



REGULACIÓN DEL SISTEMA CUTINOLÍTICO EN *ASPERGILLUS NIDULANS*

Eva Bermúdez, Carolina Peña, Amelia Farrés. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, México DF, 04510, evabermudez5@gmail.com

Aspergillus nidulans, cutinasa, regulación.

Introducción. Las cutinasas son hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (CHE) que juegan un papel importante en los mecanismos de colonización e infección de organismos fitopatógenos teniendo como sustrato principal a la cutina, el componente lipídico mayoritario de la cutícula de las plantas (1). En *Aspergillus nidulans* están codificados 4 genes putativos de cutinasas (ANCUT 1, 2, 3 y 4), de los que no existe mucha información sobre sus condiciones de expresión y regulación aunque se cree que están relacionadas con el metabolismo de lípidos (2).

Por tanto, en este trabajo se pretende determinar los niveles de expresión de las 4 cutinasas utilizando como fuentes de carbono sustratos que pueden actuar como represores o inductores de estas enzimas; así mismo se estudiará el efecto de dos reguladores del metabolismo de lípidos (*farA* y *farB*) sobre estos genes para proponer un modelo regulatorio.

Metodología. *Aspergillus nidulans* fue crecido 24 h en un medio mínimo (3) donde se varió la fuente de carbono original (glucosa 0.5%) por los posibles efectores. El micelio de estos cultivos fue utilizado para la extracción de ARN total con TRIzol y posteriormente se sintetizó ADNc utilizando la "SuperScript Reverse Transcriptase" y oligos dT. El ADNc fue usado como templado para reacciones multiplex de qPCR donde se detectaron los niveles de expresión utilizando como gen endógeno la subunidad 1 de la ubiquitina. Los niveles de expresión se compararon con la actividad de las proteínas observadas en zimogramas revelados con acetato de α -naftilo (α -NA) y Fast Red (FR)(4).

Resultados. De las fuentes de carbono ensayadas, fue en cutina donde se observó una mayor expresión de los

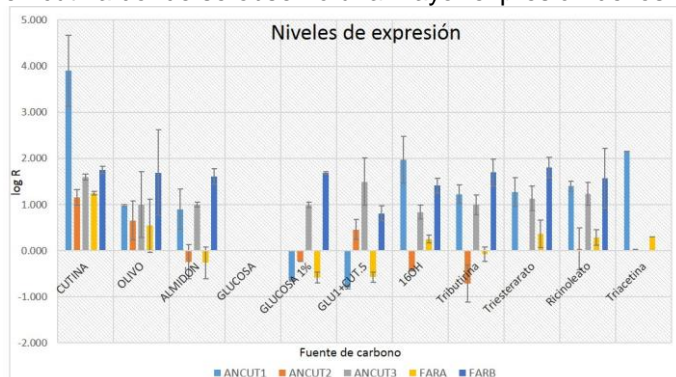


Fig. 1 Cuantificación relativa de los genes *ancut1*, *ancut2*, *ancut3*, *farA* y *farB* bajo diferentes fuentes de carbono incluyendo los medios en los que se aumenta la concentración del represor. Se representa el log R (número de cambio) tomando como condición control el medio con glucosa al 0.5%.

Genes detectados mientras que se observó que existe represión catabólica (RCC) en medios con glucosa al 1% y almidón (Fig. 1). De las cuatro cutinasas, *ancut1* es el gen que más varía su expresión; detectándose hasta 10,000 veces más en cutina y 100 veces menos con glucosa al 1% en el medio; en cambio, los genes *ancut2* y *ancut3* no varían significativamente sus niveles de expresión por lo que su condición parece ser constitutiva. Además, no fue posible detectar *ancut4* en ningún medio. El factor regulatorio *farA* se expresa con sustratos lipídicos y se reprime con glucosa al 1% y *farB* no presenta cambios en su expresión.

Al comparar lo anterior con la actividad de CHE observada en zimogramas (Fig.2) se observa una correlación ya que los medios con cutina y aceite de oliva presentaron una mayor actividad seguido de medios con fuentes lipídicas más complejas. Sin embargo, es necesario contar con anticuerpos específicos para cada cutinasa para detectar su presencia en los extractos.

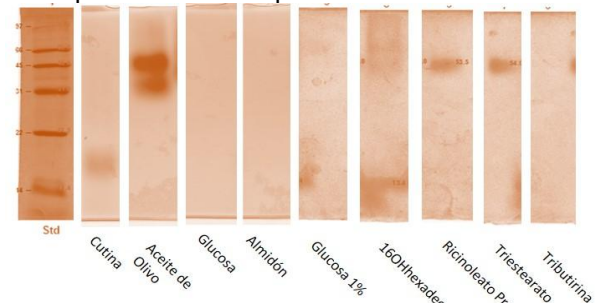


Fig. 2 Actividad "in situ" de esterasa en geles SDS-PAGE de los extractos crudos liofilizados de los diferentes medios utilizados. El zimograma fue revelado con α -NA y FR. Carril 1: Low Range Protein Estándar (BioRad) revelado con tinción de plata.

Conclusiones. ANCUT1 y *farA* se sobreexpresan con cutina y sus monómeros, ambos presentan RCC en presencia de glucosa. ANCUT2, ANCUT3 y *farB* presentaron una expresión constitutiva y ANCUT4 no fue detectada en ninguna condición ensayada. La expresión de cutinasas en *A. nidulans* se asemeja a lo encontrado para *F. solani* (5).

Agradecimiento. CONACyT proyecto 153500.

Bibliografía.

1. Carvalho CML, Aires-Barros MR, Cabral JMS (1998), *Electron J Biotechnol* 1(3):160-173
2. Hynes MJ, Murray SL, Duncan A, Khew GS y Davis MA (2006) *Eukaryot Cell* 5(5):794-805.
3. Käfer E y TW Hill (2001). *Fungal Genetics Newsletter*. 48:20-21.
4. Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S, RD Schmid. (2005). *Appl Microbiol Biotechnol*. 67: 59-69.
5. Kämper, J. T., Kämper, U., Rogers, L. M., & Kolattukudy, P. E. (1994). *J. Biol. Chem.*, 269(12): 9195-9204.