cepas que carecen de los diferentes transportadores fue confirmada mediante ensayos de incorporación de nucleobases marcadas con el isótopo ^{14}C . La cuantificación intracelular de las bases incorporadas por cada una de las cepas reveló que la ausencia de cualquiera de los tres transportadores incrementa la concentración intracelular de las bases marcadas tanto de adenina como de guanina (Figura 40). Sin embargo, las cepas que carecen del transportador *AgΔFCY2* en combinación con la carencia de *AgFUN26* ó *AgΔAFR622W* reducen la concentración intracelular de ambas nucleobases, cayendo por debajo de los niveles que tiene la cepa silvestre. Esta caída, en principio, asociada a la falta de *AgΔFCY2* sugiere que este transportador en realidad tendría la función de mantener un equilibrio de las bases a ambos lados de la membrana plasmática y que su eliminación conduciría a un desequilibrio facilitando la entrada cuando *AgFun26p* y *AgAfr622wp* son funcionales y reduciendo la entrada a la célula tanto si falta *AgFun26p* como si falta *AgAfr622wp*. La misma función podría atribuirse también a *AgFun26p* y *AgAfr622wp*, siendo, por tanto, necesaria la acción conjunta de los tres transportadores para alcanzar los niveles de intracelulares de nucleobases que tiene la cepa silvestre. Determinar si en *A. gossypii* la modulación de la entrada de nucleobases a la célula está mediada solo por estos tres transportadores o requiere de transportadores adicionales será objeto de un nuevo trabajo experimental que aún no se ha iniciado.

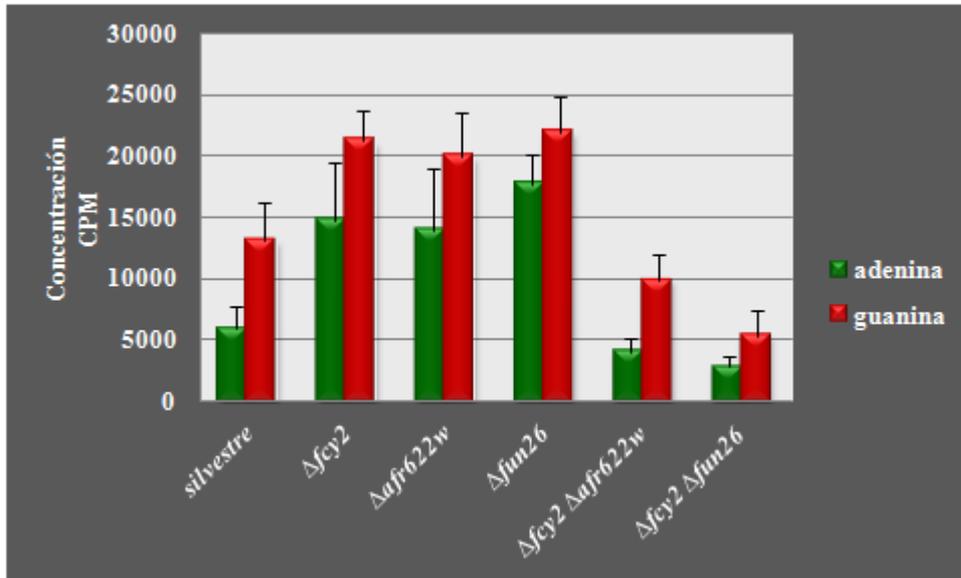
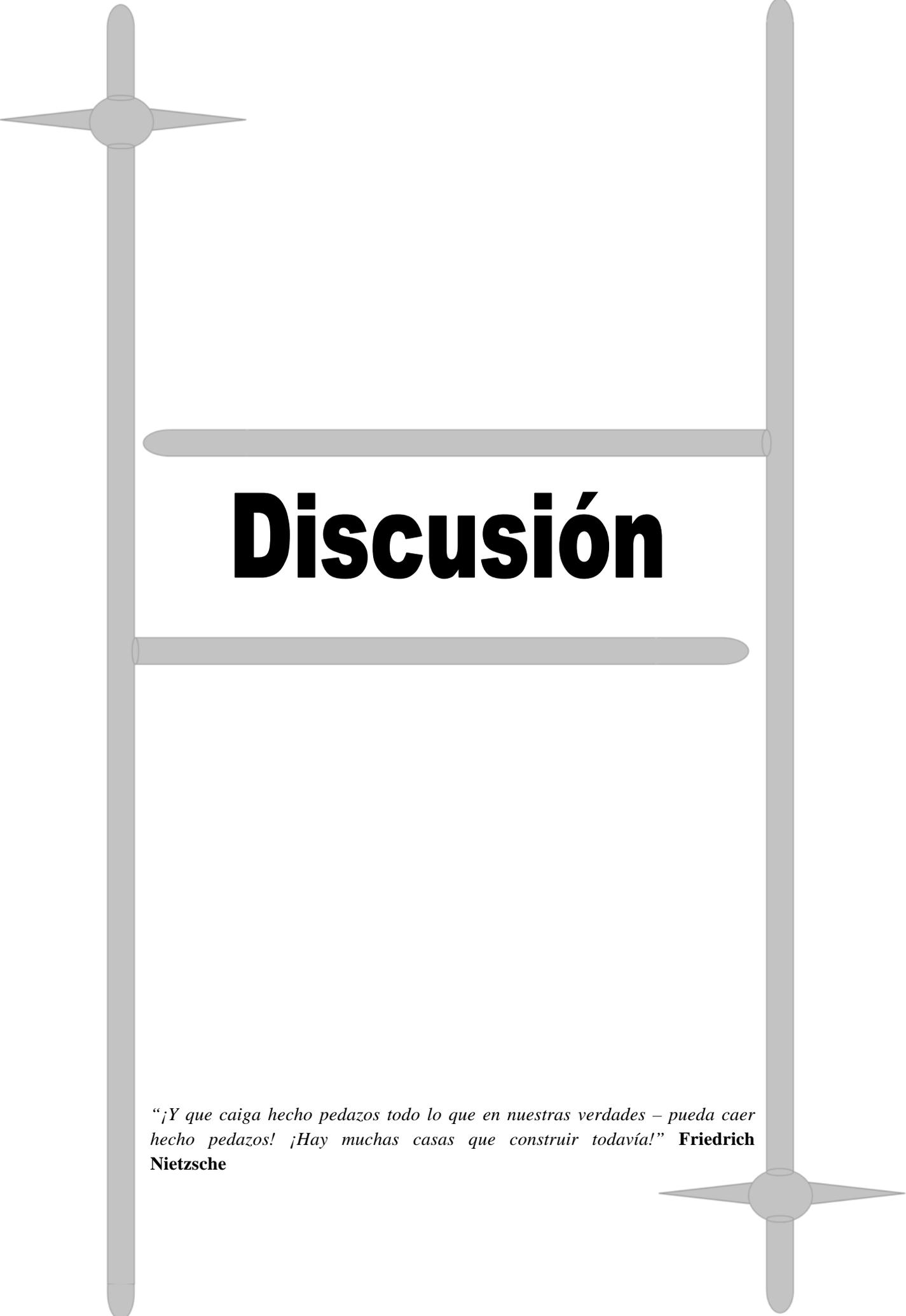


Figura 40. Incorporación de nucleobases en cepas defectivas en los diferentes transportadores. La incorporación de 20 μM de ^{14}C -adenina y 20 μM de ^{14}C -guanina al interior celular (15 minutos a 28°C) en las diferentes cepas se midió a partir del micelio recogido de 0,5 ml de cultivo. El micelio se lavó varias veces, se lisó por rotura mecánica. La concentración intracelular de cada nucleobase marcada se midió en un contador de centelleo líquido, expresándose en cuentas por minuto (CPM).



Discusión

“¡Y que caiga hecho pedazos todo lo que en nuestras verdades – pueda caer hecho pedazos! ¡Hay muchas casas que construir todavía!” **Friedrich Nietzsche**

I. RELEVANCIA DE LA PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA

Los desórdenes alimenticios que en la actualidad se están dando en mayor medida (como es el caso por defecto de la anorexia o la bulimia y por exceso de la vigorexia y la obesidad), el consumo de ciertos fármacos etc.; junto con el procesamiento de los alimentos que contribuye a la reducción del valor nutritivo de los mismos, han conducido a la necesidad de aporte extra de vitaminas, tanto por complejos vitamínicos como en alimentos enriquecidos y fortificados. Si a esto le añadimos los cambios acaecidos en el modelo de explotaciones pecuarias, aumento de la estabulación y una alimentación basada en piensos procesados; obtenemos las causas del incremento de la demanda de la síntesis de vitaminas. Una de estas vitaminas es la riboflavina, que además de las causas anteriormente citadas se emplea como fármaco en el tratamiento de enfermedades como en el caso del síndrome de Brown-Vialetto-Van Laere, y en el tratamiento quirúrgico del queratocono, viéndose su producción quintuplicada en las últimas tres décadas. La mejora de los procesos industriales fermentativos ha contribuido a que a día de hoy la producción biotecnológica represente un 90% del total y que la producción por parte del hongo filamentoso *A. gossypii* represente un 30% (Stahmann *et al.*, 2000; Kato y Park, 2012).

El conocimiento de todos aquellos procesos celulares que de forma directa o indirecta afecten a la síntesis de la vitamina es de gran interés industrial. En el transcurso de vida de *A. gossypii* distinguimos dos fases claramente delimitadas, una fase trófica en la cual predomina el crecimiento frente a la producción de riboflavina y una fase productiva en la que predomina la producción de la vitamina y se produce la senescencia y lisis del micelio. Para la biosíntesis de riboflavina se requiere el nucleótido GTP, sustrato a partir del cual se inicia la síntesis y que en *A. gossypii* limita la producción (Jiménez *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008). A nivel subcelular la síntesis de GTP se puede desarrollar a través de la ruta *de novo* o a través de las denominadas rutas de recuperación, encargadas de reciclar los nucleótidos, nucleósidos y nucleobases procedentes de la degradación de macromoléculas tales como los ácidos nucleicos. Los trabajos realizados en *A. gossypii* para potenciar la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purina, gen *AgADE4*, o por expresión constitutiva de todos los genes de la ruta, al eliminar el dominio regulador del factor transcripcional AgBas1p, el cual inhibe la transcripción en respuesta a la presencia de adenina, han permitido incrementar flujo de GTP hacia la producción de riboflavina (Jiménez *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2006). Esperando un comportamiento similar de las rutas de recuperación de purinas, y empleando un enfoque de ingeniería metabólica iniciamos la identificación y caracterización de los genes involucrados en *A. gossypii*, en el reciclaje de las nucleobases de purina, las cuales en conexión con la ruta *de novo*, permiten la formación de GTP, sustrato en la biosíntesis de riboflavina

II. LAS RUTAS DE RECUPERACIÓN DE NUCLEOBASES DE PURINA EN EL GRUPO DE LOS HEMIASCOMICETOS

En contraste a la ruta biosintética *de novo* de los ribonucleótidos de purina, altamente conservada y bien representada en los tres dominios de la vida, aunque la organización de los genes que codifican las enzimas de la ruta y su regulación varían (He *et al.*, 1990; Becerra y Lazcano, 1998), la capacidad de biosintetizar ribonucleótidos a través de las rutas de recuperación varía en los organismos estudiados, incluso en especies dentro del mismo género (Chaundhary *et al.*, 2004).

En el hongo hemiascomiceto *A. gossypii* hemos identificado y caracterizado los genes y las actividades enzimáticas que posee este organismo para sintetizar ribonucleótidos a través de las rutas de recuperación de nucleobases de purina. Partiendo de los conocimientos que ya existían sobre el funcionamiento de las rutas de recuperación en la levadura *S. cerevisiae* buscamos por homología de secuencia los genes del hongo que pudiesen codificar las actividades enzimáticas necesarias para la formación de ribonucleótidos desde nucleobases.

La secuencia del genoma de *A. gossypii* (Dietrich *et al.*, 2004) se ha conocido años más tarde de que se hiciese pública la secuencia del genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996). A pesar de las diferencias biológicas (morfología, crecimiento, reproducción sexual o contenido G+C), *A. gossypii* y *S. cerevisiae*, comparten el 95 % de los genes que codifican proteínas y el 90% de esos genes mapean en posiciones sinténicas, es decir, ocupan posiciones idénticas en los cromosomas en los que se localizan. Ambos organismos pertenecen al grupo de hemiascomicetos o “complejo *Saccharomyces*” (Fitzpatrick *et al.*, 2006; Scannell *et al.*, 2007). El grupo incluye organismos micólicos o levaduriformes que se caracterizan por tener un ciclo de vida simplificado, no formar ascocarpos y poseer genomas sinténicos.

En base a la relación de sintenias, dentro de los organismos hemiascomicetos, se diferencian dos grupos. El grupo post-WGD (post-whole-genome duplication) que deriva de un ancestro en el que tuvo lugar, primero, duplicación del genoma completo y, después, pérdida recíproca de los genes duplicados, poseyendo las especies que pertenecen a este grupo un número elevado de genes duplicados como *S. cerevisiae*, con más de 490 ORFs en las que aún pueden verse patrones de sintenia doble (Dietrich *et al.*, 2004). El otro grupo, pre-WGD, al que pertenece *A. gossypii*, se caracteriza por no presentar sintenia doble al haber divergido del ancestro antes de que tuviese lugar la duplicación genómica (Figura 44).

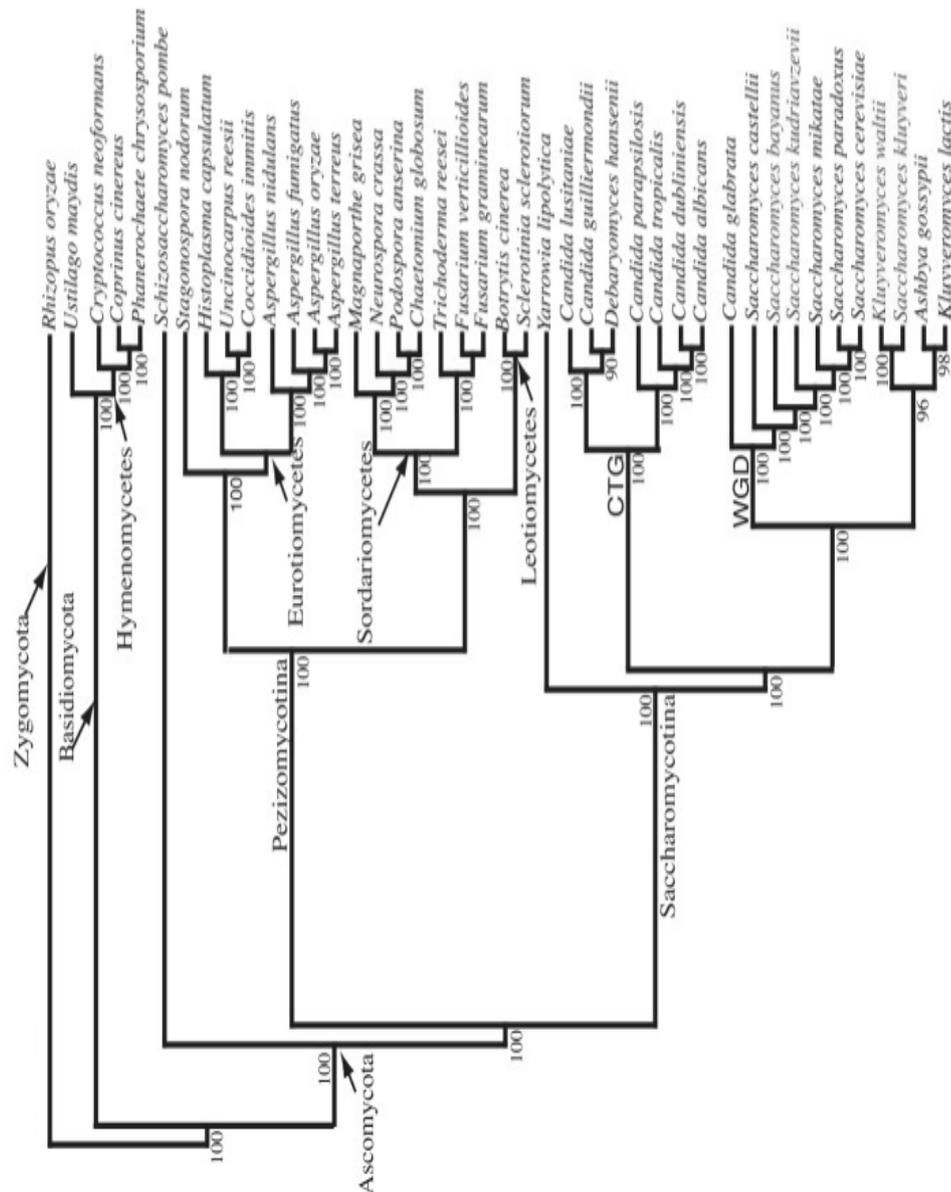


Figura 44. Árbol filogenético de los ascomicetos. WGD, duplicación del genoma completo. CTG, variación en el uso de codones que determinan serina en lugar de leucina. Adaptado de Fitzpatrick *et al.*, 2006.

La disponibilidad de secuencias genómicas pertenecientes a los grupos de hemiascomicetos (Byrne y Wolfe, 2005) nos permitió no sólo buscar los genes de las rutas de recuperación en el genoma de *A. gossypii* sino que también lo hicimos en el genoma de cinco organismos más del grupo post-WGD (*Vanderwaltozyma polyspora*, *Naumovozyma castelli*, *Kazachstania naganishii*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces bayanus* var. *Uvarum* y *S. cerevisiae*) y de otros cinco organismos pertenecientes al grupo pre-WGD este grupo (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluiveromyces lactis*, *Eremothecium cymbalariae*, *A. gossypii* o *Eremothecium gossypii* y *Lachancea thermotolerans*). Encontramos que de los 10 genes que buscamos, sólo cinco están presentes en los 12 genomas analizados. Por un lado, los genes *APT1*, *ADO1*, *AMD1*,

implicados en la reutilización de derivados adenílicos, adenina, adenosina y desaminación del AMP, respectivamente; y por otro lado los genes *ISNI* y *PNPI*, implicadas de la degradación de derivados guanílicos, IMP a inosina, el gen *ISNI*, y guanosina e inosina a sus respectivas nucleobases, gen *PNPI*.

El gen *XPTI* responsable de la reutilización de xantina está ausente en tres miembros *V. polyspora*, *Z. rouxii* y *T. delbrueckii*, que pertenecen tanto al grupo post-WGD, el primero de ellos, como al grupo pre-WGD, *Z. rouxii* y *T. delbrueckii*.

Tres genes están ausentes en el genoma de los representantes del género *Eremothecium*, diferenciándolos de los restantes hemiascomicetos. Son los genes *HPTI*, *AAHI* y *GUDI* responsables de la reutilización de hipoxantina y guanina, gen *HPTI*, y de las desaminaciones de adenina, gen *AAHI*, y de guanina, gen *GUDI*.

En la búsqueda por complementación de genes de *A. gossypii* que complementasen la actividad adenina desaminasa, codificada por el gen *ScAAHI* (Deeley, 1992), no encontramos ninguna secuencia que complementara la mutación *ScΔaah1*, lo cual nos confirma la ausencia de un gen ortólogo en *A. gossypii* para la actividad adenina desaminasa. Además, los ensayos de esta actividad realizados en el hongo fueron infructuosos, no detectándose la conversión de adenina en hipoxantina. Los mismos resultados obtuvimos para el gen *ScGUDI*, responsable de la actividad guanina desaminasa (Saint-Marc y Daignan-Fornier, 2004). Así, tanto los ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae* como los ensayos de actividad enzimática, corroboran tanto la ausencia de un gen ortólogo en *A. gossypii* para los genes *AAHI* y *GUDI* así como la inexistencia de estas actividades en el hongo.

La ausencia en *Eremothecium* (*E. cimbalaria* y *A. gossypii*) del gen *HPTI*, nos diferencia este taxón no sólo de los otros hemiascomicetos, sino también de los animales y plantas estudiados hasta el momento. El gen ortólogo en todos ellos codifica una enzima con actividad HGPRT, acepta como sustratos tanto hipoxantina como guanina, pero no xantina (Nussbaum y Caskey, 1981; Ikeda *et al.*, 1986; Keebaugh *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007).

En *A. gossypii*, la actividad HGPRT está asociada al gen *AgXPTI*, asumiendo este gen las funciones que en los otros hemiascomicetos recaen en dos genes, el gen *HPTI* y el gen *XPTI*. De hecho, el gen *AgXPTI* rescata el fenotipo silvestre en los mutantes *ScΔxpt1* y *ScΔhpt1*. La enzima AgXpt1p tiene la triple actividad HGXPRT, al ser capaz de fosforribosilar las nucleobases hipoxantina, guanina y xantina, como se comprobó en los ensayos enzimáticos realizados en *A. gossypii*, si bien AgXpt1p fosforribosila con mayor eficiencia hipoxantina y guanina que xantina (actividad específica HPRT, GPRT y XPTR, 2,2 U; 2,3 U y 1,2 U, respectivamente). También la enzima ScXpt1p de *S. cerevisiae*, en un pequeño ratio, es capaz de utilizar hipoxantina, aunque no guanina (Guetsova *et al.*, 1999). A pesar de que a nivel de secuencia la proteína AgXpt1p de *A. gossypii* está más

relacionada con los hemiascomicetos, funcionalmente es más similar a la descrita para algunos protozoos parásitos (Chaudhary *et al.*, 2004; Downie *et al.*, 2008).

Otra de las diferencias a nivel génico entre *A. gossypii* y el hemiascomiceto *S. cerevisiae* es la presencia de una única copia del gen que codifica la actividad IMP deshidrogenasa (IMPDH) necesaria para la síntesis de GMP tanto desde la ruta *de novo* como desde la ruta de recuperación de la nucleobase adenina. *S. cerevisiae* es el único miembro del grupo de hemiascomicetos que posee cuatro copias génicas para la actividad IMPDH, genes *ScIMD1* a *ScIMD4*, (Escobar-Henriques y Daignan-Fornier, 2001), si bien, el gen *ScIMD1* se comporta como un pseudogen, pues no se detecta expresión ni a nivel de transcripción ni a nivel de actividad enzimática (Hyle *et al.*, 2003). De los otros tres genes, *ScIMD3* y *ScIMD4* son similares a nivel funcional, contribuyendo en igual medida a la actividad celular IMPDH (Hyle *et al.*, 2003). El gen *ScIMD2* tiene propiedades únicas, ya que es el gen responsable de conferir resistencia al ácido micofenólico (MPA) y aunque MPA determina la bajada drástica del pool celular de GTP (Allison y Eugui, 1993) el sistema inusual de regulación transcripcional del gen permite generar suficiente actividad IMPDH para neutralizar los efectos del MPA (Hyle *et al.*, 2003). Varios estudios sugieren que es la maquinaria de transcripción del gen la que causa la bajada de GTP, provocando un cambio en el sitio de inicio de la transcripción y permitiendo así la síntesis de transcritos funcionales (Davis y Ares, 2006; Steinmetz *et al.*, 2006). Mientras que cuando hay GTP en la célula la transcripción se inicia en otras posiciones, generando ARNs inestables no codificantes (CUTs, Cryptic Unstable Transcripts) (Steinmetz *et al.*, 2006; Kuehner y Brow, 2008). Así, la ausencia de un ortólogo *IMD2* en *A. gossypii* junto con la presencia una única copia génica (*AgIMD3*) determina para este hongo y posiblemente para el resto de los hemiascomicetos una hipersensibilidad a MPA como puede verse en la figura 42. Además, la comparación de los genomas de todos los hemiascomicetos sugiere que *IMD4* se generó tras el proceso de la duplicación genómica, permaneciendo en la actualidad en el grupo post-WGD bien la copia ancestral *IMD3* (*V. polyspora*) o bien la copia duplicada *IMD4* (*C. glabrata* y *N. Castelli*), siendo exclusiva de los organismos pre-WGD la copia *IMD3* como sucede en *A. gossypii* (Byrne y Wolfe, 2005). Por tanto, las copias *ScIMD1* y *ScIMD2* sería genes parálogos que habrían surgido por duplicación génica bien de *IMD3* o bien de *IMD4*, habiéndose divergido después, uno perdiendo su función para dar lugar a la copia actual *ScIMD1* y el otro especializándose en la función sensora y de respuesta a las bajadas de GTP en la célula.

En relación a la capacidad de *A. gossypii* de reutilizar derivados adenílicos, mediante la actividad APRT y adenosina quinasa, no difiere de la descrita para otros hemiascomicetos. Si bien, hay que destacar que tanto la proteína AgApt1p como la proteína AgXpt1p llevan asociado cierto grado de promiscuidad, ya que ambas enzimas son capaces de usar nucleobases alternativas, AgApt1p es capaz de fosforribosilar hipoxantina, xantina y guanina y AgXpt1 fosforribosila adenina (Ver Figura 22). Este comportamiento puede ser un ejemplo más de que las reacciones metabólicas son

imprecisas y que las enzimas participantes no son totalmente específicas y los intermediarios y productos finales pueden sufrir reacciones paralelas (Tawfik, 2010).

A. gossypii, y por extrapolación el género *Eremothecium*, presenta un sistema de recuperación de purinas mucho más simplificado que el resto de los hemiascomicetos, y que otros eucariotas estudiados a excepción de los protozoos apicomplejos. Siendo sólo dos proteínas, AgApt1p y AgXpt1p, las responsables del reciclaje de las nucleobases, adenina en el primer caso, y guanina, hipoxantina y xantina el segundo (Figura 45).

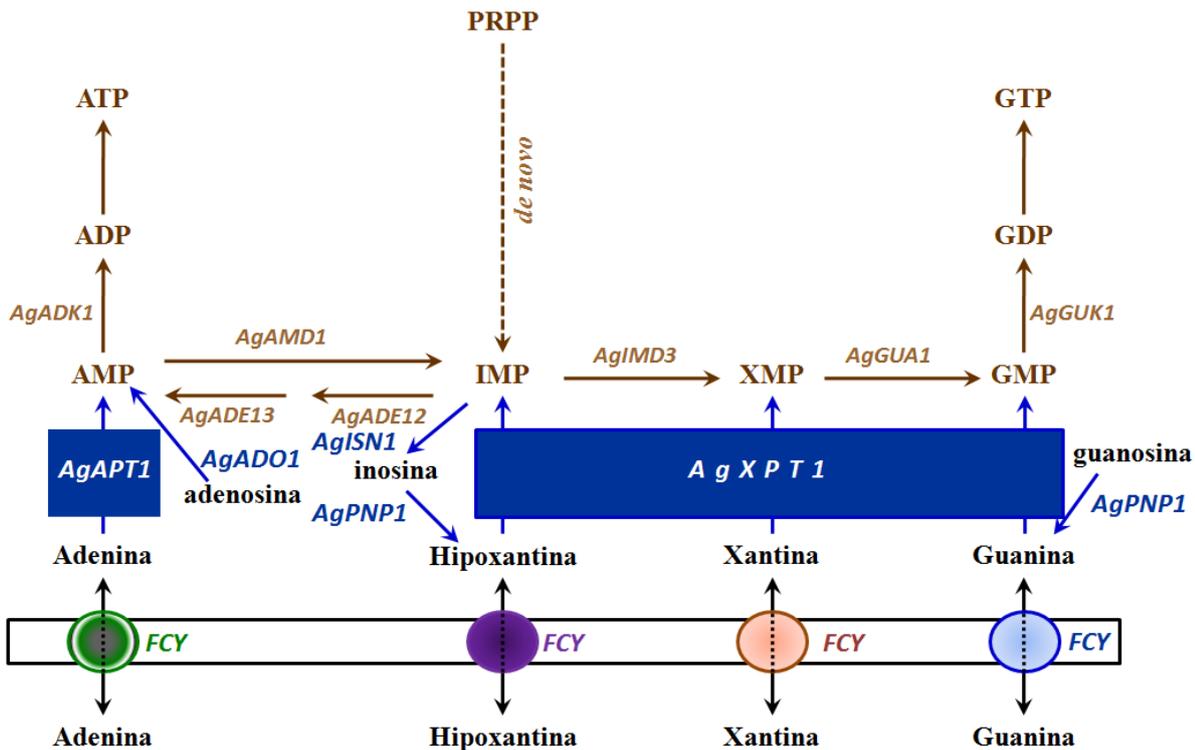


Figura 45. Las rutas de recuperación de los nucleobases de purina en *A. gossypii*. Se representan en azul los genes implicados en las rutas de recuperación: *AgAPT1*, codifica la actividad APRT; *AgXPT1*, actividad HGXPRT; *AgADO1*, quinasa de adenosina; *AgISN1*, nucleotidasa específica de IMP; *AgPNP1*, fosforilasa de nucleótidos de purina. En color marrón se representan los genes de la ruta *de novo*: *AgADE12*, sintetasa de adenilsuccinato; *AgADE13*, liasa de adenilsuccinato; *AgADK1*, quinasa de AMP; *AgAMD1*, desaminasa de AMP; *AgIMD3*, deshidrogenasa IMP; *AgGUA1*, sintetasa de GMP; *AgGUK1*, quinasa de GMP. En círculos los potenciales transportadores Fcy.

Esta simplificación de las rutas de recuperación que ocurre en el género *Eremothecium* puede deberse a la adaptación a la vida fitoparasitaria obligada. Puesto que, a diferencia de otros hemiascomicetos, de vida saprofita o parásitos oportunistas, *E. cimbalaria* y *A. gossypii*, hasta la fecha, sólo se ha comunicado su aislamiento de plantas infectadas (Batra, 1973). La adaptación a la vida parásita suele conllevar una pérdida de genes. La toma de sustancias de reserva del hospedador hace innecesaria la existencia de un sistema de síntesis de las mismas en el parásito así como de mecanismos de respuesta

al ambiente (Pombert *et al.*, 2012). Esto, en adición a la falta de sistemas de infección propios explicaría por qué *A. gossypii* tiene uno de los genomas eucariotas más pequeño.

A. gossypii posee el genoma más pequeño de todos los organismos eucariotas de vida libre conocidos hasta la actualidad. Con sólo 9,2 millones de pares de bases, posee 4718 genes que codifican proteínas, 199 genes de ARNt, al menos 49 genes de ARN nuclear de pequeño tamaño (ARNsn) y tiene 40 copias de genes ARNr. El genoma carece de transposones y está extremadamente compactado, con una distancia media entre marcos abiertos de lectura de sólo 341 pb, determinando un tamaño promedio de gen de 1,9 kb, claramente menor que el tamaño promedio de otros hongos (2 kb *E. cymbalariae* (Wendland y Walther 2011), 2,1 kb en *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996), 2,5 kb en *S. pombe* (Wood *et al.*, 2002), y 3,7 kb en *Neurospora crassa* (Galagan *et al.*, 2003).

Los ejemplares tipo de *A. gossypii* se aislaron de cítricos tropicales, asclepiadáceas y principalmente en cápsulas de semillas de algodón. La cepa parental de la cepa silvestre empleada en nuestro laboratorio corresponde a un aislado de algodón. Atendiendo a este biotopo podemos referirnos a que un predominio de la nucleobase xantina, pudo producir una preponderancia de la proteína AgXpt1p, siendo, por tanto, viable la pérdida del gen *AgHPT1* sin que hubiese disminución de la eficacia biológica, permitiendo así que la pérdida perdure hasta la actualidad. Posteriormente, la presencia de una única proteína combinada con oscilaciones temporales de disponibilidad de las tres nucleobases habría favorecido cambios que permitiesen a la proteína adaptarse al empleo de los tres sustratos, teniendo en cuenta que ya la enzima ScXpt1p es capaz de emplear hipoxantina. Al tener la capacidad de emplear la enzima AgXpt1 xantina, hipoxantina, y guanina, la pérdida de la actividad guanina desaminasa, que convierte guanina en xantina (gen *GUDI*) no tendría una mayor impronta. Incluso la pérdida de este gen pudo suponer un incremento de la eficiencia biológica, al reducirse el gasto energético y de material necesario para su expresión. Sin embargo, de este modo no se puede explicar la pérdida de la actividad adenina desaminasa. Ya que si se dan mutaciones en el gen *APT1*, se pierde la capacidad de reciclar la nucleobase adenina, aunque el parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*) carece de esa capacidad y por el contrario posee un eficiente sistema para la absorción e incorporación al metabolismo del nucleósido adenosina (Downie *et al.*, 2008). Como hemos visto en resultados (Figura 28), *A. gossypii* es capaz de usar todos los derivados adenílicos para crecer. No es así en *S. cerevisiae* que sólo crece eficientemente con adenina, por lo que la falta de la actividad adenina desaminasa en *A. gossypii* pueda estar compensado con la capacidad de poder emplear todos los derivados de la base, ya sea el nucleósido o los nucleótidos.

Aunque se han encontrado diferencias entre los genes implicados en las rutas de recuperación de *A. gossypii* y el resto de los organismos hemiascomicetos, esas diferencias no permiten explicar el significado biológico de la sobreproducción de riboflavina por parte de *A. gossypii*, ya que *E. cymbalariae* tiene un sistema similar y no sobreproduce vitamina (Wendland y Walther, 2011). Si bien, el hecho de compartir los

mismos genes no implicaría que el funcionamiento las rutas fuese el mismo. Cuando atendemos a la ecología de ambos organismos vemos que una de las mayores diferencias es la capacidad de *A. gossypii* de crecer por sí mismo en el algodón cosa que no ocurre con *E. cymbalariae* que siempre se ha aislado junto con otros organismos y no en solitario (Batra, 1973).

La sobreproducción de riboflavina en *A. gossypii* se ha relacionado con mecanismos de detoxificación y de defensa a radiaciones (Stahmann *et al.*, 2001), pero también podría servir para contrarrestar el efecto tóxico del gossipol. Recientemente se ha comunicado que las plantas producen mayores cantidades el gossipol cuando son atacadas por insectos y se ven afectadas por infecciones fúngicas (Arinbasarova *et al.*, 2012). El gossipol es un aldehído triterpenoide, con propiedades antifúngicas, bacteriostáticas e insecticida que actúa alterando la cadena transportadora de electrones, y aumentando la formación de radicales libres (Zhang *et al.*, 2011; Arinbasarova *et al.*, 2012). Una mayor concentración de riboflavina protegería a las células de los radicales libres generados por el gossipol y también renovarían parte de los elementos de la cadena transportadora de electrones dañados, reduciendo, por tanto, los efectos nocivos del gossipol en el hongo. Desde luego, será interesante valorar el comportamiento del hongo al gossipol tanto para determinar el hipotético efecto del gossipol en la producción de riboflavina así como profundizar en las capacidades antioxidantes de la riboflavina.

III. EL TRANSPORTE DE NUCLEOBASES EN *A. GOSSYPII* FRENTE A *S. CEREVISIAE*

Supone un riesgo para los hongos tanto la no asimilación de las nucleobases de purina como la toma descontrolada de las mismas que conlleva un incremento de la concentración intracelular que puede ser tóxico o mutagénico para las células (Vlanti y Dillianas, 2008). Para controlar el flujo bidireccional de las nucleobases entre espacio extracelular y el intracelular existe una gran diversidad de transportadores, agrupados en diferentes familias. Además, existen varios mecanismos para la regulación de la expresión de estos transportadores según las condiciones nutricionales del organismo dependientes del medio donde se desarrolla, así como, por ejemplo, la concentración de pequeñas cantidades de nucleobases en el medio supone un incremento de la expresión de los genes cuyos productos son los responsables de mediar la entrada de las respectivas nucleobases; por el contrario la presencia de concentraciones altas de las nucleobases conllevan la endocitosis de los transportadores, reduciendo por tanto la entrada de la nucleobases en la célula (Vlanti y Dillianas, 2008).

En este trabajo, debido a la implicación que tienen las nucleobases en la síntesis de GTP y consecuentemente en la producción de riboflavina, se han buscado las permeasas responsables del transporte. Se han identificado tres genes, dos de ellos con homólogos en

S. cerevisiae, genes *AgFCY2*, *AgFUN26* y un gen sin homólogo en la levadura, gen *AFR622W*.

La proteína AgFcy2p pertenece a la familia de simportadores de Nucleobase Cación 1 (NCS1/PRT), exclusivo de procariotas, hongos y plantas (Pantazopoulou y Diallinas, 2007). Como sus homólogos en otros organismos ScFcy2p de *S. cerevisiae*, CaFcy2p de *C. albicans* y AnFcyBp *A. nidullans*, entre otros, es el principal transportador de citosina, resultado que se infiere al deletar el gen *AgFCY2*, obteniendo una cepa resistente al análogo tóxico de la citosina, fluorocitosina. Si bien, a diferencia de estos organismos, *A. gossypii* demuestra una resistencia natural a fluorocitosina; las concentraciones empleadas de 0,02 mg/ml reducen el crecimiento micelial pero no lo inhiben completamente. Con respecto al transporte de nucleobases estudios realizados en el laboratorio mostraron que la ausencia única de este gen en principio no tiene efecto destacado en el transporte de purinas en ambos organismos, puesto que cepas auxotróficas para las nucleobases presentan crecimiento en presencia de las nucleobases teniendo inactivada la permeasa Fcy2p. Un comportamiento similar observamos cuando sometemos al hongo a la acción de análogos de las purinas como la 8-azaadenina y la 8-azaguanina donde el crecimiento se ve inhibido tanto en presencia como en ausencia de Fcy2p. Demostrando que Fcy2p no es el único transportador implicado en el transporte de las nucleobases. Fenotipo similar, con respecto a la asimilación de nucleobases de purinas, presentan los otros dos transportadores identificados AgFun26p y AgAfr622wp, pareciéndose por tanto al sistema de captación de purinas de otros organismos como en el caso de ser humano y de *Aspergillus* donde varios son los transportadores implicados en la asimilación de las nucleobases (Vlanti y Diallinas, 2008; Rose y Coe, 2008) y difiriendo con lo caracterizado para *S. cerevisiae* para el cual se ha indicado que ScFcy2p es el principal responsable del transporte de purinas (Weber *et al.*, 1990).

Los análisis realizados tanto sobre las cepas deletantes simples de estos genes (*AgFCY2*, *AgFUN26* y *AgAFR622W*) como las dobles deletantes, por crecimiento en medio mínimo en presencia y ausencia de nucleobases y la entrada de nucleobases marcadas radiactivamente, sugieren que el comportamiento de estos transportadores es similar entre ellos, y que intervienen tanto en la entrada como en la salida de las nucleobases en las células. Esta bivalencia es similar a la que presentan los transportadores equilibrativos de nucleósidos (familia ENT) distribuidos en eucariotas pero ausente en procariotas, parte de estos transportadores intervienen en el transporte de nucleobases de purina con diferente afinidad (Yao *et al.*, 2002). Se han caracterizado que la expresión del gen *ENT2* humano en mutantes de *S. cerevisiae* defectivos en el gen *ScFCY2* rescata el fenotipo de transporte de las nucleobases adenina, guanina, xantina e hipoxantina (Endo *et al.*, 2007).

El transportador AgFun26p es el miembro de la familia ENT presente en *A. gossypii*, pero los datos obtenidos sugieren diferencias con respecto a su homólogo en *S. cerevisiae*. Mientras que la permeasa de *S. cerevisiae* esta descrita como que media el

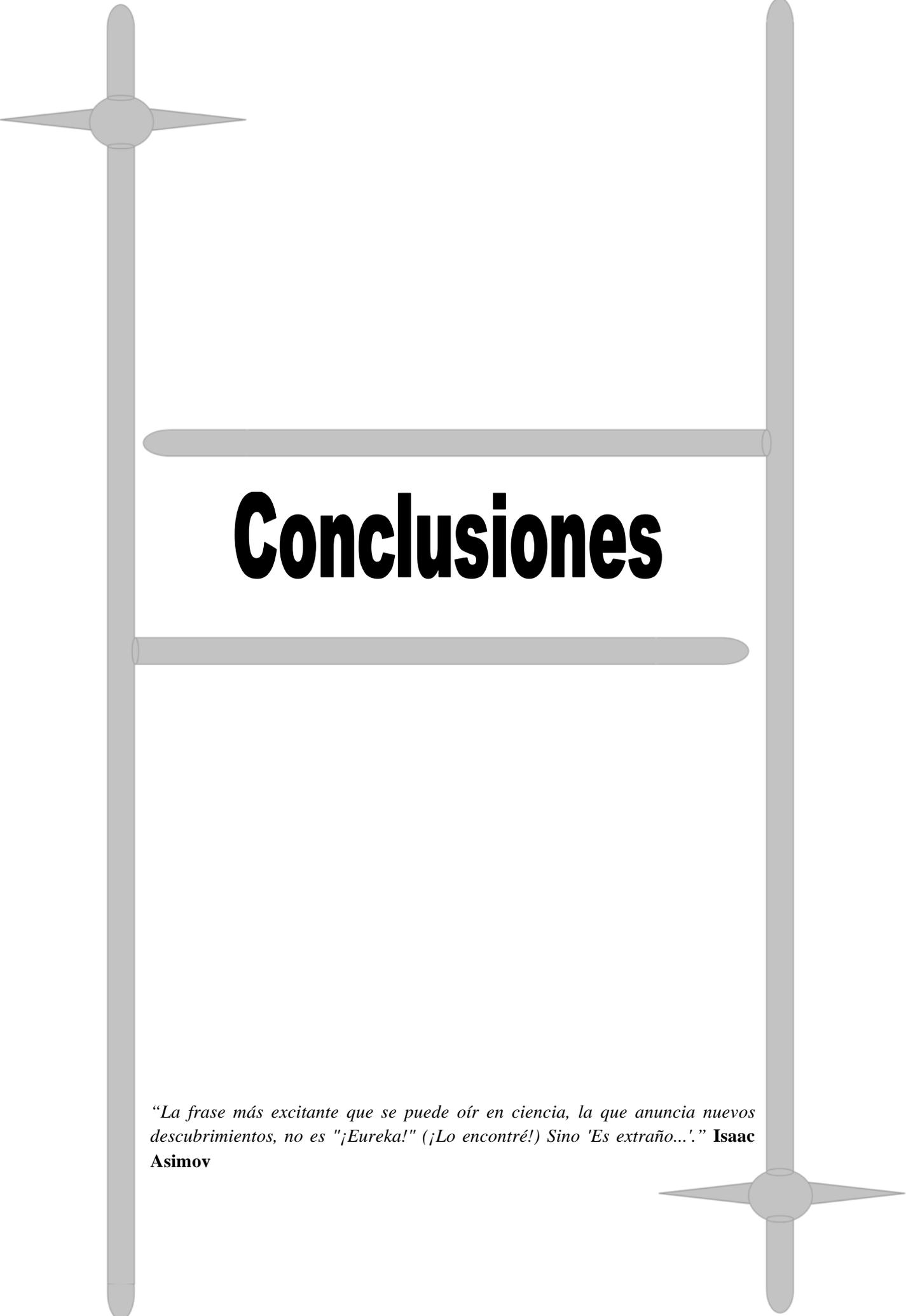
transporte de nucleósidos a través de las membranas intracelulares principalmente (Vickers *et al.*, 2000), nosotros observamos como la delección conjunta de *AgFUN26* y *AgFCY2* reduce la entrada a la célula tanto de adenina como de guanina, por lo tanto, este transportador AgFun26p interviene en la asimilación de al menos las nucleobases de purina adenina y guanina, y a su vez, sin excluir su presencia en el sistema endomembranoso, debe estar presente en las membranas de la superficie celular; de manera similar a como se comportan las permeasas Ent1p y Ent2p en humanos (Yao *et al.*, 2002; Endo *et al.*, 2007).

Todo ello sugiere que los transportadores identificados AgFcy2, AgFun26 y Afr622wp median tanto el influjo como eflujo de purinas en las células. La ausencia de uno de estos transportadores desregula el eflujo de purinas, reteniéndolas en el interior celular y provocando reducción en el crecimiento del micelio. La ausencia combinada de dos de estos transportadores supone un descenso del influjo de nucleobases al interior celular. No queda descartada la posibilidad de existencia de otros transportadores involucrados. Siendo necesarios estudios posteriores que den luz a los resultados ya obtenidos.

Durante el análisis del transporte en *A. gossypii* y su comparación con *S. cerevisiae* observamos que las cepas de *S. cerevisiae* empleadas en el laboratorio presentaban resistencia a los análogos genotóxicos de las nucleobases 8-azaadenina y 8-azaguanina, en contra de lo descrito en la bibliografía (Guetsova *et al.*, 1997).

Esta resistencia parece ser inherente a la levadura, puesto que en el análisis de ejemplares aislados en diversas levaduras panaderas (procedentes del laboratorio de la Dra M Tamame, Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) CSIC/USAL Salamanca), también la muestran.

Datos presentados en el Trabajo de Máster de Soledad Vega 2012, junto con el trabajo realizado actualmente sugieren que la resistencia de la levadura a 8-azaadenina se debe a una baja actividad APRT, puesto que la sobreexpresión del gen *ScAPRT1* en *S. cerevisiae* conlleva la pérdida de resistencia al genotóxico.

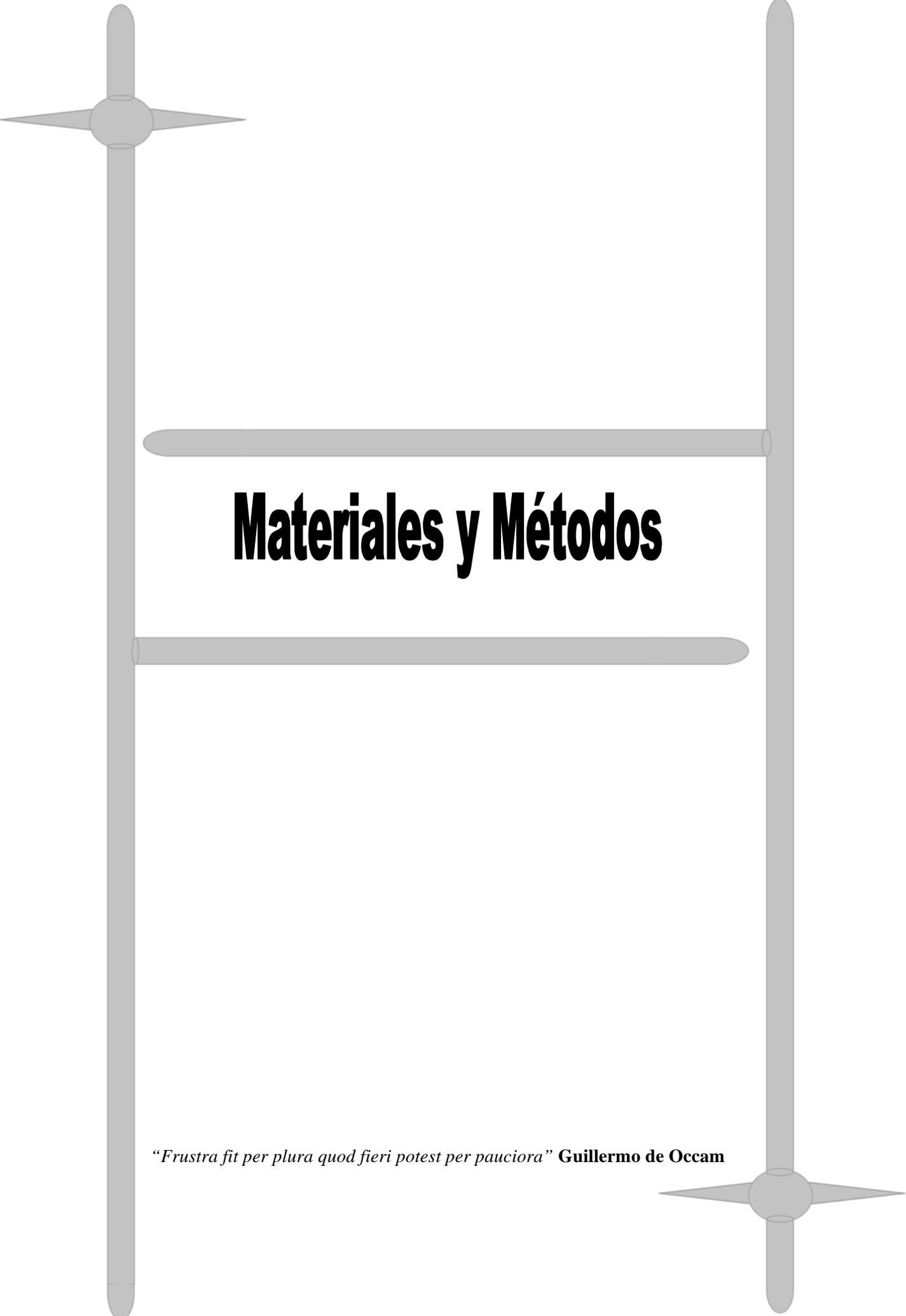


Conclusiones

“La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es “¡Eureka!” (¡Lo encontré!) Sino ‘Es extraño...!’” **Isaac Asimov**

Los resultados obtenidos en el trabajo realizado nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1^a El genoma de *A. gossypii* contiene los genes *AgAPT1*, *AgAMD1*, *AgXPT1*, y *AgFCY2*, y carece de los genes homólogos a los genes *AAH1*, *HPT1* y *GUD1* presentes en el genoma de *S. cerevisiae* y otros especies de hemiascomicetos.
- 2^a El gen *AgAPT1* codifica la actividad adenina fosforribosiltransferasa en *A. gossypii*.
- 3^a El gen *AgXPT1* es responsable de la actividad hipoxantina-xantina-guanina fosforribosiltransferasa en *A. gossypii*.
- 4^a La inactivación del gen *AgAPT1* conlleva la excreción de derivados adenílicos que permiten el crecimiento de cepas auxotróficas para adenina de *S. cerevisiae*.
- 5^a La cepa de *A. gossypii* que tiene inactivado el gen *AgXPT1* excreta al medio derivados guanílicos que permiten el crecimiento de una cepa de *S. cerevisiae* auxotrófica para guanina.
- 6^a La adicción de las nucleobases adenina y guanina ejerce un efecto negativo en el crecimiento de *A. gossypii*. Teniendo mayor influencia la presencia de adenina; lo cual se debe a la inhibición que ejerce sobre la síntesis de nucleótidos de purina.
- 7^a Los genes *AgFCY2*, *AFR622W* y *AgFUN26* de *A. gossypii* intervienen en el transporte de nucleobases de purina pero sin tener especificidad.



Materiales y Métodos

“Frustra fit per plura quod fieri potest per pauciora” **Guillermo de Occam**

I. MATERIAL BIOLÓGICO

I.1. CEPAS DE *E. COLI*.

En la Tabla 11 se recogen las distintas cepas empleadas.

Cepa	genotipo	procedencia
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169 (F80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan, 1983
DY331	<i>W3110 D lacU169 srl :: Tn10 D recA gal490 l cI857 D (cro-bioA)</i>	Yu <i>et al.</i> , 2000.

I.2. CEPAS DE *S. CEREVISIAE*.

Las cepas de la levadura *S. cerevisiae* empleadas se describen en la Tabla 12.

cepa	genotipo	procedencia
BY4742	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0</i>	J. Boeke
Y14244	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, ade8::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y-824	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, ade8::kanMX4 aah1::ura3⁺</i>	Este trabajo
Y-825	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, ade8::kanMX4 apt1::his3⁺</i>	Este trabajo
Y-826	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, ade8::kanMX4 apt1::his3⁺ aah1::ura3⁺</i>	Este trabajo
Y-831	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, ade8::kanMX4 amd1::his3⁺</i>	Este trabajo
Y-832	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, ade8::kanMX4 amd1::his3⁺ aah1::ura3⁺</i>	Este trabajo
Y-853	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, ade8::kanMX4 apt1::his3⁺ amd1::his3⁺</i>	Este trabajo
Y-952	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, fcy2::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y-1181	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, imd2::ura3⁺</i>	Este trabajo
Y-1182	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, imd2::ura3⁺ hpt1::his3⁺</i>	Este trabajo
Y-1183	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, imd2::ura3⁺ xpt1::kanMX4</i>	Este trabajo
Y-1184	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, imd2::ura3⁺ xpt1::kanMX4 hpt1::his3⁺</i>	Este trabajo
Y-1188	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, imd2::ura3⁺ gud1::leu2⁺</i>	Este trabajo
Y-1189	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, imd2::ura3⁺ xpt1::kanMX4 gud1::leu2⁺</i>	Este trabajo
Y-1190	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, imd2::ura3⁺ xpt1::kanMX4 hpt1::his3⁺ gud1::leu2⁺</i>	Este trabajo
Y-1195	<i>MAT a, gen3-101 gen3-101 his1-29 ino1 ura3-52, leu2::his6 (HIS4::lacZ ura3-52) gual::his6</i>	Dra M. Tamame
Y-1234	<i>MATa, his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0, AFR622</i>	Este trabajo
Y-1290	<i>MATa his3-D1, leu2- D0, lys2- D0, ura3- D0, fcy2::kanMX4 imd2::ura3⁺</i>	Este trabajo

I.3. CEPAS DE *A. GOSSYPHII*.

La Tabla 13 muestra las cepas de *A. gossypii* utilizadas con su genotipo y procedencia.

Tabla 13: cepas de <i>A. gossypii</i>			
Cepa	genotipo	equivalente en <i>S. cerevisiae</i> .	procedencia
A4	silvestre		ATCC 10895
A30	<i>Aer250w::G418^R</i>	Δ <i>gual</i>	Gutiérrez, 2005
A31	<i>agl334w::G418^R</i>	Δ <i>ade4</i>	Jiménez <i>et al.</i> , 2005
A55	<i>agl334w::GPD-ADE4^{v,k,w}</i>	<i>GPD-ADE4^{v,k,w}</i> (V 310 Q, K 333 V, A 417 W)	Jiménez <i>et al.</i> , 2005
A77	<i>afr297w::G418^R</i>	Δ <i>bas1</i>	Mateos <i>et al.</i> , 2006
A78	<i>bird::G418^R</i>	Δ <i>birdBAS1</i>	Mateos <i>et al.</i> , 2006
A117	<i>afl202c::G418^R</i>	Δ <i>bas2</i>	Mateos <i>et al.</i> , 2006
A144	<i>afl202c::HYG^R</i>	Δ <i>bas2</i>	Este trabajo
A146	<i>adl074w::G418^R</i>	Δ <i>fcy2</i>	Este trabajo
A153	<i>adl074w::HYG^R</i> <i>agl334w::G418^R</i>	Δ <i>fcy2</i> Δ <i>ade4</i>	Este trabajo
A166	<i>abl070c::G418^R</i>	Δ <i>xpt1</i>	Este trabajo
A167	<i>aer325w::G418^R</i>	Δ <i>apt1</i>	Este trabajo
A168	<i>abr204w::G418^R</i>	Δ <i>amd1</i>	Este trabajo
A220	<i>ABL070c-Ha-G418^R</i>	<i>XPT1-Ha</i>	Este trabajo
A223	<i>ABL070c-GFP-G418^R</i>	<i>XPT1-GFP</i>	Este trabajo
A226	<i>AER325w-GFP-G418^R</i>	<i>APT1-GFP</i>	Este trabajo
A227	<i>AER325w-Ha-G418^R</i>	<i>APT1-Ha</i>	Este trabajo
A254	<i>abl070c::G418^R</i> <i>aer325w::HYG^R</i>	Δ <i>xpt1</i> Δ <i>apt1</i>	Este trabajo
A255	<i>abl070c::G418^R</i> <i>aer325w::HYG^R</i>	Δ <i>xpt1</i> Δ <i>apt1</i>	Este trabajo
A271	<i>acr289w::G418^R</i>	Δ <i>fun26</i>	Este trabajo
A288	<i>afr622w::G418^R</i>	<i>permeasa de úrico?</i>	Este trabajo
A294	<i>adl074w::HYG^R</i>	Δ <i>fcy2</i>	Este trabajo
A295	<i>adl074w::HYG^R</i> <i>afr622w::G418^R</i>	Δ <i>fcy2</i> <i>permeasa de úrico?</i>	Este trabajo
A302	<i>adl074w::HYG^R</i> <i>afr297w::G418^R</i>	Δ <i>fcy2</i> Δ <i>bas1</i>	Este trabajo
A303	<i>adl074w::HYG^R</i> <i>acr289w::G418^R</i>	Δ <i>fcy2</i> Δ <i>fun26</i>	Este trabajo
A309	<i>abl070c::HYG^R</i>	Δ <i>xpt1</i>	Este trabajo
A310	<i>abl070c::HYG^R</i> <i>bird::G418^R</i>	Δ <i>xpt1</i> Δ <i>birdBAS1</i>	Este trabajo
A311	<i>abl070c::HYG^R</i> <i>agl334w::GAPp-</i> <i>AGL344w^{v,k,w}</i>	Δ <i>xpt1</i> sobreexpresión <i>ADE4</i>	Este trabajo

A312	<i>aer325w::HYG^R bird::G418^R</i>	$\Delta apt1 \Delta birdBAS1$	Este trabajo
A313	<i>aer325w::HYG^R agl334w::GAPp- AGL344w^{V.K.W}</i>	$\Delta apt1$ sobreexpresión ADE4	Este trabajo
A331	<i>aer325w::HYG^R</i>	$\Delta apt1$	Este trabajo
A339	<i>GFP-AER325w pZCAL+G418^R</i>	Plásmido con <i>GFP-APT1</i>	Este trabajo
A352	<i>aer325w::HYG^R pZCAL+G418^R</i>	<i>AER325w</i> Plásmido pZCAL con <i>APT1</i>	Este trabajo
A372	<i>agl334w::G418^R aer325w::HYG^R</i>	$\Delta apt1 \Delta ade4$	Este trabajo

II. MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS

Todos los organismos empleados y obtenidos a lo largo de este trabajo, cepas de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *A. gossypii*, se mantienen en los medios apropiados en 25% glicerol a -80°C.

II.1. *E. COLI*.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron habitualmente a 37°C. Cuando se trataba de cultivos líquidos la agitación era a 250-300 r.p.m. El medio de crecimiento empleado fue:

LB: 0.5% extracto de levadura, 1% bacto triptona y 1% NaCl. Cuando se empleó como medio de selección se añadió ampicilina o higromicina a una concentración de 0.1 mg/ml.

II.2. *A. GOSSYPII*.

Los cultivos de *A. gossypii* se realizaron a 28°C. Cuando se trataba de cultivos líquidos la agitación era a 250-300 r.p.m. Todos los medios empleados, que se detallan a continuación, se ajustaron a pH 6.8 con NaOH.

MA2: 2% Bactopeptona, 0.2% extracto de levadura, 0.06% mioinositol y 2% glucosa. Este medio se utilizó como medio rico.

SPA: 0.3% Soytona (Soybean meal), 0.3% extracto de levadura, 0.3% extracto de malta, 2% cornstepliquor y 1% glucosa. Este medio se empleó como medio de esporulación.

SMM: 1% glucosa, 0.03% mio-inositol, tras autoclavar se añadió 0.05% L-asparagina, 0.36 mM KH₂PO₄, 0.2 mM MgSO₄.7H₂O, 0.85 mM NaCl, 0.18 mM CaCl₂.2H₂O, a partir de soluciones esterilizadas por filtración. Este medio se utilizó como medio mínimo sintético.

Todos los medios sólidos contenían agar al 2%, excepto el medio de esporulación al que se le añadió agar al 4%.

II.3. *S. CEREVISIAE*.

El cultivo de *S. cerevisiae* se llevó a cabo a 28°C. Cuando los cultivos fueron líquidos la agitación fue de 200 r.p.m. Los medios utilizados se detallan a continuación:

YPD: 2% bactopectona, 1% extracto de levadura y 2% de glucosa. Este medio se empleó como medio rico.

SD: 0.67% bacto-yeast nitrogen base w/o, 2% glucosa. Este medio se usó como medio sintético mínimo. Cuando fue necesario, este medio se complementó con los aminoácidos leucina, lisina, histidina y uracilo, a una concentración de 20 mg/l de cada uno de ellos, y/o nucleobases de purina. Para cada una de las nucleobases de purina (guanina, hipoxantina, xantina, adenina) se preparó una solución stock 100 mM en 0.1 N de NaOH.

El MPA se empleó a una concentración de 10 µg/ml.

Cuando fue necesario, a los diferentes medios de *A. gossypii* o *S. cerevisiae* se les añadió 250 µg/ml de geneticina e higromicina.

III. VECTORES EMPLEADOS

Los vectores a partir de los cuales se construyeron los diferentes plásmidos del trabajo son los que se detallan a continuación:

pBluescript SK⁺ (Stratagene): plásmido autorreplicativo de 2.9 kb funcional en bacteria que contiene el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación *ColE1*, y un fragmento del operón *lac* de *E. coli*, el cual codifica la enzima β-galactosidasa. Dispone de una secuencia de clonación múltiple, en la que hay 21 sitios de restricción. Permitiendo la selección de clones recombinantes por α-complementación de cepas de *E. coli* portadoras de la delección *lacZ M15*. Este vector se empleó como vector de clonación de fragmentos de ADN.

pGEMT (Promega): vector de 3 kb empleado para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR en la que se usan polimerasas que añaden un deoxinucleótido de adenina a los extremos 5'. Este vector presenta un deoxinucleótido de timina sobresaliente en el extremo 3' de cada cadena, permitiendo la clonación de fragmentos con un residuo de adenina en sus extremos 5'. Contiene el origen de replicación del fago filamentoso *f1*, los promotores de la ARN polimerasa de los fagos *T7* y *SP6* flanqueando a una región de clonación múltiple en la secuencia codificante de la enzima β-galactosidasa.

pFA6a-kanMX6 (Longtine et al., 1998): Usado como molde en la PCR para la construcción de los módulos de delección que portan el marcador que codifica resistencia a geneticina.

pFA6a-His3MX6-pGAL1-GFP (Longtine *et al.*, 1998): Se empleó como molde en la construcción, por PCR, de módulos de inactivación *S. cerevisiae* que portan el marcador *HIS3*.

pESC-URA (Stratagene): es un plásmido episómico de levadura, diseñado para análisis de expresión y funcionalidad de genes eucariotas en *S. cerevisiae*. Se empleó como molde en la construcción, por PCR, de módulos de inactivación que portan el marcador *URA3*.

YEp352 (Hill *et al.*, 1986): vector episomal lanzadera con los marcadores *URA3* y ampicilina. Se empleo en la construcción de la genoteca genómica de *A. gossypii*.

Otros plásmidos contruidos en el laboratorio y que se han utilizado a lo largo de este trabajo han sido:

pJR1566: Deriva del vector pUC19 (Santos *et al.*, 2005) y lleva el marcador dominante *G418^R*, como un fragmento *SalI-SalI* de 2.1 kb. Este plásmido se empleo para la obtención del marcador en la construcción de los módulos de interrupción en *A. gossypii*.

pJR1742: Deriva del vector Bluescript *SK⁺* y lleva el marcador *Hyg^R* que confiere resistencia a higromicina. Se construyó por fusión del promotor y terminador del gen *LEU2* de *A. gossypii* a la secuencia codificante del gen de resistencia a higromicina de *Streptomyces hygrosopicus* (Zalacain *et al.*, 1986).

IV. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Biotmers (Alemania) y la secuencia de los mismos se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 14: Oligonucleótidos		
nombre	secuencia	5'----->3'
AgABR124c-A1	ccttctgactattgccgatgt	
AgABR124c-A2	caagattatgtcatctgggcg	
AgACR289-A1	ctagaaggtgggtgcatgac	
AgACR289-A2	cacgttggtccataataacg	
AgACR289-B1	ggacagatattgacgatgag	
AgACR289-B2	cctcgtttcctacggaatcg	
AgACR289-Xho A1	ccctcgagataaaatgcagtggatagcc	
AgACR289-Xho B1	ccctcgaggctggccgtcgtatgtctttc	
AgADE4F-RT-qPCR	attaacacggacagcgattct	
AgADE4R-RT-qPCR	tcacgtatgttttgaagcg	
AgAFR622-A1	ctaaggatctgaacctattac	
AgAFR622A1-XhoR	ccctcgagggtgactaggcttactcta	
AgAFR622-B1	cagtttgctgtctattaagcg	
AgAFR622B1-XhoF	ccctcgagctccgacccttcctctcac	

AgAMD1-A1	ttcgctccgtggatacaacg
AgAMD1-A2	acataggggtgtccaaccttcg
AgAMD1-D	tggttgaacattacgcaaaa
AgAMD1-F2	tatagatatgagacgctatctaccgaattggagttggttgaacattacgcaaaacggatccccgggtaattaa
AgAMD1F-RT-qPCR	tacaagatggggcaggtgg
AgAMD1-R1	ggtgcgactttcgttggcagaaattgcacgttctgtatgatgcgtttgtaagtagaattcgagctcgtttaac
AgAMD1R-RT-qPCR	ttggttggcaccttcagaa
AgAMD1-Z	tcggtgtacaatccggcaga
AgAPT1(SacII)-Y1	tccgcgggcagtatcaatgcttcgctt
AgAPT1-A	caaagtcctttagatagtg
AgAPT1-A1	gaagtagtgcggaacagctg
AgAPT1-A2	gctgatacagggcctcaaac
AgAPT1-B1	gcaacgtgaagacaggcgcc
AgAPT1-F1	gaacttacaacgataaatcaatcacctgctcgacttataatcttagaccggatccccgggtaattaa
AgAPT1-F2	ctgcaggcgctgtcttcacgttgctgcagggccaggaggaagctcttgaaaccggatccccgggtaattaa a
AgAPT1F-RT-qPCR	gaggcctttcctgagacaaa
AgAPT1GFP-A1	aaaagttcttctcttactcatggtctaagatattataa
AgAPT1GFP-A2	gcatggatgaactatacaaatccatcaacgaatatgcaaa
AgAPT1GFP-N1	ttataatatcttagaccatgagtaaaggagagaagaactttt
AgAPT1GFP-N2	tttgcatattcgttgatggattgtatagttcatccatgc
AgAPT1-R1	ccgtaaactgtagttccggcaacttagtaatgtaacaccgttcaagagagaattcgagctcgtttaac
AgAPT1R-RT-qPCR	tgcttaataagggtcccagca
AgAPT1-Y2	aactgtagttccggcaactt
AgAPT1-Z	cgcgtaaccgaactcctgcc
AgAPT1-Z	cgcgtaaacgaactcctgcc
AgBAS2-R1	gcaaaacaaaggaaacaaaaagtgcaatgaacacataagacggaaaatgaattcgagctcgtttaac
AgBAS2R-RT-qPCR	cgcagtcctactgatccg
AgBAS2-RSPS	actagtttgcgacgccgctcgtcttcaaatc
AgBAS2-Z	aggttcgttgcggttgcggt
AgFCY2-A	agaactgcaattctccatac
AgFCY2-A1	ctccagcgtatgccgacctc
AgFCY2-A2	gaatggaagaatatgcagcttg
AgIMDF-RT-qPCR	tttgcgaggacgagacctt
AgIMDR-RT-qPCR	atcgccagtctctgcctgt
AgXPT1(SacII)-Y1	tccgcgaccgccatcaaatatctgtc
AgXPT1-A	cgagaccgccatcaaatatctg
AgXPT1-A1	gaagtagtgcggaacagctg
AgXPT1-A2	gctgatacagggcctcaaac
AgXPT1-B	gtagctggccaaattatggag
AgXPT1-C	ccgtcttccaaaccaagtcctc
AgXPT1-D	catatctaataacattattatac
AgXPT1-E	cgccatcatggccactggc

AgXPT1-F1	ctcctcttcgcacatcttcgcttcttagtctcgagtcttaactacgttcaacacggatccccgggtaattaa
AgXPT1-F2	gcatagacattgaagagcacactagattgtctattgaacagggaacaacatcgatccccgggtaattaa
AgXPT1F-RT-qPCR	caaattatggagcgtgggta
AgXPT1GFP-A1	aaaagtcttctccttactcattgttgaacgtagttaag
AgXPT1GFP-A2	gcatggatgaactatacaaatcagcctccgataagatgta
AgXPT1GFP-N1	cttaactacgttcaacaatgagtaaaggagaagaactttt
AgXPT1GFP-N2	tacatcttatcggaggctgatttgtatagttcatccatgc
AgXPT1-R1	cttcacatcgatataaatgaactatctaccaacatctagcgcacatctgtcgaaggaattcgagctcgtttaa c
AgXPT1-R1-2	cttcgacagatgcgctagatgttgggtagatagttcatttatatcgatgtggaagaattcgagctcgtttaa c
AgXPT1R-RT-qPCR	tccacctcgtcgacaatca
AgXPT1-Y	cgactttgtcgatgcactgg
AgXPT1-Y2	tcatcttcgacagatgcgcta
AgXPT1-Z	agcgggaatttcggcgcaaa
Down45 Del ScFCY2	gacgtgaaatgagcacggggaaatgatcgcccaatcattactcctgaggcgcgccacttctaaa
HygB	ggaatcatccgaatcaatac
HygC	aggaactggcgagttcctct
KanB	ctgcagcaggagccgtaat
KanB1	tgtacggcgacagtcacat
KanC	tgattttgatgacgagcgtaat
KanC2	cctcgacatcatctgcccagat
M13pUC-23 fwd	cgttttacaacgctgactgggaaaa
M13pUC-23 rev	cctgtgtgaaattgttatccgct
ScAAH1 DOWN	agactttcaacaaaaatattatacaatgtcttgc aaatggtagtgcggtatttcacaccgc
ScAAH1 UP	taactaccattagaactaacaagaaaagaaaaaaataatgctgagagtgaccatacc
ScAAH1-A	aggaaaagagcacaaggtttatttt
ScAAH1-D	cttaacatacccgagctgaatttta
ScAPT1 DOWN	ggcagaaaaggaagcttgaatatgggtcaggacgtgaaacatatcagaattcgagctcgtttaa c
ScAPT1 UP	tgctgcttcaaagaatctatcgcaaatattcctaataatcatgaggatccccgggtaattaa
ScAPT1-A	cagtgagttcaacaaataatgtgc
ScAPT1-D	attaagagaagttcaggaggcaaat
ScFCY2-A	gaggcattttctttgaaatgtaga
ScFCY2-B	agaaaagaacgcaacaatatcaac
ScFCY2-C	ggtgtcatatatgctatcctggttc
ScFCY2-D	tcttggcattttgaagtttggat
ScGUD1 DOWN	aatacttggacaagatatagtagccctctaaacatatacaactagtgcggtatttcacaccgc
ScGUD1 DOWN- LEU2	aatacttggacaagatatagtagccctctaaacatatacaactagggcgtttctgacagagtaaaa
ScGUD1 UP	tattgaatgaatatatgaattgggctgtcctttgaagaggatgctgagagtgaccatacc
ScGUD1 UP-LEU2	tattgaatgaatatatgaattgggctgtcctttgaagaggatgctgtgggaataactcaggtatcg
ScGUD1-A	gtagacacccttcagtcctaaca
ScGUD1-D	gattcaggcttattcaaaaatgcta
ScHPT1 DOWN	tctgctgatgattcaagttactgaaggatatgatgtctatcagaattcgagctcgtttaa c

ScHPT1 UP	tatattaccgttcgtgttcattatatccattacgttcccataatgcggatccccgggtaattaa
ScHPT1-A	tatcatttccgcttatctgacttct
ScHPT1-D	aatcagcagattccatcaaaagtag
ScIMD2 Down-45	cataacatcagtaatactgtattgatgatccattttaacattcagttcggattttcacaccgc
ScIMD2 fwd-A2	ccgcgcatctcttttct
ScIMD2 UP-45	gtataaatagtgaagacttttccatttgatatttggtaaaaatttcgctagagtgcaccatacc
ScIMD2-A	cgccgcgcaggcacgccgcgc
ScIMD2-B	ccccatcaattaaattgtagc
ScURA3 fwd-3	gtgtgtgggttagatgacaag
ScURA3 rev-5	tcaagatatccacatgtgttt
Up45 Del ScFCY2	gcatataaaacatcctatcctctattataacgatttataagaatgcggatccccgggtaattaa

V. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

V.1. OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Para la obtención del ADN plasmídico en *E. coli* se siguió el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) empleando los kits "Magic Wizard"(Promega) y "GFX™ Micro Plasmid Prep" (Amersham Biosciences) de acuerdo a las especificaciones dadas por los proveedores.

En la obtención del ADN plasmídico de *S. cerevisiae* se empleó el procedimiento que se describe a continuación. Se recogieron células directamente de la colonia en placa y se resuspendieron en 300 µl de tampón A (100mM NaCl, 10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0,1% SDS). Se añadieron bolas de vidrio y se agitó vigorosamente en vortex hasta la rotura de las células. Posteriormente se añadieron 300 µl de fenol. La mezcla se agitó y se centrifugó en una microfuga. Se recogió la fase acuosa y se hizo una nueva extracción con fenol (1:1). Se añadió un volumen igual al recogido de fase acuosa de una mezcla de cloroformo: isoamilalcohol (24:1), se agitó y se centrifugó. Se recogió la fase acuosa y el ADN allí presente se precipitó por adición de 1/10 de volumen de 3 M NaAcO pH 7 y 2.5 volúmenes de etanol 100%, posterior inversión de la mezcla e incubación a -80°C durante 15 min. Tras una centrifugación en microfuga durante 10 min., se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 80%. Finalmente, el precipitado que contenía los ácidos nucleicos se secó y resuspendió en 50 µl de dH₂O. La recuperación del ADN plasmídico se realizó por transformación de células electrocompetentes de competentes de *E. coli* (DH10B).

V.2. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *A. GOSSYPII* DE ALTO PESO MOLECULAR.

El micelio, recogido por filtración a partir de 100 ml de cultivo en fase de crecimiento, se lavó dos veces con H₂O destilada y se resuspendió en 10 ml de una solución de 1 M sorbitol, 20 mM EDTA y 10 mg de Zymolyase, (Zymolyase-20T Seikagaku Kogyo). Se incubó a 37°C en agitación suave hasta que la conversión de

micelio a protoplastos fue de aproximadamente un 90% (30-60 minutos). Tras la adición hasta una concentración final de: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA y 0.5% SDS, la muestra fue incubada a 65°C durante 20 minutos. A continuación, la solución se extrajo dos veces con fenol cloroformo y los ácidos nucleicos fueron precipitados por la adición de 2.5 volúmenes de etanol 100%. El precipitado se resuspendió en 200-400 µl de H₂O destilada y el ARN se eliminó de la muestra por tratamiento a 37°C con RNasa (50 mg). El ADN presente en la solución se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol y 1 volumen de 0.3 M NaAcO pH 7. Finalmente, se lavó dos veces con etanol 70%, se desecó y se resuspendió en 150-300 µl de H₂O destilada estéril.

V.3. OBTENCIÓN DE ARN DE *A. GOSSYPII*.

Micelio recogido por filtración de 100 ml de cultivo (aproximadamente 50 mg) fue congelado con N₂ líquido y pulverizado con ayuda de un mortero. El polvo fue resuspendido en 1 ml de Trizol. Después a la solución se añadió 250 µl de cloroformo y los ácidos nucleicos fueron precipitados por la adición de 2.5 volúmenes de isopropanol. El precipitado desecado se resuspendió en H₂O destilada estéril tratada con DEPC. Cuando fue necesario las muestras se trataron con 20 U de DNasa I exenta de RNasa (Roche). El ARN extraído fue cuantificado por absorbancia a 260 nm (Sambrook y Russell, 2001)

V.4. OBTENCIÓN DE UNA GENOTECA GENÓMICA DE *A. GOSSYPII* EN UN VECTOR FUNCIONAL EN *S. CEREVISIAE*.

Siguiendo procedimientos estándar (método proteínaasa K-fenol, Sambrook y Russel, 2001), se obtuvo ADN genómico de alto peso molecular del hongo *A. gossypii*. Tras estimar concentración de enzima y tiempo de reacción, el ADN genómico fue sometido a digestión parcial con la endonucleasa de restricción *Sau3A*, para obtener mayoritariamente fragmentos de 5 kb. La mezcla de reacción fue resuelta por electroforesis en un gel de agarosa, a partir del cual se aisló y purificó la fracción de fragmentos de ADN de interés. La fracción purificada fue ligada al vector episómico YEp352, funcional en *S. cerevisiae* (Hill et. al., 1986), previamente digerido con la restrictasa *BamHI* y posteriormente tratado con fosfatasa alcalina para evitar su autoligación. La transformación de células electrocompetentes de *E. coli*, cepa DH10B (Grant et. al. 1990), con la mezcla de ligación y selección de transformantes en placa generó un total de 32.000 clones transformantes. La obtención y análisis por restricción del ADN plasmídico de 6 clones elegidos al azar reveló que cada clon portaba un fragmento de ADN genómico diferente, cuyo tamaño oscilaba entre 5 y 7 kb.

Aplicando la ecuación $N = \ln(1-P)/\ln(1-f)$ (Clarke y Carbon, 1976), donde: P, es la probabilidad de encontrar cualquier fragmento de ADN genómico; f, la fracción de genoma contenida en cada clon; y N, el número de clones que se requiere para ello, calculamos que el número de clones que deberían contener la genoteca tendría que ser de

unos 8475 clones para que en dicha genoteca tuviese contenido todo el genoma de *A. gossypii* ($9.2 \cdot 10^3$ kb). Así garantizábamos que en el 99% de los casos que buscásemos un fragmento cualquiera de ADN tendríamos una probabilidad de éxito de 0,99. Dado que la genoteca que habíamos obtenido estaba formada por unos 32.000 clones, podíamos afirmar que la genoteca construida es bastante representativa, ya que cada fragmento genómico está presente entre 3-4 veces.

VI. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

VI.1. OBTENCIÓN DE ESPORAS DE *A. GOSSYPIL*.

Micelio fresco de *A. gossypii* se sembraba en placas de medio de esporulación (SPA) y se incubaba a 28°C durante 3-6 días. Todo el micelio de una placa de cultivo se recogía con una espátula estéril y se transfería a un matraz al que se añadía 4 ml de una solución acuosa, que contenía 1 mg/ml de Zymolyase (Zymolyase-20T Seikagaku Kogyo) para lisar el micelio y liberar las esporas contenidas en las hifas. La muestra se incubaba en agitación (200 r.p.m) a 37°C durante 30 minutos. Las esporas en suspensión se recogieron por centrifugación a 2000 g y se lavaron dos veces con Tritón X-100 al 0.03%. Finalmente se resuspendían en medio rico (MA2), a razón de 10^6 esporas/ml. La suspensión de esporas se guardaba a 4°C si iba a ser usada a tiempos cortos (la viabilidad en esas condiciones es de un mes). Para tiempos de uso más largos, la suspensión de esporas se guardaba en 25% de glicerol a -80°C. Toda la colección de cepas del laboratorio, a excepción de aquellas que son incapaces de esporular, están en forma de esporas.

VI.2. TRANSFORMACIÓN DE ESPORAS DE *A. GOSSYPIL*.

Medio rico líquido (100 ml) se inoculaba con 10^6 esporas e incubado a 28°C en agitación (250 r.p.m.), durante 12-13 horas. Las esporas germinadas se recogían por filtración, se lavaban con H₂O destilada y se resuspendían en 20 ml de 50 mM tampón fosfato potásico pH 7.5, 25 mM DTT. Posteriormente se incubaban a 28°C en agitación durante 30 minutos y se recogían por centrifugación a 8000 g. Se lavaban dos veces con tampón frío STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM MgCl₂) y se resuspendían en 1 ml de tampón STM. Para el proceso de transformación se empleaban 125 µl de la suspensión de esporas, que se depositaban en una cubeta de electroporación 0.4 cm³ (Bio-Rad), enfriada previamente en hielo. Tras añadir el ADN (5-10 µg), la muestra se sometía a un campo eléctrico (1500 V, 200 W y 25 mF) en un electroporador Gene-Pulser (Bio-Rad). Inmediatamente, la mezcla se recogía de cada cubeta con 1 ml de medio de cultivo, se centrifugaba durante 5 minutos a 8000 g, se retiraba el sobrenadante y las esporas se resuspendían en un volumen final de 200 µl de medio rico MA2. Finalmente, la mezcla se sembraba en placas (medio MA2) que se incubaban a 28°C durante 5-6 horas para permitir la regeneración de esporas. Transcurrido ese tiempo de incubación, se añadía una

cobertera (5 ml) que consistía en una solución acuosa de agarosa 0.4 %, previamente fundida a 95°C y enfriada a 42°C, que contenía la droga empleada en la selección de transformantes.

VI.3. TRANSFORMACIÓN DE *S. CEREVISIAE*.

La transformación de células de levadura se llevó a cabo por el método estándar de acetato de litio descrito por Gietz *et al.* (1995).

VI.4. PRUEBAS DE ALIMENTACIÓN CRUZADA.

Para las pruebas de alimentación cruzada lo primero fue cortar discos de papel celofán usando como molde un eppendorf. Estos discos envueltos en papel de filtro y recubiertos por papel de aluminio se esterilizaron en una autoclave. Posteriormente los discos se colocaron sobre una placa de MA2, se hidrataron con agua y se extendieron sobre la placa con ayuda de pinzas estériles. Sobre ellos se sembró una porción pequeña de micelio fresco de las diferentes cepas de *A. gossypii* y se incubaron durante 48 horas. Los discos con micelio se dispusieron sobre placas de SMM (con los requerimientos necesarios para el crecimiento de la cepa silvestre *S. cerevisiae*) en las que previamente se había sembrado un césped de levadura con auxotrofia para guanina o adenina, más la cepa silvestre de control. Se incubaron durante 72-96 horas y se escanearon las placas (Scanner Epson 2400). Para aumentar el contraste de la levadura, en la realización del medio se añadió 0,06% de azul de metileno.

VII. MANIPULACIÓN DE ADN

VII.1. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y LIGACIÓN.

Las diferentes enzimas de restricción utilizadas a lo largo de este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales Roche Applied Science, Fermentas, Pharmacia, Promega o New England Biolabs y empleadas de acuerdo a las especificaciones dadas por los diferentes proveedores.

La ligación entre moléculas de ADN con extremos compatibles se realizó mediante el empleo de la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas) y las moléculas de interés se seleccionaron por transformación de células competentes de *E. coli*, cepa D5 α , con la mezcla de ligación. Las moléculas de ADN de extremos sobresalientes no compatibles para su ligación, se convirtieron a moléculas de extremos romos mediante tratamiento con el fragmento klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Fermentas) de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor.

VII.2. ELECTROFORESIS DE ADN.

La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa de diferentes porcentajes, que osciló entre el 0.4-2 % (p/v), dependiendo del tamaño de las muestras a resolver. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante (100V) en tampón TBE (90 mM Tris-HCl,

90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA) con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Las bandas se observaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta (acoplado a un sistema de fotografía digital (Gel Doc 2000 Bio-Rad).

VII.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA.

El fragmento de interés, identificado bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm), era recortado del gel de agarosa con un bisturí. Posteriormente, el ADN se purificaba con el kit "GFX PCR ADN and Gel Band Purification Kit " (Amersham Biosciences) siguiendo las especificaciones dadas por el proveedor.

VII.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y PCRS ANALÍTICAS.

Las amplificaciones de ADN se realizaron empleando diferentes polimerasas dependiendo de las necesidades de cada caso. Para la amplificación fidedigna de fragmentos de más de 5 kb se empleó la enzima Expand Long Template PCR System (Roche). Para fragmentos de menor tamaño se usó la enzima Expand High Fidelity PCR System (Roche), Triplemaster[®] PCR system (Eppendorf) ó Pwo ADN Polymerase (Boehringer Mannheim). Las PCRs analíticas se realizaron con ADN Polymerase Biotools (B&M. Labs. S.A. Madrid. España). En todos los casos las reacciones se prepararon de acuerdo a las especificaciones dadas por los proveedores.

El proceso de amplificación se desarrolló en tres etapas. Una etapa de desnaturalización (5 minutos a 95°C), la etapa de amplificación (30 ciclos) y finalmente la etapa de extensión (10 minutos). Cada ciclo de amplificación incluía 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a temperatura variable dependiendo de la temperatura media de fusión (T_m) de los oligonucleótidos, y empleando en la reacción un tiempo de extensión de 1 minuto/kb de ADN a sintetizar. La temperatura de extensión fue de 68°C para fragmentos superiores a 2.5 kb y de 72°C para fragmentos de menor tamaño.

En el caso de las PCRs analíticas, tanto para *S. cerevisiae* como para *A. gossypii*, se requería de una etapa previa de desnaturalización. En esta etapa se produce la lisis celular, al someter una fracción de colonia o una pequeña porción de micelio, resuspendido en buffer de reacción 1X, a una temperatura de 95°C durante 10 minutos. Las PCRs analíticas se realizaron siempre con ADN Polymerase Biotools (B&M. Labs. S.A. Madrid. España).

VII.5. SECUENCIACIÓN DE ADN.

Todas las muestras fueron secuenciadas en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Laboratorio 314, Edificio Departamental. Salamanca. España. e-mail: serv.sadn@usal.es). El proceso de secuenciación, basado en el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) se realizó usando un secuenciador automático

modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron con el kit “ABI PRISM® BigDye™ Primer v.30 Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaq® ADN Ploymerase, FS” (Applied Biosystems).

VIII. MANIPULACIÓN DE ARN

VIII.1. ELECTROFORESIS DE ARN.

Se realizó de acuerdo a Sambrook y Russell (2001) empleando geles de agarosa-formaldehído.

VIII.2. SÍNTESIS DE ADN COPIA (ADNc) Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR).

El ADN copia (ADNc) fue sintetizado a partir de 1µl de ARN libre de ADN empleando el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit de Roche. Utilizando como cebador el Anchored-oligo(dT)18 primer. De acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Para la PCR cuantitativa a tiempo real se empleo FastStart SYBR Green Master de Roche según las especificaciones del proveedor. Las reacciones se realizaron en placas de PCR de 96 pocillos en la plataforma LightCycler® 480 Real-Time PCR System. El modo de análisis consistió en una prehincubación a 95°C durante 10 minutos. Una amplificación de 45 ciclos que consistió en 95°C /10 segundos; 49°C/14 segundos y 72°C/14 segundos. Una fusión de 95°C/5 segundos; 65°C/1 minuto y 97°C continua con adquisición cada 5 segundos. Y un fase de enfriamiento a 40°C/10 segundos. Para realizar las rectas patrón se uso como molde plásmidos que contenían cada uno de los genes a analizar a diferentes concentraciones conocidas de ADN (de 10² a 10⁶ copias). El análisis se realizó con el software propio del equipo.

IX. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

IX.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEÍCOS

El micelio, procedente de cultivos líquidos, se recoge por filtración y se resuspendía en tampón de extracción (50 mM Tris pH 8.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF) a razón de 1/20 del volumen de partida. La suspensión de micelio se lisaba por presión (1000 psi), usando el sistema French® Pressure Mini-Cell. El lisado se centrifugaba a 10000 x g durante 15 min a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante o bien se empleaba inmediatamente para realizar los ensayos enzimáticos pertinentes o se congelaba a -30°C en 25% de glicerol (v/v) para posteriores análisis. La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría a 280 nm de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Absorbancia a 280} \times \text{factor de dilución}}{2.8} = C \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right)$$

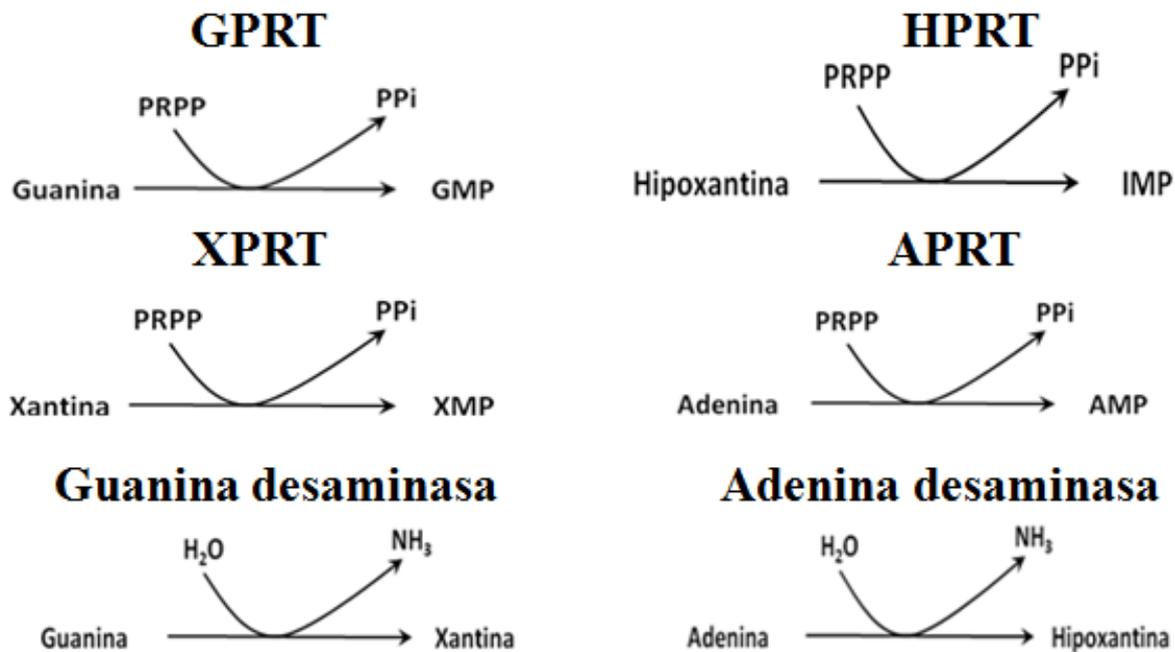
IX. 2. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Las actividades enzimáticas a ensayar fueron las siguientes:

Para el análisis de la actividad enzimática se emplearon 500 µg de extractos proteicos. Los cuales se incubaron a 37°C durante 30 minutos, con un buffer compuesto por 20 mM Tris pH8.5, 10 mM MgCl, 10 mM de PRPP (salvo en las actividades adenina y guanina desaminasa) y según la actividad a medir se añadieron las diferentes bases (guanina, xantina, hipoxantina, adenina) a una concentración de 10 mM, a partir de una solución stock 100 mM. En todos los casos el volumen final de la reacción fue de 100 µl.

Las reacciones se pararon por adición de ácido fórmico a una concentración final 0.33 M.

La presencia o ausencia de actividad se determinó por cromatografía en placa fina en placas PEI-celulosa con indicador fluorescente (excitación 254 nm) (Schelicher & Schuell, Sigma-Aldrich). La fase móvil consistió en una mezcla de etanol y agua en proporción 70:30.



IX.2.1. Ensayo de actividades enzimáticas con bases radiactivas.

Para el análisis de las actividades enzimáticas las bases estaban marcadas con ¹⁴C [8-¹⁴C]-adenina, [8-¹⁴C]-hipoxantina, [8-¹⁴C]-xantina y [8-¹⁴C]-guanina (MoraveK Biochemicals Inc., California, USA). Se siguieron los mismos principios que en las anteriores pero se tuvieron que cambiar: la concentración de PRPP fue de 360 mM, la de las bases calientes fue de 180 mM y una concentración de extractos proteicos de 25µg. Todo ello en un volumen final de 20 µl.

Las reacciones se pararon al adicionar 2,5% de SDS y 200mM de EDTA. Para las cromatografías se emplearon las mismas placas y la misma fase móvil.

La señal radiactiva se detectó por exposición del filtro a películas radiográficas HiperfilmTM-MP (Amersham) a temperatura ambiente durante períodos de tiempo variables, desde 4 horas hasta varios días, o bien en Phosphorimager (Analizador de imágenes BAS-1500 de Fujifilm y el programa MacBAS 2.1 e Image Gauge V4.0).

Las marcas radiactivas se recortaron y se analizaron en un contador de centelleo Wallac 1409 (Perkin Elmer) empleando líquido de centelleo Optiphase "Hisafe" (Wallace).

Con un ensayo similar se analizó la actividad PRPP amidotransferasa usando glutamina marcada. Que permite cuantificar la actividad de la ruta *de novo* por la conversión de glutamina a glutamato.

IX.3. ENSAYO DE ENTRADA DE BASES RADIATIVAS A LA CÉLULA.

Se inocularon 5 ml de MA2 con 50 μ l de esporas y se incubaron durante 14 horas a 28°C. Se recogió 1 ml y se centrifugó desechando el sobrenadante. Se lavaron 5 veces con SMM y finalmente se resuspendieron las células en 1ml de SMM en tubos eppendorf de rosca. Se añadieron 2 μ l de base caliente se recogieron a tiempo 0, 500 μ l de la suspensión y se les añadió 500 μ l de triton. El resto se incubaron durante 15 minutos a 37°C y se añadió la misma cantidad de triton. Se centrifugaron todos los viales y se recogieron por un lado 800 μ l de sobrenadante, el precipitado se lavó 5 veces con triton. Finalmente se añadió 1 ml de HCl a 0,5N para proceder a la lisis de las células que se completo con someterlos a 100°C durante 1 hora y posterior enfriamiento en hielo. Tanto la fracción de sobrenadante como la celular se analizaron utilizando el contador de centelleo.

X. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA

La cuantificación de la producción de riboflavina en las diferentes cepas se realizó a partir de cultivos líquidos en agitación (200 r.p.m). Se inocularon 500 ml de medio rico, MA2, con 2 ml de una preparación fresca de esporas que contenía 10⁶ esporas/ml. A intervalos de tiempo 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas se tomaron muestras del cultivo que fueron de 25 ml para 12 h y de 10 ml para el resto de los tiempos. Cada una de las muestras se dividió en dos partes, la mitad del cultivo se empleó para valorar la cantidad de micelio presente en el medio, y la otra mitad fue procesada para determinar la producción de riboflavina.

El micelio, presente en cada muestra, se recogió por filtración, se lavó una vez con H₂O, se secó a 65°C durante 12 horas, y finalmente se pesó. La cantidad de micelio en cada muestra se expresó como mg de peso seco por litro de cultivo.

Para determinar la cantidad de riboflavina contenida en cada muestra, se prepararon 4 alícuotas de 500 μ l, se les añadió 0,5 volúmenes de bolas vidrio 425-600 mm de diámetro (SIGMA) y se sometieron a agitación en la FastPrep FP120 (BIO 101, Vista, California), 3 ciclos de 10 segundos. Tras una centrifugación a 8000 g durante 15 minutos, se eliminaron los restos miceliales, y el sobrenadante que contenía la riboflavina presente en el medio más la riboflavina liberada del micelio se empleó para determinar la absorbancia a 450 nm, longitud de onda a la cual la riboflavina presenta su máximo de absorción. En la medida de la absorbancia de cada alícuota se empleó el lector de placas Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific). El valor medio de la absorbancia para cada una de las muestra se llevó a una recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de riboflavina y se determinó la concentración de riboflavina. La producción de riboflavina asociada a cada muestra se expresó en mg de riboflavina por g de peso seco de micelio.

XI. MICROSCOPIA

XI.1. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR FLUORESCENCIA DIRECTA.

La quimioluminiscencia es una propiedad, presente en algunas moléculas, que consiste en la emisión de luz como resultado de la disipación de la energía al pasar desde un estado de excitación hasta un estado basal. La GFP (Green Fluorescent Protein) es un polipéptido de 238 aminoácidos, aislado de la medusa *Aequorea victoria* que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se estimula con luz ultravioleta. Esta capacidad de emisión de fluorescencia no depende de ningún sustrato o cofactor presente en las células de este organismo, por lo que es capaz de emitir fluorescencia cuando se expresa heterológamente en células procariotas y eucariotas. Estas propiedades han hecho de la GFP una excelente herramienta para analizar la expresión y localización de determinadas proteínas *in vivo* (Chalfie 1994). Para ello sólo es necesario fusionar el gen de interés con la secuencia de ADN que codifica dicha proteína y observar las células que portan esta quimera bajo el microscopio de fluorescencia.

La fluorescencia de las proteínas resultantes de las fusiones fue analizada directamente sobre células vivas (Niedenthal *et al.*, 1996). Las observaciones fueron realizadas con el Microscopio Nikon Eclipse 90i. Las imágenes fueron procesadas con los programas MetaMorph® Premier Version 7.5.6.0 (Molecular Devices®) Photoshop (Adobe).

XI.2. TINCIÓN DE NÚCLEOS.

El ADN nuclear fue visualizado en células vivas mediante tinción con Hoechst 33342 (Sigma), un colorante específico de ADN nuclear. Las muestras de 1 ml de cultivo fueron retiradas a tiempos determinados y el fluoróforo Hoechst 33342 fue añadido a una concentración de 5 μ g/ml. Después de un lavado con PBS5X las muestras fueron inmediatamente observadas al microscopio.

XI.3. TINCIÓN CON CALCOFLÚOR.

Se empleó para observar la presencia de septos en el interior de las hifas. A 1 ml de cultivo se añadía 5 µl de una solución 1mg/ml de calcoflúor, La mezcla se incubaba durante 5 minutos en oscuridad, se lavaba dos veces con PBS5X y se procedía a su análisis por microscopía de fluorescencia.

XII. SOPORTE INFORMÁTICO

El análisis de las secuencias de ADN se llevó a cabo con los diferentes programas: EditSeq, MapDraw, MegAlign y SeqManII, suministrados por ADNstar Inc (Madison, WI). La búsqueda de homología de secuencias se realizó mediante los programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y FASTA (FAST-ALL), y las bases de datos GenBank y EMBL (European molecular biology laboratory). La comparación de genomas de diferentes hemiascomicetos se realizó mediante la herramienta electrónica Yeast Gene Order Browser (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob>).

Las imágenes de geles de agarosa con muestras de ADN se tomaron con el equipo de fotografía electrónica Gel Doc 2000 (Bio Rad).

EL análisis de las PCR cuantitativas a tiempo real se realizó con el software de LightCycler[®] 480 (Roche).

La adquisición y análisis de imágenes de microscopio se realizó con el programa MetaMorph[®] (Molecular Devices[®]).

La determinación de la producción de riboflavina se realizó con el programa Skanlt[®] Software for Varioskan[®] Flash, versión 2.4.3, (Thermo Scientific).

La redacción y enmaquetado de esta memoria se ha hecho con el programa Microsoft Word Vista (Microsoft Corporation). La configuración de las distintas gráficas se llevó a cabo con el programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation). En el análisis de imágenes y diseño de figuras se han empleado los programas Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated) y el programa Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation). La redacción de la bibliografía se hizo mediante el programa EndNote (UMDNI-Robert Wood Johnson Library of the Health sciences, NJ, USA).

The page features two vertical grey lines, one on the left and one on the right. At the top of the left line is a grey crosshair symbol, and at the bottom of the right line is a grey crosshair symbol. Two horizontal grey bars cross the vertical lines, one above and one below the main title.

Bibliografía

“Scientiae enim naturalis non est simpliciter narrata accipere, sed in rebus naturalibus inquirere causas.” **Alberto Magno**

- Abbas CA, Sibirny AA. **Genetic control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75:321-60.
- Ahmed M, Taylor W, Smith PR, Becker MA. **Accelerated transcription of PRPS1 in X-linked overactivity of normal human phosphoribosylpyrophosphate synthetase.** *J Biol Chem* 1999; 274:7482-7488.
- Alfonzo JD, Crother TR, Guetsova ML, Daignan-Fornier B, Taylor MW. **APT1, but not APT2, codes for a functional adenine phosphoribosyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Bacteriol.* 1999; 18:347-352.
- Alfonzo JD, Sahota A, Deeley MC, Ranjekar P, Taylor MW. **Cloning and characterization of the adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene (APT1) from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene.* 1995; 161:81-85.
- Allison AC, Eugui EM. **Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil.** *Immunol Rev.* 1993, 136:5-28.
- Arinbasarova AY, Medentsev AG, Krupyanko VI. **Gossypol Inhibits Electron Transport and Stimulates ROS Generation in *Yarrowia lipolytica* Mitochondria.** *Open Biochem J.* 2012; 6:11-5.
- Arndt, KT, Styles C, and Fink GR, **Multiple global regulators control *HIS4* transcription in yeast.** *Science* 1987, 237: 874–880.
- Ashby SF, Nowell N. **The fungi of stigmatomycosis.** *Ann Bot* 1926; 40:69.83.
- Bacher A, R. Volk, P.J. Keller, H.G. Floss, Q. Le Van, W. Eisenreich y B. Schwarzkopf. **Biosynthesis of flavins and deazaflavins.** *Flavins and Flavoproteins.* 1989:431.
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. **The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29.** *Pflugers Arch.* 2004; 447:735-43.
- Balinsky JB. **Phylogenetic aspects of purine metabolism.** *S Afr Med J.* 1972; 46:993-7.
- Batra LR. **Nematosporaceae (Hemiacomycetidae) taxonomy, pathogenicity distribution and vector relations.** *USDA Technical Bull.* 1973; 1469.8.
- Becerra A, Lazcano A. **The role of gene duplication in the evolution of purine nucleotide salvage pathways.** *Orig Life Evol Biosph.* 1998; 28:539-53.
- Becker MA, Kostel PJ, Meyer LJ. **Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase. Comparison of purified normal and mutant enzymes.** *J Biol Chem* 1975; 250:6822-6830.
- Benito R. **Cariotipo electroforético de *Ashbya gossypii*.** (Trabajo de Grado). Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. 1997.
- Berg M, Van der Veken P, Goeminne A, Haemers A, Augustyns K. **Inhibitors of the purine salvage pathway: a valuable approach for antiprotozoal chemotherapy?** *Curr Med Chem.* 2010; 17:2456-81.
- Brachat S, Dietrich FS, Voegeli S, Zhang Z, Stuart L, Lerch A, Gates K, Gaffney T, Philippsen P. **Reinvestigation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome annotation by comparison to the genome of a related fungus: *Ashbya gossypii*.** *Genome Biol.* 2003; 4:R45.

- Breton A, Pinson B, Couplier F, Giraud MF, Dautant A, Daignan-Fornier B. **Lethal accumulation of guanylic nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae* HPT1-deregulated mutants.** *Genetics*. 2008; 178:815-824.
- de Brouwer AP, van Bokhoven H, Nabuurs SB, Arts WF, Christodoulou J, Duley J. **PRPS1 mutations: four distinct syndromes and potential treatment.** *Am J Hum Genet*. 2010; 86:506-18.
- Burchmore R.J., Wallace L.J., Candlish D., Al-Salabi M.I., Beal P.R., Barrett M.P., Baldwin S.A. and De Koning H.P.. **Cloning heterologous expression and, in situ characterization of the first high affinity nucleobase transporter from a protozoan.** *J. Biol. Chem* 2003; 278: 23502–7
- Byrne KP, Wolfe KH. **The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species.** *Genome Res* 2005; 15:1456-1461.
- Capozzi V, Menga V, Digesu AM, De Vita P, van Sinderen D, Cattivelli L, Fares C, Spano G. **Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta.** *J Agric Food Chem*. 2011; 59:8013-20.
- Carnicero E. **Transformación de *Ashbya gossypii* por electroporación y desarrollo de un sistema homólogo de transformación basado en el gen AgLEU2". (Trabajo de grado).** Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. 1996.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D. **Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals.** *Science* 1999; 284:760-765.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* 1994; 263:802-805.
- Chaudhary K, Darling JA, Fohl LM, Sullivan WJ Jr, Donald RG, Pfefferkorn ER, Ullman B, Roos DS. **Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*.** *J Biol Chem*. 2004; 279:31221-31227.
- Chaudhary K, Donald RGK, Nishi M, Carter D, Ullman B, Roos DS. **Differential localization of alternatively spliced Hypoxanthine-Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase isoforms in *Toxoplasma gondii*.** *J Biol Chem*. 2005; 280:22053-22059.
- Clarke L, Carbon J. **A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome.** *Cell*. 1976; 9:91-99.
- Cliften P, Sudarsanam P, Desikan A, Fulton L, Fulton B, Majors J, Waterston R, Cohen BA, Johnston M. **Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting.** *Science*. 2003; 301:71-76.
- Craig SP, Eakin AE. **Purin salvage enzymes of parasites as targets for structure-based inhibitor design.** *Parasitology Today*. 1997; 13:238-241.
- Daignan-Fornier B, Fink GR. **Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators *BAS1* and *BAS2*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:6746-6750.
- Davidson JD, Feigelson P. **The inhibition of adenosine deaminase by 8-azaguanine in vitro.** *J Biol Chem*. 1956; 223:65-73.

- Davis CA, Ares M Jr. **Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:3262-7.
- Deeley MC. **Adenine deaminase and adenine utilization in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Bacteriol*. 1992; 174:3102-3110.
- Delbrück M, Katzir A, Presti D. **Responses of *Phycomyces* indicating optical excitation of the lowest triplet state of riboflavin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73:1969-1973
- Demain AL. **Riboflavin oversynthesis.** *Annu Rev Microbiol* 1972; 26:369-388.
- Demain AL. **Microbial production of primary metabolites.** *Naturwissenschaften* 1980; 67:582-587.
- Denis V, Boucherie H, Monribot C, Daignan-Fornier B. **Role of the myb-like protein bas1p in *Saccharomyces cerevisiae*: a proteome analysis.** *Mol Microbiol* 1998; 30:557-566.
- Denis V, Daignan-Fornier B. **Synthesis of glutamine, glycine and 10-formyl tetrahydrofolate is coregulated with purine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Gen Genet* 1998; 259:246-255.
- Diallinas G, Gorfinkiel L, Arst HN Jr, Cecchetto G, Scazzocchio C. **Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes.** *J Biol Chem* 1995; 270:8610-22.
- Dietrich FS, Voegeli S, Brachat S, *et al.* **The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome.** *Science* 2004; 304:304-307.
- Downie MJ, Kirk K, Mamoun CB. **Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Eukaryot Cell*. 2008; 7:1231-1237
- Duane W, Hastings JW. **Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria.** *Mol Cell Biochem* 1975; 6:53-64.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL. **Genome evolution in yeasts.** *Nature* 2004; 430:35-44.
- Duley JA, Christodoulou J, de Brouwer AP. **The PRPP synthetase spectrum: what does it demonstrate about nucleotide syndromes?** *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011; 30:1129-39.

- Eli M, Li DS, Zhang WW, Kong B, Du CS, Wumar M, Mamtimin B, Sheyhidin I, Hasim A. **Decreased blood riboflavin levels are correlated with defective expression of RFT2 gene in gastric cancer.** *World J Gastroenterol.* 2012; 18:3112-8.
- Emmerie A. **On the relation between Intake and Excretion of the Flavins.** *Acta Brevia Neerland* 1937; 7:169-171.
- Endo Y, Obata T, Murata D, Ito M, Sakamoto K, Fukushima M, Yamasaki Y, Yamada Y, Natsume N, Sasaki T. **Cellular localization and functional characterization of the equilibrative nucleoside transporters of antitumor nucleosides.** *Cancer Sci.* 2007; 98:1633-1637.
- Escobar-Henriques M, Collart MA, Daignan-Fornier B. **Transcription initiation of the yeast *IMD2* gene is abolished in response to nutrient limitation through a sequence in its coding region.** *Mol Cell Biol* 2003a; 23:6279-6290.
- Escobar-Henriques M, Daignan-Fornier B. **Transcriptional regulation of the yeast gmp synthesis pathway by its end products.** *J Biol Chem* 2001; 276:1523-1530.
- Escobar-Henriques M, Daignan-Fornier B, Collart MA. **The critical cis-acting element required for *IMD2* feedback regulation by GDP is a TATA box located 202 nucleotides upstream of the transcription start site.** *Mol Cell Biol* 2003b; 23:6267-6278.
- Fast LD, Nevola M, Travares J, Reddy HL, Goodrich RP, Marschner S. **Treatment of whole blood with riboflavin plus ultraviolet light, an alternative to gamma irradiation in the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease?** *Transfusion* 2012.
- Fischer M, Bacher A. **Biosynthesis of flavocoenzymes.** *Nat Prod Rep* 2005, 22:324-350.
- Folkers K, Wolaniuk A, Vadhanavikit S. **Enzymology of the response of the carpal tunnel syndrome to riboflavin and to combined riboflavin and pyridoxine.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81:7076-8.
- Forster C, Santos MA, Ruffert S, Kramer R, Revuelta JL. **Physiological consequence of disruption of the *VMA1* gene in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*.** *J Biol Chem* 1999; 274:9442-9448.
- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma LJ, Smirnov S, Purcell S, Rehman B, Elkins T, Engels R, Wang S, Nielsen CB, Butler J, Endrizzi M, Qui D, Ianakiev P, Bell-Pedersen D, Nelson MA, Werner-Washburne M, Selitrennikoff CP, Kinsey JA, Braun EL, Zelter A, Schulte U, Kothe GO, Jedd G, Mewes W, Staben C, Marcotte E, Greenberg D, Roy A, Foley K, Naylor J, Stange-Thomann N, Barrett R, Gnerre S, Kamal M, Kamvysselis M, Mauceli E, Bielke C, Rudd S, Frishman D, Krystofova S, Rasmussen C, Metzenberg RL, Perkins DD, Kroken S, Cogoni C, Macino G, Catcheside D, Li W, Pratt RJ, Osmani SA, DeSouza CP, Glass L, Orbach MJ, Berglund JA, Voelker R, Yarden O, Plamann M, Seiler S, Dunlap J, Radford A, Aramayo R, Natvig DO, Alex LA, Mannhaupt G, Ebbole DJ, Freitag M, Paulsen I, Sachs MS, Lander ES, Nusbaum C, Birren B. **The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*.** *Nature.* 2003; 422:859-868.
- Gauman EA. **Comparative morphology of fungi.** *The fungi.* 1952.

- Gauthier S, Couplier F, Jourden L, Merle M, Beck S, *et al.*, **Co-regulation of yeast purine and phosphate pathways in response to adenylic nucleotide variations.** *Mol. Microbiol.* 2008; 68:1583–1594.
- Gedvilaite A, Sasnauskas K. **Control of the expression of the ADE2 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr Genet* 1994; 25:475-479.
- Ghérardi A, Sarciron ME, Pétavy AF, Peyron F. **Purine pathway enzymes in a cyst forming strain of *Toxoplasma gondii*.** *Life Sci.* 1999; 65:1733-1738.
- Giani S, Manoni M, Breviario D. **Cloning and transcriptional analysis of the ADE6 gene of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene* 1991; 107:149-154.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. **Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure.** *Yeast.* 1995; 11:355-360.
- Giorgi I, Biagi G, Bianucci AM, Borghini A, Livi O, Leonardi M, Pietra D, Calderone V, Martelli A. **N6-1,3-diphenylurea derivatives of 2-phenyl-9-benzyladenines and 8-azaadenines: synthesis and biological evaluation as allosteric modulators of A2A adenosine receptors.** *Eur J Med Chem.* 2008; 43:1639-1647.
- Gladfelter AS, Hungerbuehler AK, Philippsen P. **Asynchronous nuclear division cycles in multinucleated cells.** *J Cell Biol.* 2006; 172:347-362.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. **Life with 6000 genes.** *Science.* 1996; 274:546, 563-567.
- Goodwin TW and Pendlington S. **Studies on the biosynthesis of riboflavin. Nitrogen metabolism and flavinogenesis in *Eremothecium ashbyii*.** *Biochem J.* 1954; 57: 631–641.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. **Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:4645-4649.
- De Groot A, Whitehead EP, Heslot H, Poirier L. **The substrate specificity of purine phosphoribosyltransferases in *Schizosaccharomyces pombe*.** *Biochem J.* 1971; 122:415-420.
- Guetsova ML, Crother TR, Taylor MW, Daignan-Fornier B. **Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* XPT1 gene encoding xanthine phosphoribosyl transferase.** *J Bacteriol.* 1999; 181:2984-2986.
- Guetsova ML, Lecoq K, Daignan-Fornier B. **The isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants that constitutively express purine biosynthetic genes.** *Genetics* 1997; 147:383-397.
- Guillermond A, Fontaine, M., raffy, A. *C.R. Acad. Sci.* 1935; 201:1077.
- Gutiérrez JR. **Estudio del metabolismo de inosín 5' monofosfato como precursor para la biosíntesis de riboflavina en *Ashbya gossypii*.** *Tesis doctoral* Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca 2005.
- Hassan HF, Combs GH. **Purine salvage by *Acanthamoeba castellanii*** *Int J Parasitol* 1987; 17:1267-72.
- He B, Shiau A, Choi KY, Zalkin H, Smith JM. **Genes of the *Escherichia coli* pur regulon are negatively controlled by a repressor-operator interaction.** *J Bacteriol.* 1990; 172:4555–62

- Henikoff S, Smith JM. **The human mRNA that provides the N-terminus of chimeric G6PD encodes GMP reductase.** *Cell.* 1989; 58:1021-2.
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ, Tzagoloff A. **Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites.** *Yeast.* 1986; 2:163-7.
- Holmes EW, Pehlke DM, Kelley WN. **Human IMP dehydrogenase. Kinetics and regulatory properties.** *Biochim Biophys Acta* 1974; 364:209-217.
- Horvath R. **Update on clinical aspects and treatment of selected vitamin-responsive disorders II (riboflavin and CoQ₁₀).** *J Inherit Metab Dis.* 2012; 35:679-87.
- Horwitt, M.K., Harvey, C.C., Hills, O.W. and Liebert, E. **Correlation of urinary excretion of riboflavin with dietary intake and symptoms of ariboflavinosis.** *J. Nutr.* 1950; 42: 247-264.
- Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O. **Collagen cross-linking: current status and future directions.** *J Ophthalmol.* 2012; 2012:406850.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. **Global analysis of protein localization in budding yeast.** *Nature.* 2003; 425:686-91.
- Hyle JW, Shaw RJ, Reines D. **Functional distinctions between IMP dehydrogenase genes in providing mycophenolate resistance and guanine prototrophy to yeast.** *J Biol Chem.* 2003; 278:28470-8.
- Iglesias-Gato D, Martin-Marcos P, Santos MA, Hinnebusch AG, and Tamame M. **Guanine nucleotide pool imbalance impairs multiple steps of protein synthesis and disrupts GCN4 translational control in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 2011; 187: 105–122.
- Ikeda K, Suzuki H, Nakagawa S. **Human brain hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase: structural and functional comparison with erythrocyte hypoxanthine guanine phosphorybosyltransferase.** *Int J Biochem.* 1986; 18:575-581.
- Jenks MH, O'Rourke TW, and Reines D. **Properties of an intergenic terminator and start site switch that regulate *IMD2* transcription in yeast.** *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28: 3883–3893.
- Jelesko JG. **An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism.** *Front Plant Sci.* 2012; 3:78
- Ji A, Wang J, Yang J, Wei Z, Lian C, Ma L, Ma L, Chen J, Qin X, Wang Ld, Wei W. **Functional SNPs in human *C20orf54* gene influence susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011; 12:3207-12.
- Jimenez A, Santos MA, Pompejus M, Revuelta JL. **Metabolic Engineering of the Purine Pathway for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii*.** *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:5743-5751.
- Jiménez A, Santos MA, Revuelta JL. **Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase activity affects growth and riboflavin production in *Ashbya gossypii*.** *BMC Biotechnol.* 2008; 8:67.
- Johnson DH, Edström JE, Burnett JB, Friedman TB. **Cloning of a *Drosophila melanogaster* adenine phosphoribosyltransferase structural gene and deduced amino acid sequence of the enzyme.** *Gene.* 1987; 59:77-86.
- Juárez O, Nilges MJ, Gillespie P, Cotton J, Barquera B. **Riboflavin is an active redox cofactor in the Na⁺-pumping NADH: quinone oxidoreductase (Na⁺-NQR) from *Vibrio cholerae*.** *J Biol Chem.* 2008; 283:33162-7

- Kaplan L, Demain AL. **Nutritional studies on riboflavin overproduction by *A. gossypii***. *Ahearn DS (ed) Recent Trends in yeast re-search*. Georgia State University Press, Atlanta. 1970; 137-159
- Karatza P, Frillingos S. **Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli***. *Mol. Membr. Biol.* 2005; 22:251-61.
- Karos M, Vilariño C, Bollschweiler C, Revuelta JL. **A genome-wide transcription analysis of a fungal riboflavin overproducer**. *J Biotechnol.* 2004; 11369-76.
- Karrer P, Von Euler H., Malurberg M., Schöpp K., Benz F., Becker B., Frei P. *Chim. Acta* 1935; 18:522.
- Kato T, Park EY. **Riboflavin production by *Ashbya gossypii***. *Biotechnol Lett.* 2012; 34:611-8.
- Keebaugh AC, Sullivan RT; NISC Comparative Sequencing Program, Thomas JW. **Gene duplication and inactivation in the HPRT gene family**. *Genomics.* 2007; 89:134-142
- Kellis M, Birren BW, Lander ES. **Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *Nature.* 2004; 428:617-624.
- Klein ML, Fulco AJ. **Critical residues involved in FMN binding and catalytic activity in cytochrome P450BM-3**. *J Biol Chem* 1993; 268:7553-7561.
- Koehler RN, Rachfall N, and Rolfes RJ. **Activation of the ADE Genes Requires the Chromatin Remodeling Complexes SAGA and SWI/SNF**. *Eukaryot. Cell* 2007; p. 6:1474–1485.
- Korn ED, Buchanan JM. **Biosynthesis of the purines. VI. Purification of liver nucleoside phosphorylase and demonstration of nucleoside synthesis from 4-amino-5-imidazolecarboxamide, adenine, and 2, 6-diaminopurine**. *J Biol Chem.* 1955; 217:183-91.
- Koser SA. **Vitamin requirements of bacteria and yeasts**. *Charles C. Thomas, Springfield, IL.* 1968.
- Kuehner JN, Brow DA. **Regulation of a eukaryotic gene by GTP-dependent start site selection and transcription attenuation**. *Mol Cell.* 2008; 31:201-11.
- Kuhn R, Reinemund K., Weygand F y Stróbele R. *Chem. Ber* 1935; 68:1765-1774.
- Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CK, McIntosh EM, Reidy JA. **International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability**. *Mutat Res* 1994; 318:1-64.
- Lago BD, Kaplan L. **Vitamin fermentations: B₂ y B₁₂**. *Adv Biotechnol.* 1981; 3:241-246
- Larralde R, Robertson MP, Miller SL. **Rates of decomposition of ribose and other sugars: implications for chemical evolution**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:8158-60.
- Lecoq K, Belloc I, Desgranges C, Daignan-Fornier B. **Role of adenosine kinase in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the ADO1 gene and study of the mutant phenotypes**. *Yeast.* 2001; 18:335-342.

- Lecoq K, Konrad M, Daignan-Fornier B. **Yeast GMP kinase mutants constitutively express AMP biosynthesis genes by phenocopying a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase defect.** *Genetics*. 2000; 156:953-961.
- Lesch M, Nyhan WL. **A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function.** *Am J Med*. 1964; 36:561-70.
- Lim SH, Choi JS, Park EY. **Microbial Production of Riboflavin Using Riboflavin Overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An Overview.** *Biotechnol. Bioprocess Eng* 2001; 6:75-88.
- Liu X, Qian W, Liu X, Qin H, Wang D. **Molecular and functional analysis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*.** *New Phytol*. 2007; 175:448-461.
- Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR. **Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*. 1998; 14:953-961.
- Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B. **Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics*. 2012; 190:885-929.
- Maizels M, Blumenfeld A, Burchette R. **A combination of riboflavin, magnesium, and feverfew for migraine prophylaxis: a randomized trial.** *Headache*. 2004; 44:885-90.
- Mansfield TA, Schultes NP, Mouran GS. **AtAzc1 and AtAzc2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*.** *FEBS Lett*. 2009; 583:481-486.
- Mantsala P, Zalkin H. **Glutamine nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* ADE4 encoding phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase.** *J Biol Chem* 1984; 259:8478-8484.
- Mateos L. **Papel del factor de transcripción *BASI* en la producción de vitamina B₂ en el hongo *Ashbya gossypii*.** *Tesis doctoral* Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. 2006.
- Mateos L, Jiménez A, Revuelta JL, Santos MA. **Purine biosynthesis, riboflavin production, and trophic-phase span are controlled by a Myb-related transcription factor in the fungus *Ashbya gossypii*.** *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72:5052-5060
- McKeran R. O. y Watts R. W. E. **Use of phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes to study effects of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) deficiency on polynucleotide and protein synthesis in the Lesh-Nyhan syndrome.** *J Med Genet* 1976; 13:91-95.
- Meade RE, Pollard HL, Rodgers NE. U.S. Patent 2,433,680. 1947
- Mehta SU, Mattoo AK, Modi VV. **Ribitol and flavinogenesis in *Eremothecium ashbyii*.** *Biochem J* 1972; 130:159-166.
- Meng Q, Grosovsky AJ, Shi X, Walker VE. **Mutagenicity and loss of heterozygosity at the *APRT* locus in human lymphoblastoid cells exposed to 3'-azido-3'-deoxythymidine.** *Mutagenesis*. 2000; 15:405-410.
- Mickelson MN. **The metabolism of glucose by *Ashbya gossypii*.** *J Bacteriol*. 1950; 59:659-66.

- Miller SL, Cleaves HJ. **Prebiotic Chemistry on the Primitive Earth.** *Sistemas Biology.* 2007; Chapter 1.
- Ming H, Lara Pizarro AV, Park EY. **Application of waste activated bleaching earth containing rapeseed oil on riboflavin production in the culture of *Ashbya gossypii*.** *Biotechnol Prog.* 2003; 19:410-7.
- Mohrmann L, and Verrijzer CP. **Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes.** *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1681:59–73.
- Monschau N, Sahm H, Stahmann K. **Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii*.** *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:4283-90.
- Mosch HU, Scheier B, Lahti R, Mantsala P, Braus GH. **Transcriptional activation of yeast nucleotide biosynthetic gene *ADE4* by *GCN4*.** *J Biol Chem* 1991; 266:20453-20456.
- Mouritsen H, Feenders G, Liedvogel M, Kropp W. **Migratory birds use head scans to detect the direction of the earth's magnetic field.** *Curr Biol.* 2004; 14:1946-9.
- Muirhead KM, Bishop SH. **Purification of adenylosuccinate synthetase from rabbit skeletal muscle.** *J Biol Chem* 1974; 249:459-464.
- Nelissen B, Mordant P, Jonniaux JL, De Wachter R, Goffeau A. **Phylogenetic classification of the major superfamily of membrane transport facilitators, as deduced from yeast genome sequencing.** *FEBS Lett.* 1995; 377:232-6.
- Neuvéglise C, Bon E, Lépingle A, Wincker P, Artiguenave F, Gaillardin C, Casarégola S. **Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 9. *Saccharomyces kluyveri*.** *FEBS Lett.* 2000; 487:56-60.
- Nourani A, Utley RT, Allard S, and Cote J. **Recruitment of the NuA4 complex poises the *PHO5* promoter for chromatin remodeling and activation.** *EMBO J.* 2004; 23:2597–2607.
- Nussbaum RL, Caskey CT. **Purification and characterization of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochemistry* 1981; 20:4584-4590.
- Obert M, Pfeifer P, Sernetz M. **Microbial growth patterns described by fractal geometry.** *J Bacteriol.* 1990; 172:1180-5.
- Oro J, Kimball AP. **Synthesis of Purines Under Possible Primitive Earth Conditions. I. Adenine From Hydrogen Cyanide** *Arch. Biochem. Biophys.* 1961; 94, 217.
- Ozbas T. KT. **Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyii* and *Ashbya gossypii*.** *Enzyme Microb. Technol* 1986; 8:593-596.
- Pantazopoulou A, Diallinas G. **Fungal nucleobase transporters.** *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31:657-75.
- Pataki L, Matkovics B, Novák Z, Martonyi E, Molnár A, Varga I, Román F. **Riboflavin (vitamin B2) treatment of neonatal pathological jaundice.** *Acta Paediatr Hung.* 1985; 26:341-5.
- Perlman D. **Microbial Process for riboflavin production.** *Microbial technology*, vol I. ed. H.J. Pepplev & D. Pevlman, Academic Press, New York 1979; 521-527

- Pombert JF, Selman M, Burki F, Bardell FT, Farinelli L, Solter LF, Whitman DW, Weiss LM, Corradi N, Keeling PJ. **Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:12638-43.
- Pompeius, M., Santos, M. A., and Revuelta, J.L. **Orotidine 5'-Phosphate decarboxylase-gene, gene construct containing said gene and the utilization thereof.** *WO9936432* 1998
- Powers HJ. **Riboflavin (vitamin B-2) and health.** *Am J Clin Nutr* 2003; 77:1352-1360.
- Presti DE. **The photobiology of carotenes and flavins.** *Symp Soc Exp Biol* 1983; 36:133-180
- Prillinger H, Schweigkofler W, Breitenbach M, *et al.* **Phytopathogenic filamentous (*Ashbya*, *Eremothecium*) and dimorphic fungi (*Holleya*, *Nematospora*) with needle-shaped ascospores as new members within the *Saccharomycetaceae*.** *Yeast* 1997; 13:945-960.
- Ratnayake-Lecamwasam M, Serror P, Wong KW, and Sonenshein AL. ***Bacillus subtilis* CodY represses early stationary-phase genes by sensing GTP levels.** *Genes Dev.* 2001; 15:1093–1103.
- Rebora K, Desmoucelles C, Borne F, Pinson B, Daignan-Fornier B. **Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate.** *Mol Cell Biol* 2001; 21:7901-7912.
- Rebora K, Laloo B, Daignan-Fornier B. **Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule.** *Genetics* 2005; 170:61-70.
- Revuelta Doval JL, SG, Maria Angeles; Garcia-Ramirez, José Javier; González-Hernández, Gloria Angélica; Buitrago Serna, Maria José. **Riboflavin synthesis in yeast.** *WO 9411515* 1997.
- Revuelta JL, Buitrago Serna, M.J., y Santos, M.A. **Riboflavin synthesis in fungi.** *WO 95/26406* 1995.
- De la Riva L, Badia J, Aguilar J, Bender RA, Baldoma L. **The hpx genetic system for hypoxanthine assimilation as a nitrogen source in *Klebsiella pneumoniae*: gene organization and transcriptional regulation.** *J. Bacteriol.* 2008; 190:7892-903.
- Rivas CI, Zúñiga FA, Salas-Burgos A, Mardones L, Ormazabal V, Vera JC. **Vitamin C transporters.** *J Physiol Biochem.* 2008; 64:357-75
- Rives RS, Irwin D, Mandel HG. **Purine analogs revisited: interference in protein formation.** *Adv Enzyme Regul.* 1982; 20:351-73.
- Rosemeyer H. **The chemodiversity of purine as a constituent of natural products.** *Chem Biodivers.* 2004; 1:361-401.
- Sagot I, Schaeffer J, Daignan-Fornier B. **Guanylic nucleotide starvation affects *Saccharomyces cerevisiae* mother-daughter separation and may be a signal for entry into quiescence.** *BMC Cell Biol.* 2005; 6:24.
- Said HM. **Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease.** *Biochem J.* 2011; 437:357-72.

- Saint-Marc C, Daignan-Fornier B. ***GUDI (YDL238c) encodes Saccharomyces cerevisiae guanine deaminase, an enzyme expressed during post-diauxic growth.*** *Yeast*. 2004; 21:1359-1363.
- Saint-Marc C, Pinson B, Couplier F, Jourdren L, Lisova O, Daignan-Fornier B. **Phenotypic consequences of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics*. 2009; 183:529-538
- Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR. **Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin.** *Biochemistry* 2000; 39:9401-9410.
- Sancar A. **Mechanisms of DNA excision repair.** *Science* 1994; 266:1954-1956.
- Sancar A. **Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.** *Chem Rev*. 2003; 103:2203-37.
- Santos MA, Jimenez A, Revuelta JL. **Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem*. 2000; 275:28618-24.
- Santos MA, and J.L. Revuelta. **Microbial production of vitamin B2.** *Microorganisms for health care, food and enzyme production*. 2003.
- Santos MA ML, Stahmann KP and Revuelta JL. **Insertional Mutagenesis in the Vitamin B2 Producer Fungus *Ashbya gossypii*.** *Methods in Biotechnology: Microbial process and products*. Humana Press, Inc. 2005; 18:283-300.
- Sanyal NK, Roychoudhury M, Ojha RP. **Interaction energy studies of an antimetabolite 8-azaguanine during transcription.** *J Theor Biol*. 1985; 116(2):195-9.
- Scannell D. R., Butler G. y Wolfe K. H. **Yeast genome evolution – the origin of the species.** *Yeast* 2007; 24:929-942.
- Schmidt R, Wiegand H, Reichert U. **Purification and characterization of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eur J Biochem*. 1979; 93:355-361.
- Schlupen C, Santos MA, Weber U, de Graaf A, Revuelta JL, Stahmann KP. **Disruption of the *SHM2* gene, encoding one of two serine hydroxymethyltransferase isoenzymes, reduces the flux from glycine to serine in *Ashbya gossypii*.** *Biochem J* 2003; 369:263-273.
- Seegmiller JE, Rosenbloom FM, Kelley WN. **Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis.** *Science*. 1967; 155:1682-4.
- Shaw RJ, Wilson JL, Smith KT, and Reines D. **Regulation of an IMP dehydrogenase gene and its overexpression in drug-sensitive transcription elongation mutants of yeast.** *J. Biol. Chem*. 2001; 276:32905–32916.
- Sinha SC, Smith JL. **The PRT protein family.** *Curr Opin Struct Biol*. 2001; 11:733-9.
- Smith LE, Parks KK, Hasegawa LS, Eastmond DA, Grosovsky AJ. **Targeted breakage of paracentromeric heterochromatin induces chromosomal instability.** *Mutagenesis*. 1998; 13:435-43.

- Smithers GW, O'Sullivan WJ. **Hypoxanthine phosphoribosyltransferase: radiochemical assay procedures for the forward and reverse reactions.** *Anal Biochem.* 1985; 145:14-20.
- Som I, Mitsch RN, Urbanowski JL, and Rolfes RJ. **DNA-bound Bas1 recruits Pho2 to activate ADE genes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eukaryot. Cell* 2005; 4:1725–1735.
- Springer C, Kunzler M, Balmelli T, and Braus GH. **Amino acid and adenine cross-pathway regulation act through the same 59-TGACTC-39 motif in the yeast HIS7 promoter.** *J. Biol. Chem.* 1996; 271:29637–29643.
- Stahmann, K. P., H. N. Arst, Jr., H. Althofer, J. L. Revuelta, N. Monschau. C. Schlupen, C. Gatgens, A. Wiesenburg, and T. Schlosser. **Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light.** *Environ. Microbiol.* 2001; 3:545–550.
- Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H. **Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 53:509-516.
- Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients Food and Nutrition Board Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.** *National Academies Press* 1998.
- Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, Wentz SR, and O'Shea EK. **Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates.** *Science* 2003; 299:114–116.
- Steiner S, Philippsen P. **Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*.** *Mol Gen Genet* 1994; 242:263-271.
- Steiner S, Wendland J, Wright MC, Philippsen P. **Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*.** *Genetics* 1995; 140:973-987.
- Steinmetz EJ, Warren CL, Kuehner JN, Panbehi B, Ansari AZ et al., **Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase.** *Mol. Cell* 2006; 24:735–746.
- Stetten MR, Fox CL. **An amine formed by bacteria during sulfonamide bacteriostasis.** *J Biol Chem.* 1945; 161:333-49.
- Stuer-Lauridsen B, Nygaard P. **Purine salvage in Two Halophilic Archaea: Characterization of Salvage Pathways and Isolation of Mutants Resistant to Purine Analogs.** *JBC* 1998; 180:457-463.
- Sun Z, Zhu Y, Wang PP, Roebouthan B, Zhao J, Zhao J, Dicks E, Cotterchio M, Buehler S, Campbell PT, McLaughlin JR, Parfrey PS. **Reported intake of selected micronutrients and risk of colorectal cancer: results from a large population-based case-control study in Newfoundland, Labrador and Ontario, Canada.** *Anticancer Res.* 2012; 32:687-96.
- Suzuki T, Takahashi E. **Metabolism of Xanthine and Hypoxanthine in the Tea Plant (*Thea sinensis* L.)** *Biochem J.* 1975; 146:79-85.

- Tawfik, D.S. **Messy biology and the origins of evolutionary innovations.** *Nat Chem Biol.* 2010; 6:692-696.
- Tice-Baldwin K, Fink GR, and Arndt KT. **BAS1 has a Myb motif and activates *HIS4* transcription only in combination with BAS2.** *Science* 1989; 246: 931–935.
- Torres RJ, Puig JG. **Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome.** *Orphanet J Rare Dis* 2007; 8:48-49.
- Ulman B, Carter D. **Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase as a therapeutic target in protozoal infections.** *Infectious Agents and Diseases* 1995; 4:29-40.
- Valerius O, Brendel C, Wagner C, Krappmann S, Thoma F, and Braus GH. **Nucleosome position-dependent and -independent activation of *HIS7* expression in *Saccharomyces cerevisiae* by different transcriptional activators.** *Eukaryot. Cell* 2003; 2:876–885.
- Vickers MF, Yao SY, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. **Nucleoside transporter proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Demonstration of a transporter (FUI1) with high uridine selectivity in plasma membranes and a transporter (FUN26) with broad nucleoside selectivity in intracellular membranes.** *J Biol Chem.* 2000; 275:25931-8.
- Vlanti A, Diallianas. **The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis.** *Mol Microbiol.* 2008; 68:959-77.
- de Vogel S, Schneede J, Ueland PM, Vollset SE, Meyer K, Fredriksen A, Midttun Ø, Bjørge T, Kampman E, Bretthauer M, Hoff G. **Biomarkers related to one-carbon metabolism as potential risk factors for distal colorectal adenomas.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20:1726-35.
- Wach A, Brachat A, Alberti-Segui C, Rebischung C, Philippsen P. **Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast.* 1997; 13:1065-75.
- Wagner R, Straub ML, Souciet JL, Potier S, de Montigny J. **New plasmid system to select for *Saccharomyces cerevisiae* purine-cytosine permease affinity mutants.** *J Bacteriol.* 2001; 183:4386-8.
- Walther A, Wendland J. **Septation and cytokinesis in fungi.** *Fungal Genet Biol* 2003; 40:187-196.
- Wanner RL. **Effects of commercial processing of milk and milk products on their nutrients content.** Harris RS, Loesecke HV (eds), *The nutritional evaluation of food processing.* John Wiley, New York 1960; 173-196.
- Watts RW, McKeran RO, Brown E, Andrews TM, Griffiths MI. **Clinical and biochemical studies on treatment of Lesch-Nyhan syndrome.** *Arch Dis Child.* 1974; 49:693-702.
- Weber E, Rodriguez C, Chevallier MR, Jund R. **The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and reduced protein sequence of the *FCY2* gene product.** *Mol Microbiol* 1990; 4:585-596.
- Wendland J. **Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast.** *Fungal Genet Biol* 2001; 34:63-82.

- Wendland J, Ayad-Durieux Y, Knechtle P, Rebischung C, Philippsen P. **PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii***. *Gene* 2000; 242:381-391.
- Wendland J, Philippsen P. **Determination of cell polarity in germinated spores and hyphal tips of the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii* requires a rhoGAP homolog**. *J Cell Sci* 2000; 113:1611-1621.
- Wendland J, Walther A. ***Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology**. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:421-429.
- Wendland J, Dünkler A, Walther A. **Characterization of α -factor pheromone and pheromone receptor genes of *Ashbya gossypii***. *FEMS Yeast Res.* 2011; 11:418-29.
- Wendland J, Walther A. **Genome Evolution in the *Eremothecium* Clade of the *Saccharomyces* Complex Revealed by Comparative Genomics**. *G3 (Bethesda)*. 2011; 1:539-48
- Werner AK, Witte CP. **The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism**. *Trends Plant Sci.* 2011; 16:381-7.
- Wickerhman LS, Flickinger, M. H., and Johnston, R. M. **Production of riboflavin by *Ashbya gossypii***. *Arch. Biochem* 1946; 9:95-98.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P. **The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe***. *Nature*. 2002; 415:871-880.
- Woods RA, Roberts DG, Stein DS, Filpula D. **Adenine phosphoribosyltransferase mutants in *Saccharomyces cerevisiae***. *J Gen Microbiol.* 1984; 130:2629-2637.
- Wolken JJ. ***Euglena*: the photoreceptor system for phototaxis**. *J Protozool.* 1977; 24:518-22.
- Xi H, Schneider BL, Reitzer L. **Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage**. *J Bacteriol* 2000; 182:5332-5341.
- Yao SY, Ng AM, Vickers MF, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. **Functional and molecular characterization of nucleobase transport by**

recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J Biol Chem.* 2002; 277:24938-48.

- Yu D, Ellis HM, Lee E, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. **An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*.** *PNAS.* 2000; 11:5978-5983.
- Zalacain M, Gonzalez A, Guerrero MC, Mattaliano RJ, Malpartida F, Jimenez A. **Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*.** *Nucleic Acids Res* 1986; 14:1565-1581.
- Zhang P, Zhu X, Huang F, Liu Y, Zhang J, Lu Y, Ruan Y. **Suppression of jasmonic acid-dependent defense in cotton plant by the mealybug *Phenacoccus solenopsis*.** *PLoS One.* 2011; 6:e22378.

