



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL SISTEMA CUTINOLÍTICO EN
ASPERGILLUS NIDULANS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

EVA PATRICIA BERMÚDEZ GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. XÓCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Febrero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 312 del Conjunto E, en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia.

RECONOCIMIENTOS

A la Doctora Amelia Farrés por su apoyo y guía a lo largo de mi formación profesional.

A la Doctora Carolina Peña Montes por la asesoría para la implementación de técnicas de qPCR multiplex.

A la Q. A. Cynthia Bastida por su apoyo en la caracterización de la AN CUT4 como parte de su tesis de licenciatura.

A la Doctora Cristina Silva Pereira y a la Doctora Isabel Martins del Applied and Environmental Mycology Lab del Instituto de Tecnología Química e Biológica de la Universidade Nova de Lisboa en Portugal por su asesoría para la implementación de técnicas de proteómica y AT-FTIR llevadas a cabo durante la estancia doctoral en su laboratorio.

Al Doctor Michael Hynes de la Universidad de Melbourne en Australia y el Doctor Jesús Aguirre del Instituto de Fisiología Celular por la donación de las cepas mutantes utilizadas en este trabajo.

A los integrantes del Comité Tutor:

Dra. Xóchitl Pérez Martínez Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Sergio Sánchez Esquivel Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Por su apoyo y asesoría a lo largo de cada una de las etapas de este proyecto.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de los proyectos CONACYT 153500, PAIP Facultad de Química 5000-9095, PAPIIT IN217414 y PAPIIT IN228316.

Se agradece al CONACYT por la Beca de Doctorado otorgada y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el financiamiento para la realización de la estancia doctoral y para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

Al Jurado Asignado:

Presidente	Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Wilhelm L. Hansberg y Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Norma Adriana Valdez Cruz	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
Las cutinasas como parte de las α/β hidrolasas. Generalidades.....	2
Estructura y función.	2
Cutina. El sustrato natural de las cutinasas.....	3
Estructura y composición de la cutina.	3
La función <i>in vivo</i> de las cutinasas y algunas de sus aplicaciones.....	6
El papel de las cutinasas como mecanismo de infección.....	6
Aplicaciones de cutinasas. Su potencial industrial y biotecnológico.	8
Hongos fitopatógenos, principales organismos productores de cutinasas.....	10
El género <i>Aspergillus</i>	12
<i>Aspergillus nidulans</i> como modelo biotecnológico.....	16
La producción de cutinasas en <i>A. nidulans</i>	17
Regulación de cutinasas.	19
Efecto de la fuente de carbono	19
Factores transcripcionales involucrados en la regulación de cutinasas	23
ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO	27
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Material biológico utilizado.....	32
Preparación de los medios de cultivo.	32
Conservación de las cepas.....	33
Reactivación de las cepas	34
Determinación de las condiciones de estrés oxidativo. Optimización del Medio de Inducción de Estrés Oxidativo (MIEO).....	34

Extracción de RNA total.....	35
Preparación de geles de agarosa/formaldehido	38
Síntesis de cDNA.....	39
Medición de los Niveles de Expresión de los genes de cutinasas bajo distintas condiciones de crecimiento.....	40
Análisis de las secuencias regulatorias de los genes de cutinasas. Búsqueda de sitios de unión de Factores regulatorios.....	40
Cuantificación de proteína en microplaca.....	41
Determinación de actividad tipo carboxilesterasa (CEH) en microplaca. Método cualitativo y cuantitativo.	41
Obtención del perfil de proteínas y zimogramas e identificación de las proteínas de interés. 42	
Ensayos cutinolíticos	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
PARTE 1. IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA INDUCCIÓN Y LA REPRESIÓN DE CUTINASAS EN <i>A. NIDULANS</i>	45
Cuantificación de la Expresión Génica mediante qRT-PCR Multiplex.....	45
Efecto de distintas fuentes lipídicas sobre la expresión de los genes de cutinasas.	46
Efecto de posibles represores sobre la expresión de los genes de cutinasas y sus factores regulatorios	49
Correlación de la Expresión Génica y la Actividad de CEH	52
PARTE 2. EFECTO DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES FarA y FarB SOBRE LA EXPRESIÓN DE CUTINASAS EN <i>A. nidulans</i>	57
Análisis bioinformático de las secuencias de las cutinasas en <i>A. nidulans</i> . Identificación de sitios de unión de FarA y FarB	57
Niveles de expresión de los genes de cutinasas en las cepas mutantes AN Δ FarA y AN Δ FarB..	59
Actividad de las cutinasas en las cepas mutantes evaluada mediante zimogramas.....	62
PARTE 3: IDENTIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE <i>ancut4</i>	68
Análisis bioinformático de las secuencias regulatorias de <i>ancut4</i>	68
Optimización del Medio de Inducción de Estrés Oxidativo (MIEO)	70
Cuantificación de los niveles de expresión de <i>ancut4</i> en condiciones de estrés oxidativo.	72
Identificación de la proteína ANCUT4 en condiciones de estrés oxidativo.....	73
CONCLUSIONES	83
PERSPECTIVAS	84

REFERENCIAS.....	85
ANEXOS	92
ANEXO A. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS qRT-PCR MULTIPLEX PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CUTINASAS EN <i>Aspergillus nidulans</i>	92
Medición de la expresión génica por hibridación de sondas.	93
Medición de la expresión génica por qRT-PCR.	95
Nuevas tecnologías: el RNA-seq.....	100
Metodología utilizada para la medición de los niveles de expresión de cutinasas mediante qRT-PCR Multiplex.	102
Identificación de los genes de cutinasas y genes endógenos mediante PCR punto final.	102
Diseño de cebadores y sondas para qPCR de los genes <i>ancut1</i> , <i>ancut2</i> , <i>ancut3</i> , <i>ancut4</i> , <i>βTub2</i> , <i>Ubg1</i> , <i>farA</i> y <i>farB</i>	104
Condiciones de amplificación por qRT-PCR Uniplex y Multiplex.....	105
Selección del gen endógeno.....	105
Optimización de la Eficiencia de los ensayos qRT-PCR Uniplex y Multiplex.....	108
ANEXO B. FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS MÍNIMO, CEHM Y CON CUTINA DE MANZANA	110
ANEXO C. CONTEO DE ESPORAS.....	112
ANEXO D: CURVA PATRÓN DE ABS UTILIZADA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SEGÚN EL MÉTODO DE BRADFORD.....	113
ANEXO E: CURVA PATRÓN DE p-NITROFENOL UTILIZADA PARA LA CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD TIPO CARBOXILESTERASA.....	114
ANEXO F. EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN POR qRT-PCR DE LOS GENES ESTUDIADOS.	115
ANEXO G: SEÑALES TÍPICAS OBTENIDAS EN ESPECTROS DE ATR-FTIR PARA CUTINA Y PARA <i>ASPERGILLUS NIDULANS</i> PW1	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Esquema simplificado de la reacción de hidrólisis que llevan a cabo las cutinasas sobre la estructura de cutina.	2
2	Diagrama del plegamiento α/β de la cutinasa de <i>Fusarium solani</i>	3
3	Estructura y composición de la cubierta de las plantas	6
4	Filogenia de las especies de <i>Aspergillus</i>	13
5	Fases de la reproducción asexual y sexual en <i>A. nidulans</i>	14
6	El ciclo reproductivo en <i>A. nidulans</i>	16
7	Alineamiento de las secuencias reportadas para las 4 cutinasas de <i>A. nidulans</i>	18
8	Modelo propuesto para la regulación de la expresión inducida y constitutiva de las cutinasas en <i>Fusarium solani</i> pisi	20
9	Modelo hipotético de la regulación de cutinasas en <i>G. cingulata</i>	22
10	Esquema que demuestra la acción acoplada entre los TCS y las vías MAPK en respuesta a distintos tipos de estrés en <i>A. nidulans</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pombe</i>	25
11	Geles SDS-PAGE y Zimogramas de la purificación de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2	28
12	Cuantificación por RMN de de los metil ésteres sintetizados por ANCUT2	29
13	Geles agarosa-formaldehido para visualizar la calidad del RNA total extraído	37
14	Zimograma de los sobrenadantes obtenidos de los distintos medios ensayados	54
15	Perfil proteico y zimograma de los sobrenadantes de las diferentes cepas crecidas en medio con cutina	63
16	Espectro de ATR-FTIR de la cutina antes y después del ataque de las diferentes cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	65
17	Esquema que representa los cambios en los niveles de expresión de los genes <i>ancut1</i> , <i>ancut2</i> y <i>ancut3</i> en las cepas mutantes AN Δ FarA y AN Δ FarB.	67
18	Análisis de sitios de unión a factores regulatorios en la secuencia río arriba de <i>ancut4</i>	68
19	Geles SDS-PAGE y zimograma al 14% de los sobrenadantes concentrados obtenidos en condiciones de estrés	73
20	Modelo propuesto para la regulación del sistema cutinolítico en <i>Aspergillus nidulans</i>	81
A.1	Esquematación del proceso de Northern Blot	93
A.2	Diseño de un Ensayo de microarreglos de cDNA	95
A.3	Fluorescencia de una sonda TaqMan en qPCR	96
A.4	Curva de amplificación y su curva estándar para cuantificación absoluta por qPCR	97
A.5	Proceso de RNA-seq para evaluar la expresión génica	101
A.6	Gel de agarosa para visualizar la amplificación de los genes codificantes para cutinasas y factores regulatorios.	103
C.1	Uso de la cámara de Neubauer para el conteo de esporas	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Principales monómeros constituyentes de la cutina	4
2	Principales especies productoras de cutinasas	10
3	Características genómicas de <i>A. nidulans</i>	17
4	Genes reportados como codificantes de cutinasas	17
5	Características teóricas de las cutinasas reportadas en <i>A. nidulans</i>	18
6	Caracterización bioquímica de las cutinasas	29
7	Cuantificación de RNA total extraído	37
8	Cuantificación RNA en la cinética de crecimiento en MM y medio con cutina	38
9	Péptidos identificados a partir de las bandas de actividad de tipo CEH detectadas en los zimogramas de los sobrenadantes de <i>A. nidulans</i>	55
10	Predicción de FT de las distintas familias según Pfam en el género <i>Aspergillus</i> Búsqueda de los sitios de unión de FarA y FarB en las secuencias río arriba de los genes de cutinasas en <i>A. nidulans</i>	57
11	Descripción de las señales de ATR-FTIR del espectro de cutina y cutina hidrolizada	58
12	Identificación de sitios de unión de factores de transcripción en la secuencia de <i>ancut4</i>	66
13	Efecto de los agentes causantes de EO sobre el crecimiento de <i>A. nidulans</i>	68
14	Concentración en ng/ μ L de RNA total extraído en condiciones de estrés oxidante	70
15	Péptidos identificados en la banda con actividad CEH detectada en condiciones de estrés oxidante	71
16	Proteínas identificadas en el SN de <i>A. nidulans</i> mediante 2D-SDS-PAGE en condiciones de estrés oxidante	74
17	Compuestos de degradación generados por la acción sobre cutina de cada una de las cutinasas de <i>A. nidulans</i>	74
18	Mezcla de reacción para la PCR punto final para detectar los genes de cutinasas de <i>A. nidulans</i>	78
A.1	Secuencias de cebadores y sondas utilizadas para la identificación por qRT-PCR	102
A.2	Multiplex de los genes de interés en este estudio.	104
A.3	Especificaciones de los cebadores utilizados en PCR punto final para detectar el gen de la β tubulina	106
A.4	Especificaciones de los cebadores utilizados en PCR punto final para detectar el gen de la subunidad 1 de la ubiquitina	106
A.5	Análisis estadístico de la variabilidad de amplificación del gen <i>βtub</i> bajo distintas condiciones.	107
A.6	Análisis estadístico de la variabilidad de amplificación del gen <i>ubq1</i> bajo distintas condiciones.	107
A.7	Concentraciones finales de sondas y cebadores utilizados en el primer ensayo Multiplex	109
A.8	Concentraciones finales de sondas y cebadores utilizadas en el segundo ensayo Multiplex	109
F.1	Valores de eficiencia obtenidos para la amplificación los genes <i>ancut1</i> , <i>ubq1</i> y <i>farA</i> en ensayos uniplex y triplex	115
F.2	Valores de eficiencia obtenidos para la amplificación los genes <i>ancut3</i> , <i>ancut4</i> y <i>farB</i> en el ensayo triplex	116
F.3	Valores de eficiencia obtenidos para la amplificación del gen <i>ancut4</i> utilizando como templado producto de PCR purificado con cebadores específicos.	117
G.1	Señales típicas de la cutina pura obtenidas por ATR-FTIR	118
G.2	Señales de <i>A. nidulans</i> obtenidas por ATR-FTIR	119

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico	Título	Página
1	Cuantificación de RNA extraído a distintos tiempos de crecimiento	38
2	Efecto de fuentes de Carbono de origen lipídico en los niveles de expresión de las cutinasas y los FT en <i>A. nidulans</i>	47
3	Efecto de triglicéridos de distinto largo de cadena en los niveles de expresión de las cutinasas y los FT en <i>A. nidulans</i>	48
4	Efecto de posibles represores en los niveles de expresión de las cutinasas y los FT en <i>A. nidulans</i>	50
5	Cuantificación relativa de los niveles de expresión de las cutinasas de <i>A. nidulans</i> en ausencia de posibles fuentes inductoras o represoras	52
6	Actividad específica de los sobrenadantes de <i>A. nidulans</i> crecido en los diferentes medios ensayados, utilizando como sustrato <i>p</i> -NPA.	53
7	Niveles de expresión relativos de los genes <i>ancut1</i> , <i>ancut2</i> y <i>ancut3</i> en las cepas mutantes	59
8	Cinética de concentración de RNA a distintos tiempos de contacto con el agente de EO	71
9	Niveles de expresión relativos de los genes <i>ancut1</i> , <i>ancut2</i> , <i>ancut3</i> y <i>ancut4</i> en medio MIEO	71
10	Niveles de expresión relativos de los genes <i>ancut1</i> , <i>ancut2</i> , <i>ancut3</i> y <i>ancut4</i> para la mutante ANΔNapA en medio MIEO	72
A.1	Valores promedio de Cts en las distintas condiciones ensayadas para los genes de referencia A. β-tubulina y B. ubiquitina1.	107
D.1	Curva patrón de ABS utilizada para la cuantificación de proteína según el método de Bradford	113
E.1	Curva patrón de <i>p</i> -Nitrofenol utilizada para la cuantificación espectrofotométrica de la actividad tipo carboxilesterasa (CEH).	114
F.1	Curva estándar multiplex para la detección de los niveles de expresión de los genes <i>ancut1</i> , <i>farA</i> y <i>ubq1</i> para obtener la eficiencia de amplificación.	115
F.2	Curva estándar multiplex para la detección de los niveles de expresión de los genes <i>ancut3</i> , <i>ancut4</i> y <i>farB</i> para obtener la eficiencia de amplificación	116
F.3	Curva estándar del gen <i>ancut4</i> utilizando como templado producto de PCR purificado con cebadores específicos.	117
G.1	Espectro de ATR-FTIR de cutina pura	118
G.2	Espectro de ATR-FTIR de <i>A. nidulans</i>	119

RESUMEN

Las cutinasas son serin esterasas que llevan a cabo la hidrólisis de los enlaces tipo éster que existen en el polímero de cutina. Junto con las lipasas y esterasas son enzimas de interés biotecnológico debido a que pueden a cabo reacciones de hidrólisis o síntesis de enlaces tipo éster en distintos sustratos de interés.

La primera cutinasa identificada y caracterizada fue la cutinasa Cut1 producida por el patógeno del chícharo *Fusarium solani* sp. pisi que se induce con monómeros de cutina y se regula por el factor transcripcional CTF1 α (Purdy y Kolattukudy, 1975; Li *et al.*, 2002). Este hongo produce otras 2 cutinasas, Cut2 y Cut3, las cuales se expresan de manera constitutiva y son reguladas por el factor transcripcional CTF1 β .

En el genoma del hongo modelo *Aspergillus nidulans* están reportadas las secuencias de 4 genes que codifican para cutinasas putativas (Galagan et al. 2005). Hasta ahora, en el grupo de trabajo se ha identificado y caracterizado la actividad de dos de estas cuatro proteínas: la ANCUT1 producida en medios con cutina de manzana como fuente de carbono y la ANCUT2 identificada en medios que utilizan aceite de olivo como fuente de carbono (Castro-Ochoa *et al.*, 2012; Bermúdez-García *et al.*, 2017).

En este trabajo se buscaron las condiciones de expresión de las cuatro cutinasas producidas por *A. nidulans* y se estudió su papel en la hidrólisis de cutina para poder explicar si constituyen un sistema que actúa de manera conjunta o si por el contrario se expresan de forma independiente, permitiendo que el hongo crezca bajo distintas condiciones nutricionales. Los resultados de este trabajo demostraron que las cuatro cutinasas se expresan de manera diferenciada, siendo ANCUT1 y ANCUT2 inducidas por cutina y otras fuentes de carbono de origen lipídico; por lo que su expresión depende del factor transcripcional de lípidos, FarA. Por otro lado, ANCUT3 se expresa de manera constitutiva y se regula principalmente por el factor FarB. Finalmente, ANCUT4 se expresa en condiciones de estrés oxidativo y se regula por factores transcripcionales asociados a estrés como NapA.

ANTECEDENTES

Las cutinasas como parte de las α/β hidrolasas. Generalidades

Estructura y función.

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son serin esterases que pertenecen a la superfamilia de las α/β hidrolasas y que llevan a cabo la hidrólisis de los enlaces tipo éster que existen en el polímero de cutina, su sustrato natural. La cutina es el componente lipídico estructural de la cutícula de las plantas, la capa más externa de la pared vegetal y que actúa como una barrera de protección contra deshidratación y contra invasiones de patógenos (Chen *et al.*, 2013). La reacción general que catalizan estas enzimas se observa en la figura 1.

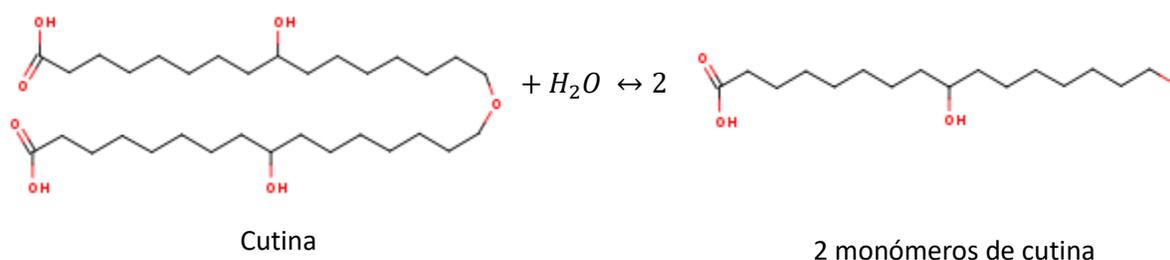


Figura 1: Esquema simplificado de la reacción de hidrólisis que llevan a cabo las cutinasas sobre la estructura de cutina. Fuente: Versión libre 4.0 de BRENDA: The comprehensive Enzyme Information System disponible en www.brenda-enzymes.org

Sin embargo, se ha demostrado que también son capaces de actuar sobre una amplia variedad de sustratos, incluyendo ésteres solubles de bajo peso molecular o triacilgliceroles de cadena corta o larga (Chen, *et al.*, 2013). En medios no acuosos o con baja a_w pueden catalizar reacciones de síntesis, como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos (Bordusa, 2002).

Las cutinasas comparten similitudes estructurales y catalíticas con otras hidrolasas, como lipasas y esterases, que también presentan el patrón típico de plegamiento α/β donde la parte central de la estructura está formada por 5 hojas β paralelas, cubiertas por 2 o 3 hélices α a cada lado de la hoja. El sitio activo está formado por una triada catalítica de Ser-His y un residuo ácido (Asp o Glu). El residuo de serina, indispensable para la catálisis, está

inmerso en el pentapéptido Gly-Tyr-**Ser**-Gln-Gly que presenta un alto porcentaje de similitud con la secuencia consenso Gly- (Tyr o His)- **Ser**-X-Gly presente comúnmente en las lipasas (Fig. 2). Además, la serina catalítica es accesible al solvente ya que las cutinasas no poseen la tapa hidrofóbica presente en la mayoría de las lipasas y el sitio activo se localiza en un extremo elipsoide de la proteína (Carvalho, *et al.*, 1998). Es esta característica lo que permite que la estructura de la cutina, de alto peso molecular, pueda acomodarse en la cavidad catalítica para llevar a cabo la hidrólisis.

En el caso de la cutinasa de *Fusarium solani* la tríada catalítica la forman los residuos Ser120 Asp175 y His188 y está rodeado por el lazo de 80-87 y por el lazo más hidrofóbico 180-188 (Carvalho, *et al.*, 1998).

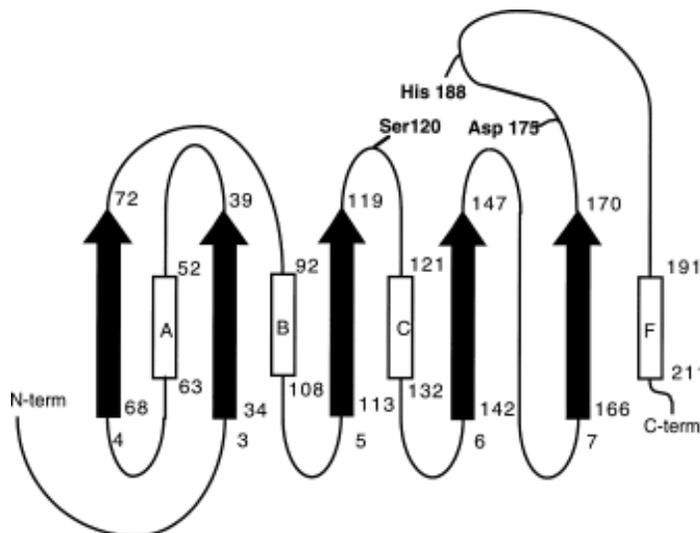


Figura 2: Diagrama del plegamiento α/β de la cutinasa de *Fusarium solani*. Se indica la tríada del sitio activo (Ser120, Asp175 e His 188), las cinco cadenas β (flechas negras numeradas del 3-7) y cuatro hélices α (marcadas A, B, C y F). Figura tomada de Egmond y de Vlieg (2000).

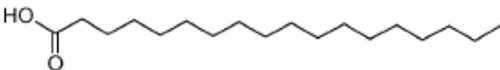
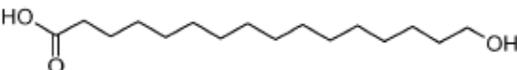
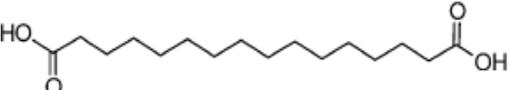
Cutina. El sustrato natural de las cutinasas

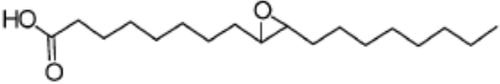
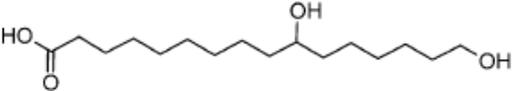
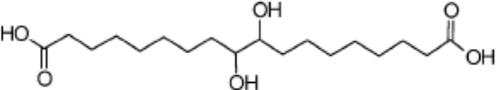
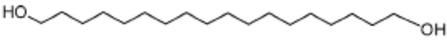
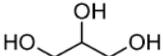
Estructura y composición de la cutina.

La cutina es un poliéster compuesto por ácidos grasos epoxi e hidroxilados (Li y Kolattukudy, 1980) con una longitud de cadena de n-C16 a n-C18 y que contienen de uno a tres grupos hidroxilos. Los ácidos grasos se unen entre sí para formar una red tridimensional bastante rígida mediante enlaces de tipo éster aunque también pueden encontrarse puentes de peróxidos y enlaces tipo éter (Carvalho *et al.*, 1998). La cutina es el principal componente

de la cutícula de las plantas, una estructura lipídica localizada en la parte externa de las células epiteliales y que también contiene en su estructura a ceras solubles con localización intra o epicuticular. Ambos, el polímero de cutina y la fracción cética, muestran una amplia variabilidad en su composición dependiendo del tejido o de la especie que se analice. Sin embargo, algunos monómeros se han identificado siempre en mayor o menor proporción, por ejemplo: ácidos grasos ω -hidroxilados, ácidos α,ω dicarboxílicos, monómeros de cadena intermedia epoxi o hidroxilados, alcoholes de ácidos grasos y en algunos casos glicerol (Pollard *et al.*, 2008). La tabla 1 muestra las principales estructuras comunes de los monómeros de cutina, así como sus porcentajes típicos de abundancia según estudios realizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 1 Principales monómeros constituyentes de la cutina (Modificada de Pollard *et al.*, 2008).

Tipo de monómero	Abundancia (%) y monómeros más comunes
<p>Ácidos grasos no sustituidos</p> 	<p>1-25% C 16:0, C 18:0, C18:1, C 18:2</p>
<p>Ácidos grasos ω-hidroxilados</p> 	<p>1-32% C 16:0, C 18:1, C 18:2</p>
<p>Ácidos α,ω dicarboxílicos</p> 	<p>Usualmente <5% pero >50% en <i>Arabidopsis</i> sp. C 16:0, C 18:0, C18:1, C 18:2</p>

<p>Monómeros de cadena media funcionalizados</p> <p>Ácidos grasos epoxidados</p>  <p>Ácidos grasos polihidroxilados</p>  <p>Ácidos α,ω dicarboxílicos polihidroxilados</p> 	<p>0-34%</p> <p>C 18:0, C18:1</p> <p>16-92%</p> <p>C 16:0, C 18:0</p> <p>Trazas</p>
<p>Alcoholes de ácidos grasos</p> <p>Alcan-1-oles y alquen-1-oles</p>  <p>α,ω-alcanedioles y α,ω-alquenedioles</p> 	<p>0-8%</p> <p>C 16:0, C 18:1</p> <p>0-5%</p> <p>C 18:1</p>
<p>Glicerol</p> 	<p>1-14%</p>

La representación de la polimerización de los monómeros para la formación de la red de cutina y la localización de la cutícula dentro del tejido vegetal se muestran en las figuras 3A y 3B.

Por su composición química, la cutina es un polímero prácticamente inerte, con una estructura amorfa que une, aleatoriamente, ácidos grasos hidroxilados para formar polímeros lineales y ramificados. Es un polímero que, en combinación con otros componentes de la cutícula, adopta una estructura fina y variable (laminar, reticulada o amorfa) dependiendo de la especie y la etapa de desarrollo en que se encuentre la planta. La cutina es también un polímero viscoelástico e hidrofóbico con distintos ambientes y densidades, así como con un comportamiento térmico dual (puede ser rígida o fluída) dependiendo de la temperatura fisiológica.

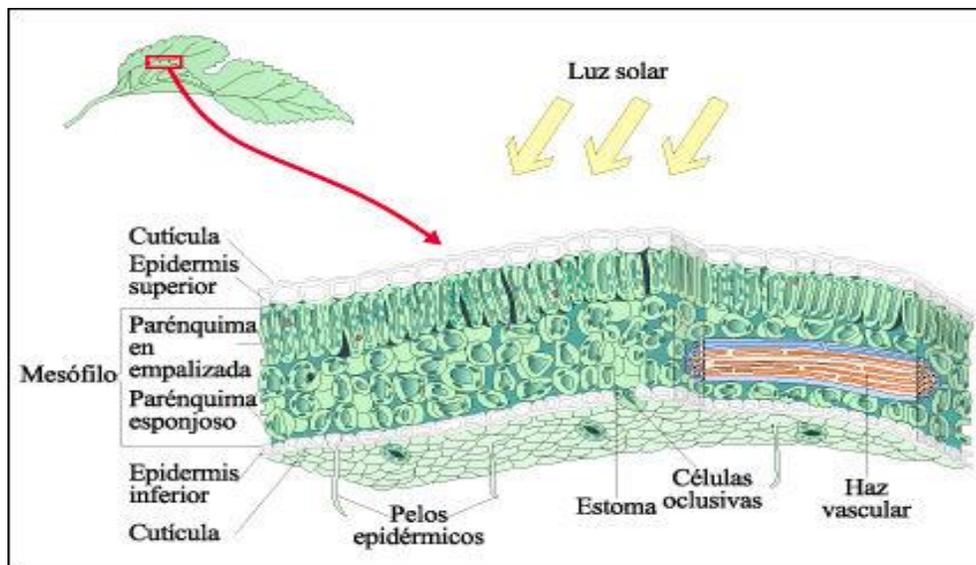
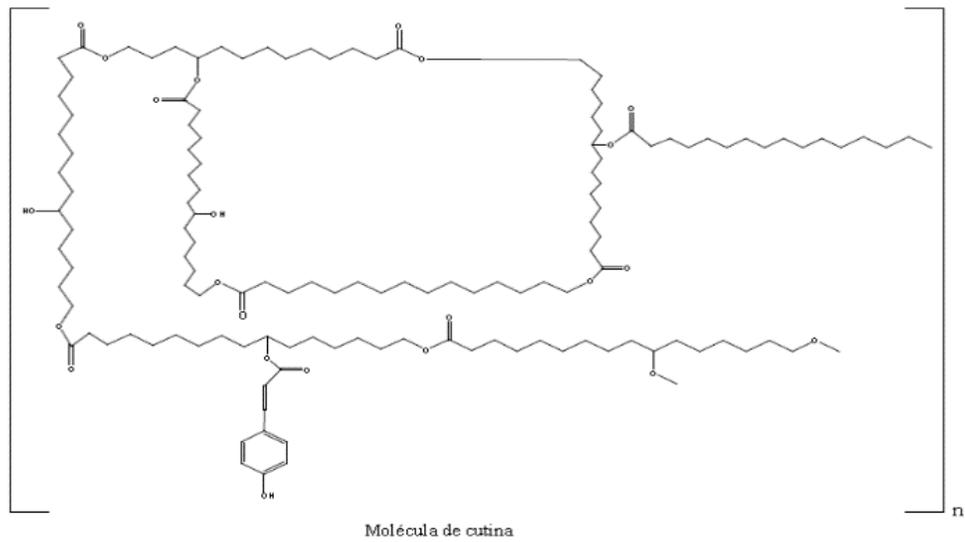


Figura 3. Estructura y composición de la cubierta de las plantas, A: Monómero de cutina. B: Estructura de una hoja, se observa la cutícula en la parte exterior de la epidermis. Figura B Adaptada de Curtis et al., 2008.

La función *in vivo* de las cutinasas y algunas de sus aplicaciones.

El papel de las cutinasas como mecanismo de infección.

El proceso de infección por hongos al tejido vegetal está compuesto de cuatro etapas básicas: la unión de las esporas a la superficie de la planta, la germinación de las esporas y

la formación de estructuras de invasión (hifas, apresorio), la penetración al tejido mediante la degradación de la cutícula y la pared vegetal y, por último, la colonización o el crecimiento del hongo dentro del tejido. La penetración a la planta puede llevarse a cabo mediante métodos naturales, aprovechando las aperturas de los tejidos como los estomas; mecánicos, aprovechando lesiones ya existentes en la planta; o enzimáticos. Los métodos enzimáticos requieren de la expresión de numerosas enzimas líticas que facilitan al hongo la colonización del tejido hospedero (Stahl y Schäfer, 1992).

Se ha demostrado que, durante las primeras etapas de invasión, algunos hongos fitopatógenos secretan cutinasas, lipasas y estererasas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster de polímeros de ácidos grasos, facilitando la penetración del hongo en la cutícula para poder llevar a cabo el proceso de invasión (Hynes *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002; Voigt *et al.*, 2005). Específicamente, las cutinasas actúan degradando la cutina, liberando monómeros de ácidos grasos modificados que a su vez pueden ser sustrato de degradación de otras lipasas.

El primer indicio del papel de las cutinasas como parte de los mecanismos de infección se dio a partir de la identificación de una cutinasa (la primera encontrada) en el patógeno del chicharo *Fusarium solani*, ya que se observó que, al aumentar los niveles de producción de esta enzima, también aumentaba la virulencia del hongo (Köller y Kolattukudy, 1982). Sin embargo, dado que la secreción de estas enzimas no es la única forma en la que el hongo penetra dentro de la cutícula vegetal, numerosas discusiones se han planteado tratando de dilucidar el verdadero papel de la cutinasas en la patogénesis. Por un lado, existen estudios en los que mediante cepas mutantes a las que se les interrumpieron los genes codificantes para cutinasas se encontró que estas cepas eran incapaces de ocasionar lesiones en plantas, concluyendo que las cutinasas eran indispensables para la patogénesis de ciertos hongos (Dickman *et al.*, 1982; Li *et al.*, 2003). Estudios similares más recientes en *F. solani* (Stahl y Schäfer, 1992) *Magnaporthe grisea* (Sweigard, Chumley y Valent, 1992) o *Botrytis cinerea* (van Kan *et al.*, 1997) han tenido resultados opuestos y sugieren que las cutinasas no son un factor decisivo en la colonización e infección vegetal puesto que la patogenicidad sobre plantas de tomate y gerbera no se ve interrumpida.

La evidencia encontrada hasta ahora parece indicar que, pese a no ser esenciales para la patogénesis, las cutinasas facilitan el proceso invasivo y la virulencia del hongo aumenta cuando estas enzimas son sobreexpresadas (Lee *et al.*, 2010). Además, otros estudios han encontrado que también tienen un papel importante en otras condiciones del desarrollo fúngico. Por ejemplo, además de ayudar a la penetración de la capa cuticular durante las primeras etapas del proceso infeccioso, las cutinasas también tienen un papel importante en la unión de las esporas al tejido hospedero y en la obtención de fuentes de energía y carbono durante el crecimiento saprofítico (Bakar *et al.*, 2005). Se ha visto que la producción de monómeros de cutina por la acción de cutinasas puede promover la germinación tubular de las conidias y la diferenciación del apresorio en *B. graminis* y *M. grisea* (Skamnioti y Gurr, 2007). Los monómeros de cutina también pueden ayudar a la planta a ser más resistente a la invasión, por lo que la acción de la cutinasas puede tener un papel relevante dentro de las cascadas de señalización que son cruciales tanto para la diferenciación de estructuras morfológicas de infección e invasión como en el intercambio de señales entre la planta y el patógeno (Leroch *et al.*, 2013).

Aplicaciones de cutinasas. Su potencial industrial y biotecnológico.

Además de su importancia en condiciones *in vivo* dentro de las redes ecológicas que regulan las distintas relaciones que se establecen entre las plantas y los hongos, las cutinasas son enzimas capaces de catalizar reacciones de hidrólisis y también de síntesis (en condiciones de baja actividad acuosa) que tienen un alto potencial de aplicación en procesos y productos industriales. Presentan actividad hidrolítica frente a una variedad amplia de ésteres sintéticos, fibras sintéticas (fibras de tereftalato de polietileno) y plásticos como el tereftalato de polietileno (PET) o la policaprolactona (Farrés *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 1998).

Entre las aplicaciones que tienen las cutinasas a nivel industrial destaca su uso en la industria láctea para hidrolizar parcialmente la grasa de la leche generando grasas de leche de bajo punto de fusión (Low Melting Fats, por sus siglas en inglés) que son un ingrediente importante en la industria alimentaria ya que inhiben la cristalización en productos

derivados en confitería y panificación (Schmelzer y Hartel, 2001). Otra aplicación en esta industria es la síntesis de ésteres que se utilizan como saborizantes mediante reacciones de transesterificación entre ésteres y alcoholes (Castro-Ochoa *et al.*, 2010). También se ha evaluado el uso de cutinasas en la formulación de detergentes biológicos para uso doméstico, donde son capaces de remover triacilgliceroles en un solo proceso de lavado (Flipsen *et al.*, 1998).

Otras de sus aplicaciones se dan en procesos de síntesis de químicos finos catalizadas en solventes orgánicos para producción de numerosos compuestos de alto valor como triglicéridos estructurados, polímeros, biodiesel, agroquímicos y fármacos que contienen más de un centro quiral (Bermúdez, *et al.*, 2017). En actividades acuosas bajas, la transesterificación de grasas y aceites y la esterificación estereoselectiva de alcoholes puede llevarse a cabo, lo que permite generar precursores de biodiesel (metil-ésteres) a partir de residuos lipídicos agroindustriales. El biodiesel es un combustible alternativo cuyo uso se ha incrementado en los años recientes a nivel mundial.

Otra aplicación interesante es la degradación de insecticidas, ftalatos y polímeros sintéticos cuyo empleo permite eliminar sustancias tóxicas presentes en el ambiente hasta subproductos de baja toxicidad. El malatión es un insecticida organofosforado que se acumula en suelos y cuerpos de agua y que es fácilmente absorbido por la piel y otros tejidos blandos, y que se ha demostrado que causa daños en el sistema nervioso central. El empleo de cutinasas y esterases en la degradación de este compuesto ha sido evaluado por Kim y colaboradores que reportaron que la cutinasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi degradó entre 50 y 60 % de la cantidad inicial de malatión (Kim *et al.*, 2005). Por otro lado, la policaprolactona, un poliéster sintético, es hidrolizada hasta subproductos solubles en agua por la cutinasa de *F. solani* (Murphy *et al.*, 1996) y en el grupo de trabajo se ha demostrado la capacidad de las cutinasas de *Aspergillus nidulans* para degradar polietileno tereftalato (PET) (Farrés *et al.*, 2017). Los ftalatos son compuestos químicos utilizados en la fabricación de polímeros, pinturas, lacas y cosméticos que se han encontrado en sedimentos, agua, aire y alimentos ya que migran fácilmente del material de empaque. El ftalato más comúnmente encontrado es el dihexil-ftalato o DHP, el cuál fue clasificado como contaminante y

compuesto interruptor endócrino (EDCs), causante de daños a la salud por interferir con las hormonas endógenas del cuerpo. Se ha investigado la eficacia de la cutinasa de *F. oxysporum* en la degradación de estos compuestos (Sung *et al.*, 2003).

Hongos fitopatógenos, principales organismos productores de cutinasas.

La primera cutinasa que fue identificada y caracterizada fue la cutinasa Cut1 (22 kDa) producida por el patógeno del chícharo *Fusarium solani* f. sp. pisi a partir del crecimiento del hongo en un medio que contenía como única fuente de carbono cutina de manzana (Purdy y Kolattukudy, 1975). Posteriormente se encontraron otras cutinasas sintetizadas por los hongos patógenos *Cochliobolus heterostrophus*, *Rhizoctonia solani* y *Alternaria brassicicola*, utilizando medios similares (Trail y Köller, 1990) y se reportó que hidrolizados de cutina y alcoholes primarios *n*-alifáticos de 14 o más átomos de carbono son buenos inductores de estas enzimas (Li y Kolattukudy, 1997).

Posteriormente, se reportó la producción de cutinasas en polen de plantas como *Tropaeolum majus* (capuchina) o *Brassica napus* L. (canola); en bacterias, levaduras e incluso en hongos no patógenos (Sebastian, Chandra y Kolattukudy, 1987; Seo *et al.*, 2007; Shayk y Kolattukudy, 1977). Los hongos fitopatógenos se siguen considerando los principales productores de este tipo de enzimas. En la Tabla 2 se enlistan las principales especies reportadas como productoras de cutinasas.

Tabla 2 Principales especies productoras de cutinasas

Fuente	Género	Especie	Referencia
Hongos	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Botrytis</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i> <i>Rhizoctonia</i> <i>Rhizoctonia</i>	<i>alternata</i> <i>oryzae</i> <i>cinerea</i> <i>gloeosporoides</i> <i>solani</i> <i>harzianum</i> <i>solani</i> <i>cerealis</i>	Tanabe <i>et al.</i> , 1988 Maeda <i>et al.</i> , 2005 van Kan <i>et al.</i> , 1997 Dickman, 2009 Martínez <i>et al.</i> , 2008 Rubio <i>et al.</i> , 2008 Trail y Köller, 1990 Lu <i>et al.</i> , 2018
Bacterias	<i>Streptomyces</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>scabies</i> <i>putida</i>	McQueen y Schottel, 1987

	<i>Thermomonospora</i>	<i>fusca</i>	Sebastian y Kolattukudy, 1988 Fett <i>et al.</i> , 1999
Levaduras	<i>Cryptococcus</i>	sp.	Masaki <i>et al.</i> , 2005
Polen	<i>Tropaeolum Brassica</i>	<i>Majus napus</i> L.	Shayk y Kolattukudy, 1977 Hiscock <i>et al.</i> , 1994

El grupo más grande de hongos fitopatógenos comprende a los hongos pertenecientes a las clases *Ascomycetes* y *Basidiomycetes* (Lu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2018). Estos organismos han desarrollado estrategias bastante sofisticadas que les permiten penetrar la superficie vegetal, estructuras de infección especializadas y un repertorio numeroso de enzimas capaces de degradar efectivamente las capas externas de la planta. A lo largo de muchos años de evolución, los hongos fitopatógenos adquirieron la capacidad de reconocer señales de las células vegetales y utilizarlas para encender sus mecanismos de adhesión e invasión y burlar así la maquinaria de defensa de las plantas (Lazniewska *et al.*, 2012). Para muchos de ellos, los componentes de la superficie de la planta (ceras, cutina, componentes de la pared celular etc.), que funcionan generalmente como barreras protectoras contra patógenos, son señales para llevar a cabo la infección.

El papel de las cutinasas en la invasión del tejido vegetal forma parte de un amplio número de enzimas secretadas durante la germinación de las conidias a las que se les conoce como CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes, por sus siglas en inglés) y que forman parte de las estrategias de invasión de organismos fitopatógenos (Kapat *et al.*, 1998; Kikot, Hours y Alconada, 2009).

En la mayoría de los hongos productores de cutinasas se ha encontrado una elevada tasa de redundancia en el número de genes que codifican para estas enzimas, en un intervalo que va desde tres hasta diecisiete en un solo organismo (Skamnioti *et al.*, 2008). Además de eso, existe una gran heterogenidad en los mecanismos regulatorios que controlan la expresión de estas enzimas, incluso cuando presentan un alto grado de similitud en sus secuencias (Li *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2011). Esta diversidad no sólo refleja una historia evolutiva compleja de estos genes; también habla de las ventajas adaptativas de los organismos

productores. Sin embargo, hasta ahora no existe suficiente información que explique si esta redundancia permite conformar un sistema cutinolítico.

El género *Aspergillus*.

La clase de los ascomicetos comprende un gran número de géneros, desde levaduras como *Saccharomyces* hasta hongos causantes de enfermedades en mamíferos o patógenos vegetales que causan cada año pérdidas en cultivos de gran importancia. Descendientes de un ancestro común con los basidiomicetos, se cree que divergieron de este hace unos 400 o 600 millones de años; por lo que las plantas han tenido que lidiar con ellos prácticamente desde su aparición en tierra firme. Las plantas terrestres han sido la fuente de nutrientes principales para los ascomicetos y los basidiomicetos a lo largo de su historia evolutiva, de ahí la dominancia de especies saprófitas, patógenas o formadoras de micorrizas en ambos filos (Berbee, 2001).

Dentro del filo de los ascomicetos, el género *Aspergillus* comprende un grupo diverso de especies que comparten caracteres morfológicos, fisiológicos y filogenéticos. Estas especies tienen un impacto significativo en biotecnología, producción de alimentos y salud humana. Algunas especies se han estudiado por su importancia industrial, otras por ser agentes de deterioro, por producir micotoxinas o por ser patógenas para animales y vegetales (Castro-Ochoa *et al.*, 2010). Las especies de este género son mayoritariamente ubicuas y se encuentran distribuidas en la mayoría de los nichos ecológicos. Pueden encontrarse en suelos, en materia vegetal en descomposición (biomasa) e incluso pueden colonizar al ser humano.

Estudios filogenéticos recientes sugieren que *Aspergillus*, junto con otros géneros como *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* y *Cristaspora*, forma un clado monofilético muy cercano a *Penicillium* (Samson *et al.*, 2014) (Fig. 4).

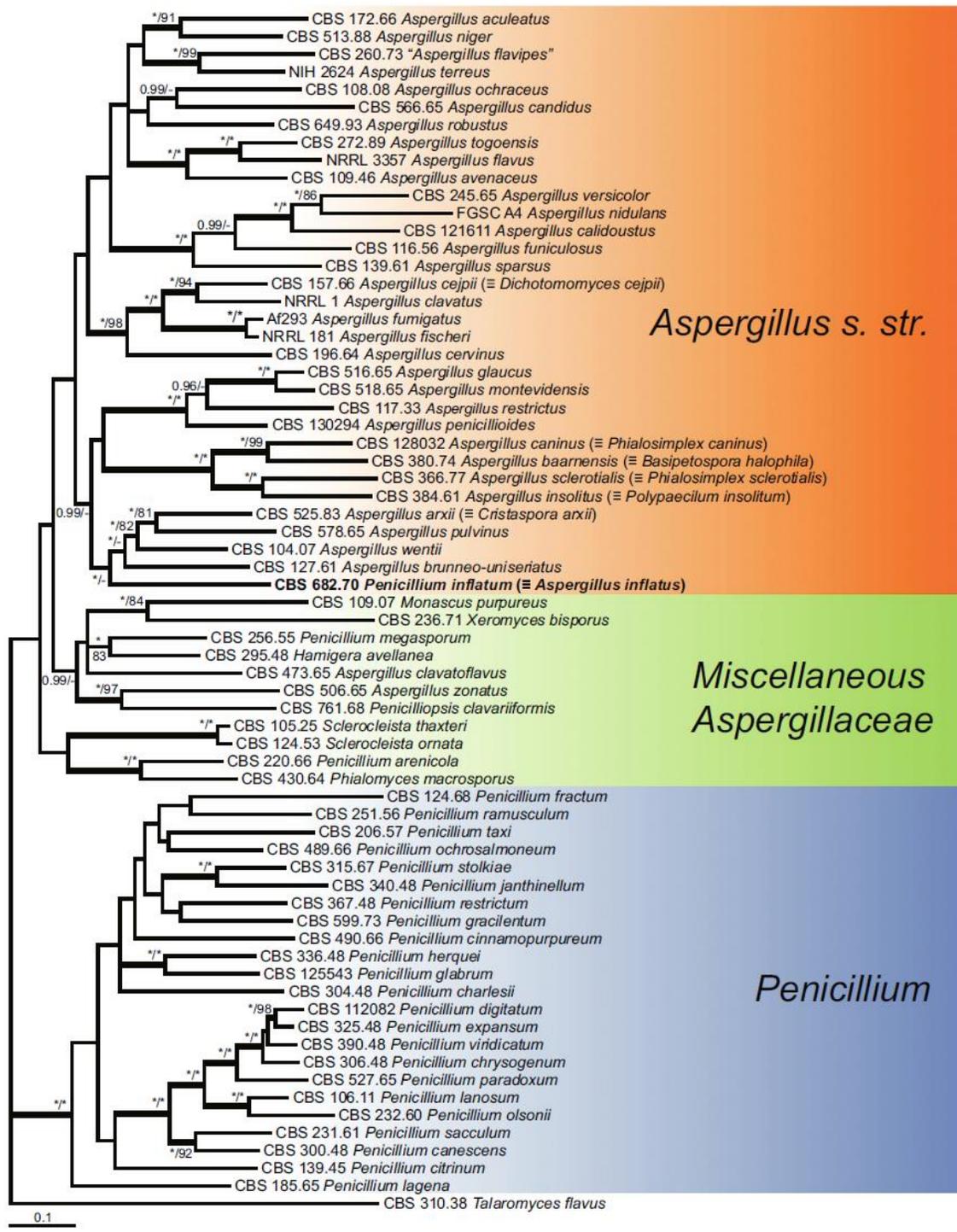


Figura 4. Filogenia de las especies de *Aspergillus*, construida a partir de los genes RPB2, Cct8 y Tsr1. Enraizado a *Talaromyces flavus*. Las ramas con soporte por *Bootstrap* superior al 80% se muestran más anchas y sus probabilidades (mayores a 0.95) se señalan encima. Tomada de Samson *et al.*, 2014.

La característica morfológica principal común en los miembros de *Aspergillus* y los demás géneros del *phylum* Ascomicetos es el *asco*. El meiosporangio en forma de saco que contiene las ascosporas y que únicamente se produce durante la reproducción sexual. Es en esta estructura donde se llevan a cabo los procesos meióticos y de división nuclear. La mayoría de las especies de *Aspergillus* presentan los dos tipos de reproducción: sexual mediante ascosporas o asexual por conidias. Este último tipo de esporas se genera a partir de las células conidiógenas que se localizan en el conidióforo, la estructura especializada para la reproducción asexual. El conidióforo posee tres partes bien diferenciadas: la vesícula (extremo apical hincado), el tallo (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y la célula pie (sección final que une al conidióforo con el micelio). Es sobre la vesícula donde se encuentran las células conidiógenas o fiálides. Una característica morfológica importante que permite diferenciar a nivel de especie en el género es la presencia o ausencia de métulas (células presentes entre las fiálides y las vesículas) (Fig. 5).

Morfológicamente, las especies de este género presentan colonias con una diversidad de tonalidades: desde blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, hasta negruzcas, marrón-negruzcas o verdosas.

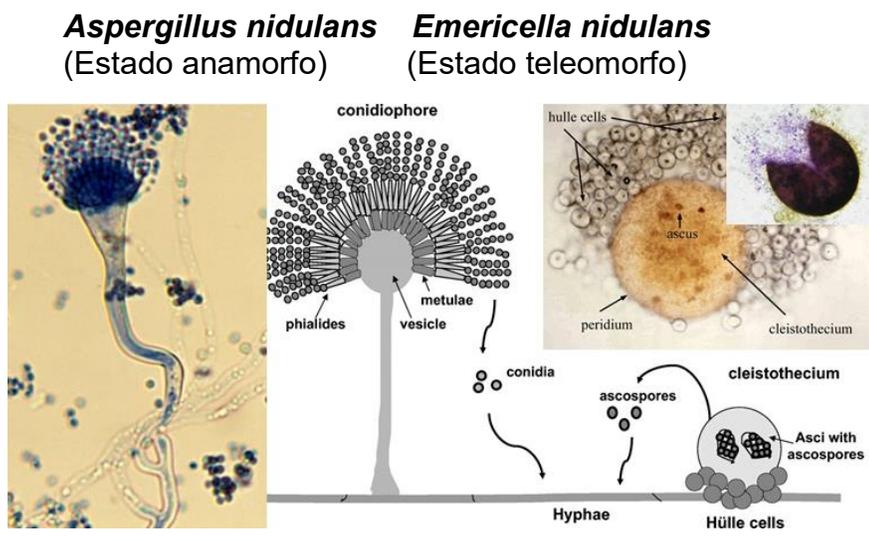


Figura 5. Fases de la reproducción asexual y sexual en *A. nidulans*. Tomada de: <https://hongosmasquecallampas.wordpress.com/2016/03/17/modo-de-reproduccion-morfologia-diferencial-y-el-nombre-de-los-hongos/>

Aspergillus nidulans o *Emericella nidulans* en su forma sexual (teleomorfo), es un ascomiceto de vida libre que crece rápidamente como hongo filamentoso en numerosos nichos ecológicos, en cultivos en sólido o en medio líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales. Es homotálico y, normalmente, haploide, pero también puede ser inducido a crecer como diploide vegetativo. Esta alta variabilidad adaptativa se asocia con su gran capacidad metabólica (Oakley, 2013).

El ciclo de vida de *A. nidulans* se caracteriza por la presencia de cuatro etapas bien definidas: crecimiento vegetativo, reproducción asexual, reproducción sexual y el ciclo parasexual. El crecimiento vegetativo inicia con la germinación de una espora que puede ser sexual o asexual (Fig. 6). En la reproducción asexual, las colonias de este hongo están constituidas por hifas pluripotenciales con crecimiento apical que se extienden a partir del punto de germinación. En la periferia de este crecimiento, las hifas superficiales que se exponen a la aireación y a la luz inician una secuencia de cambios en su desarrollo que conllevan a la formación de los conidióforos (Extebeste *et al.*, 2010). Esta transición entre la hifa vegetativa y el conidióforo comienza con la formación de la célula pie a partir de la cual emergen las demás estructuras típicas de la reproducción asexual que se nombraron en el apartado anterior. La finalización de la reproducción asexual es seguida por el inicio de otro proceso claramente reconocible, la formación de esporas sexuales. Esta etapa involucra la formación de los cuerpos fructíferos denominados cleistotecios, que están rodeados por células especializadas llamadas células de Hülle. En el interior de cada cleistotecio se encuentran una gran cantidad de sacos denominados ascas, que contienen las esporas sexuales o ascosporas.

Gracias a la reproducción asexual de *A. nidulans*, el hongo coloniza un sitio o sustrato específico, para el cual ya se ha generado adaptación a nivel genético y metabólico. Durante la reproducción asexual no hay variabilidad genética, ya que las células son haploides y se reproducen por mitosis para generar nuevas células haploides. Las esporas asexuales cumplen una función de dispersión y generalmente se asocian con el desarrollo de la patogénesis tanto en humanos, animales como en especies vegetales.

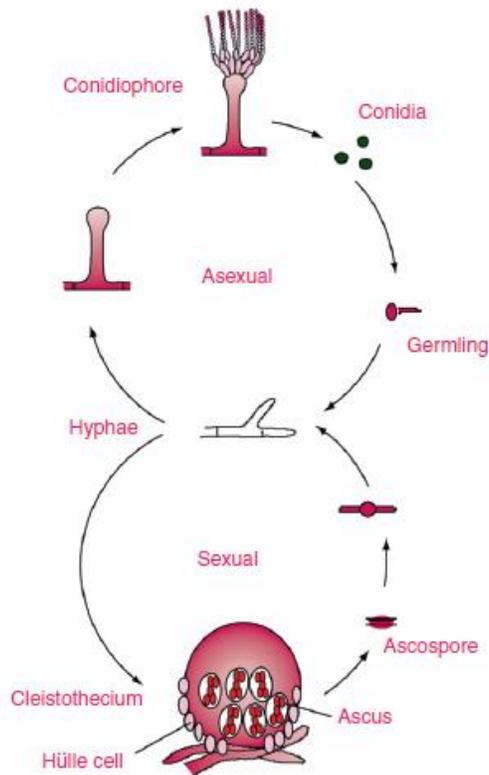


Figura 6. El ciclo reproductivo en *A. nidulans*. Tomado de Oakley BR (2013). Original de Scherer y Fisher (1998).

***Aspergillus nidulans* como modelo biotecnológico**

La utilización de *A. nidulans* como modelo biotecnológico se debe a las muchas décadas de investigación que han generado un considerable compendio de conocimiento sobre su genética y sus procesos moleculares y bioquímicos. Desde la década de los 40, Pontecorvo y sus colaboradores iniciaron el estudio de la genética del hongo desarrollando las técnicas básicas de clonación, selección y recombinación meiótica y mitótica (Oakley, 2013). Posteriormente, en los 70 y 80 se desarrollaron las técnicas moleculares que permitieron la transformación de las células del hongo y, por último, en el 2005 el genoma de la cepa FGSC A4 fue secuenciado, ensamblado y publicado por el equipo de Galagan en el Instituto Broad del MIT (Galagan *et al.*, 2005).

Además de tener amplias ventajas prácticas para su manipulación, el hecho de estar relacionado filogenéticamente con otras especies fúngicas de relevancia económica (*Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*) o clínica (*Aspergillus fumigatus*) lo ha posicionado como un organismo modelo.

Con la información obtenida a partir de la secuenciación del genoma de *A. nidulans* (Tabla 3) (Galagan *et al.*, 2005) ha sido posible estudiar numerosas rutas metabólicas, muchas de las cuales han permitido la obtención de compuestos de interés, así como caracterizar actividades enzimáticas que están presentes en este organismo y otros relacionados.

Tabla 3. Características genómicas de *A. nidulans*

Características	
Tamaño (pb)	30,068,514
Contenido de G+C (%)	50
Cromosomas	8
Número de contigs	248
Número de genes codificantes	9,541
Elementos móviles (%)	3

Información obtenida de la base de datos Aspergillus Genome Database disponible en: <http://www.aspergillusgenome.org/>

La producción de cutinasas en *A. nidulans*

En el genoma de *Aspergillus nidulans* se encuentran codificados cuatro genes reportados como cutinasas putativas (Galagan *et al.*, 2005). En la tabla 4 se muestran algunas de las características de las secuencias reportadas de los cuatro genes en cuestión:

Tabla 4. Genes reportados como codificantes de cutinasas en el genoma de *A. nidulans*

Gen	No. de bases	No. Intrones	Localización cromosomal	No. de acceso (NCBI)	Referencia
<i>an5309</i> ANCUT1	984	2	V	XM_657821	Galagan <i>et al.</i> , 2005
<i>an7180</i>	727	1	IV	DQ490506	Bauer <i>et al.</i> , 2006
<i>an7541</i> ANCUT2	1058	2	IV	DQ490511	Bauer <i>et al.</i> , 2006
<i>an10346</i>	836	1	VI	CBF83913	Wortman <i>et al.</i> , 2008

Las características teóricas de los productos de estos de estos genes se muestran en la tabla 5 a partir del análisis de su secuencia de aminoácidos en ExpASY (<http://www.expasy.org/proteomics>) y dichas secuencias ya traducidas, así como su porcentaje de similitud se observan en la figura 7 donde se identifican los aminoácidos que

forman la triada catalítica, la cavidad oxianiónica y las cisteínas involucradas en los puentes disulfuro que estabilizan la estructura secundaria.

Tabla 5. Características teóricas de las cutinasas reportadas en *A. nidulans*

	No. aminoácidos	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico
<i>an5309</i>	213 aa	22.4 kDa	6.35
<i>an7541</i>	254 aa	26.0 kDa	4.90
<i>an7180</i>	221 aa	23.1 kDa	5.83
<i>an10346</i>	223 aa	22.7 kDa	7.83

Gen	Secuencia de aminoácidos
7541	---MHFKLLSLAALAGLSVASPLNLD-----ERQRTSSGNDLRDGD C
5309	--MKLQLHLALSLLAAIVAANPIRLD-----QRQ--ITGNELRDG S
7180	---MRFHTILLAALASLVIATPLPSDT-----DVSLERRQSMNSNDLEKGD C
10346	MPLPLLPPLLLPLEALLDLALHLVDSTGVAYSARQVTPAPLRLRGSSTSDNDVTDNSG C
	: * . * : * : . * .. : ..*
7541	KPVTFI FARASTE PGL LGMSTG PAV C NDLKADASLGGVA C QGVGPKYTAGLAENALPQGT
5309	HDVTFI FARGSTE LGYL GSTVGPAT C NVLKLKRPQVA C QGVAPAYIADLASNFLPQGT
7180	KSVAFI FARGSTE IGNMGFVVGPGV C SNLKSTLGS DKVA C QGVGGAYTAGLIQNALPANT
10346	KELTFI FARGTTE IGNMGT VVGPKVGEAL KSLT-GNKAAIQGV D--YPADAAGNAALGGS
	: ::*****.:** * :* .** . . ** . . * *** * * . * .. :
7541	SSAAINEAKELFELAASK C PDTRIVAGGY S QGTAVMHGAI PDL SDEIKDKIAGVVLFGDT
5309	NQIAINEAKSLFELAASK C PNTKIVAGGY S QGAAVMHAAISTLSSTVQDQIKGVVLFGDT
7180	DSGSIKEAVKMF DLAA-KCPDTQIVAGGY S QGS AVIDNAIQKLDDSTRDRVKGVVLFGFT
10346	GGP---KMASLVETALK C PDTKIVLGGY S QGAMVVHNAASKLSS---GQVVGAVTFGDP
	. : ..: * :**:*:** *****: *:. * *.. ..: *.* ** .
7541	RNKQDGGQIKNFPKDKIKIY C ATGDLV C DGTLVVTAAHFTYVANTGEASKWLEQQLASMP
5309	RNKQDGGRI PNFPTDKTKI I CAFGLV C EGTLVITAAHLSYIDDPDAADFLVGKL----
7180	RNLQDKGQIPGYPKDQTKVY C AVGDLV C SGTLIITASHMTYGLNAGDAAKFLASQVSV--
10346	FKSQKPD-----NIDQKFT C ASGDPV C LN-GANVMAHLSYGNDAAQTAAQFLVSAAGL--
	: * . . * : * ** ** ** . . :*:* .. *::*
7541	ASTSTSSSSSSSSAPASQTSQSSGLSSWFSGLGN
5309	-----

Secuencias (1:2) Puntuación del alineamiento: 60.0939
 Secuencias (1:3) Puntuación del alineamiento: 53.3937
 Secuencias (1:4) Puntuación del alineamiento: 24.2152
 Secuencias (2:3) Puntuación del alineamiento: 46.4789
 Secuencias (2:4) Puntuación del alineamiento: 32.8638
 Secuencias (3:4) Puntuación del alineamiento: 32.1267

Figura 7. Alineamiento de las secuencias reportadas para las 4 cutinasas codificadas en el genoma de *A. nidulans*. En rojo se marcan los aminoácidos que forman la triada catalítica. En turquesa se resaltan los que forman parte del pentapéptido consenso de la cavidad oxianiónica. En amarillo resaltan las cisteínas que forman los enlaces disulfuro. 3 de las cutinasas tienen 6 cisteínas mientras que la última sólo presenta 4. Los asteriscos (*) indican que en dichas posiciones los aminoácidos se han conservado y son idénticos en las cuatro secuencias, los dos puntos (:) representan posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas y el punto (.) representa posiciones con sustituciones menos conservativas. Se muestra además los porcentajes de similitud entre cada una de ellas. (Tomado y traducido de Castro-Ochoa *et al.*, 2012)

Hasta ahora únicamente se ha demostrado la actividad tipo cutinasa de los genes *an5309* y *an7541*, cuyos productos fueron reportados por Castro-Ochoa como AN CUT1 y AN CUT2 respectivamente (Castro-Ochoa, *et al.*, 2012). El gen *an7180* fue identificado por Martins y colaboradores mediante microarreglos de *A. nidulans* crecido en medios que utilizan suberina, extraída a partir de corteza de roble, como fuente de carbono (Martins *et al.*, 2014), sin embargo, no se ha detectado la actividad de su proteína hasta ahora y nada se ha reportado sobre el gen *an10346* salvo la predicción de su secuencia realizada por Wortman y colaboradores en 2008 como parte de la actualización de la anotación del genoma de *A. nidulans*.

Regulación de cutinasas.

Anteriormente se ha hablado de la función de las cutinasas como parte de los mecanismos de invasión que utilizan los hongos fitopatógenos para penetrar el tejido vegetal, según lo reportado por estudios anteriores (Li y Kolattukudy, 1997; Li *et al.*, 2002) así como sus posibles aplicaciones. Sin embargo, los estudios sobre la regulación de estas enzimas no son vastos y aunque podemos pensar que las cutinasas se regulan de manera similar a otras hidrolasas de la pared vegetal, es importante generar mayor conocimiento sobre estas enzimas. Hasta ahora se han propuesto algunos factores que afectan la expresión de cutinasas, como la fuente de carbono presente en el medio, la respuesta a la regulación global de catabolismo de lípidos o la respuesta a estrés generado por las plantas.

Efecto de la fuente de carbono

La regulación de cutinasas fue estudiada primeramente en el patógeno del chícharo *Fusarium solanisp.* pisi debido a que, las cutinasas que produce fueron las primeras identificadas y caracterizadas. Se ha reportado en el genoma de este hongo, dos genes codificantes para cutinasas que mediante mecanismos de *splicing* generan tres proteínas (Cut1, Cut2 y Cut3), las cuales comparten un alto grado de identidad entre sí. Sin embargo, la regulación de la expresión de estos genes es diferente puesto que *cut2* y *cut3* (originados a partir del mismo gen) se expresan constitutivamente en niveles basales en ausencia de

cutina o sus monómeros y están regulados por un promotor constitutivo CTF1 β (Li *et al.*, 2002) mientras que la expresión de *cut1* es fuertemente inducida por los monómeros de cutina liberados luego de la acción de las cutinasas constitutivas 2 y 3 como se observa en la figura 8.

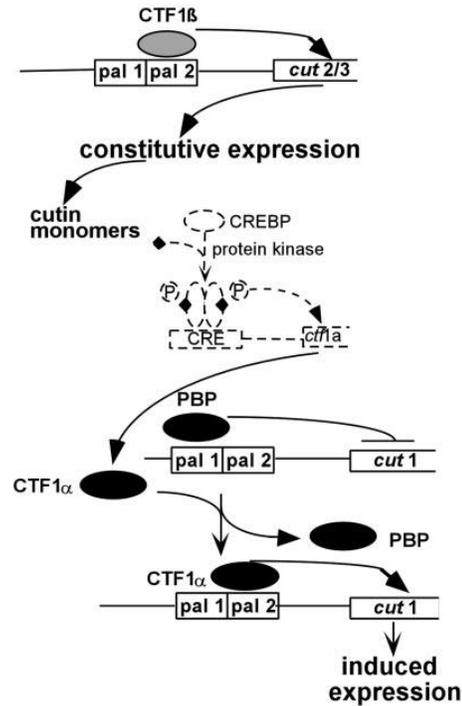


Figura 8: Modelo propuesto para la regulación de la expresión inducida y constitutiva de las cutinasas en *Fusarium solani* sp. pisi (Tomado de Li *et al.*, 2002).

Los monómeros de cutina (ácidos grasos modificados) activan la expresión de un factor regulatorio tipo dedo de zinc: CTF1 α que tiene como sitio de unión una secuencia palindrómica localizada río arriba del inicio de transcripción del gen *cut1* y que, al unirse a esta secuencia, desplaza a la proteína represora PBP que estaba impidiendo la transcripción del gen de la cutinasa 1 (Li y Kolattukudy, 1997; Li *et al.*, 2002).

De esta forma, la regulación del sistema cutinolítico involucra a dos factores transcripcionales que regulan la expresión de dos genes (uno de expresión constitutiva y otro inducido por los monómeros de cutina) que a su vez generan 3 proteínas.

En *Aspergillus nidulans*, la proteína homóloga a CTF1 α es FarA y a CTF1 β es FarB. Estas proteínas fueron identificadas por Hynes y colaboradores como las encargadas de permitir al hongo utilizar ácidos grasos como fuente de energía y de carbono (Hynes *et al.*, 2006).

La regulación de cutinasas durante el crecimiento saprofítico.

Además de ser parte de los mecanismos que permiten la invasión del tejido vegetal, las cutinasas pueden ser secretadas por el hongo durante su crecimiento como saprófito. En *Glomerella cingulata*, un ascomiceto patógeno que ataca una amplia gama de cultivos en las regiones tropicales y subtropicales, se identificó una cutinasa (CutA) que es inducida por cutícula. Como en este organismo no existen multicopias del gen, el mecanismo cutinolítico se regula de forma distinta a los mencionados anteriormente. Bakar y colaboradores han propuesto que, en ausencia de monómeros de cutina, sobre la cutícula intacta de la planta, las esporas del hongo que se encuentran en la superficie producen bajos niveles de cutinasas inducidas por factores de señalización específicos de las plantas (que aún no son conocidos). Después, los monómeros de cutina generados por la acción de la cutinasa así expresada, actúan como inductores permitiendo que el hongo produzca una mayor cantidad de enzima para poder acceder al interior de la planta huésped o para que las esporas se adhieran y continúe el proceso de colonización (Bakar *et al.*, 2005). En este modelo, que se ilustra en la figura 9, la expresión de una única copia del gen de cutina se regula mediante dos mecanismos distintos en diferentes tiempos. Primero por señales provenientes de la misma planta que inducen una baja expresión y posteriormente por los monómeros de cutina liberados, generando una mayor expresión del gen.

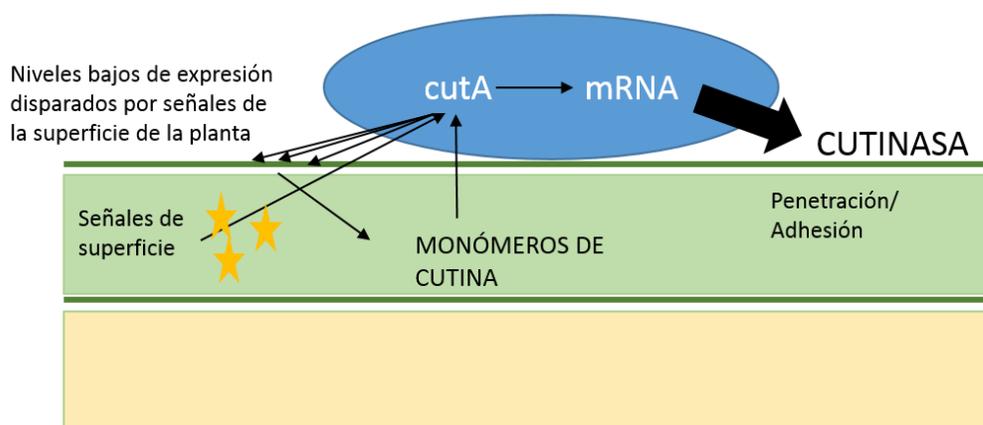


Figura 9. Modelo hipotético de la regulación de cutinasas en *G. cingulata* (Adaptado de Bakar *et al.*, 2005)

En el caso de *Alternaria brassicicola* la regulación también se ve afectada por el tiempo de exposición a la cutícula y por el estado de crecimiento del hongo. En este patógeno han sido encontradas dos clases de esterasas cutinolíticas. Las de la primera clase sólo se expresan durante el contacto por tiempos cortos (24h) con la cutina intacta y no son inducidas por cutina ni otras ceras presentes en la superficie de las plantas. En contraste, las de la segunda clase se expresan bajo tiempos prolongados de exposición a la cutina intacta. Además, se detectó la presencia de un gen único de cutinasa (CutAB1) que da lugar a dos proteínas A_c y B_a . Fan y Köller sugirieron para *Alternaria brassicicola* un modelo regulatorio un poco más complejo que el reportado para *Fusarium solani* (Fan y Köller, 1998).

Según este modelo, cuando las conidias aun sin germinar están en contacto con cutina intacta, se secretan dos esterasas con actividad cutinolítica (Clase I) de forma constitutiva que comienzan la degradación del polímero en tiempos cortos de exposición. Si las conidias han germinado (mayores tiempos de exposición), entonces se generan esterasas de la clase II que se induce por tiempos largos de exposición al polímero, pero no por los monómeros de este. Al penetrar en el tejido vegetal, se detiene la expresión de las enzimas cutinolíticas porque están disponibles carbohidratos como fuente de carbono. Si pasado el tiempo normal de penetración, 24 horas, el hongo no percibe condiciones represoras, entonces los monómeros de cutina generados por las esterasas de la Clase I sirven como inductores a las

cutinasas A_c y B_a, sintetizadas a partir del gen CutAB1 y que no se inducen por la cutina intacta (Fan y Koller, 1998).

Sin embargo, para la mayoría de estos modelos, las enzimas involucradas no han sido ampliamente caracterizadas y aún no se sabe con certeza cuáles son los factores regulatorios que se ven involucrados y muchas de las propuestas de regulación que mencionamos anteriormente aún tienen que ser confirmadas. Dado el papel que pueden tener las cutinasas en los mecanismos de patogenicidad de los hongos que las producen, resulta de interés realizar estudios sobre los factores transcripcionales que intervienen en la regulación de este sistema.

Factores transcripcionales involucrados en la regulación de cutinasas

Factores que regulan el metabolismo de lípidos

Dado que los hongos son capaces de utilizar numerosas sustancias como fuente de carbono y energía, sus vías metabólicas están estrechamente relacionadas formando redes complejas cuya regulación depende de un gran número de factores transcripcionales y postranscripcionales. Además de la respuesta a la RCC cuando hablamos de azúcares simples como fuente de carbono, existen otros grupos importantes de proteínas que se encargan de mediar el catabolismo de nutrientes más complejos que pueden ser utilizados. Los hongos, por su versatilidad metabólica son capaces de utilizar lípidos como única fuente de carbono y energía. Luego de la β -oxidación, la acetil CoA correspondiente es convertida en compuestos de C4 mediante la vía del glioxalato (que utiliza a las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa) permitiendo así la entrada hacia la gluconeogénesis (Hynes *et al.*, 2006). En los hongos, estos últimos pasos en el catabolismo de ácidos grasos se llevan a cabo en organelos específicos llamados peroxisomas donde además se encuentran enzimas encargadas de la síntesis de colesterol. Estos organelos tienen un papel crítico en el crecimiento, desarrollo y patogénesis de los hongos (Galagan *et al.*, 2005).

Es así que el catabolismo de lípidos se encuentra estrechamente relacionado con otras vías metabólicas como la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico y por tanto, que la utilización de

lípidos como fuente de carbono y energía se vea afectada por factores regulatorios globales como los que participan en la RCC pero también por otros factores específicos para las vías lipolíticas.

Factores que responden a estrés ambiental

La producción de cutinasas como respuesta al estrés.

Se sabe que los organismos fitopatógenos pueden producir más de una cutinasa; y que las diferentes cutinasas pueden tener distintas funciones y expresarse en condiciones de crecimiento específicas. Por ejemplo, en el patógeno del arroz *Magnaphorte grisea* se encuentran codificados 17 genes de cutinasas, muchos de los cuales no tienen una función conocida: pero se identificó que la cutinasa CUT2 se expresa en grandes cantidades durante la formación del apresorio y la penetración y que es necesaria para la formación normal del apresorio, el sensado de la superficie y la infección a las hojas del arroz (Skamnioti y Gurr, 2007). Esto sugiere una subfuncionalización dentro de la familia de las cutinasas.

En el patógeno del durazno, *Monilinia fruticola* se estudió la regulación de la cutinasa MFCUT1 y se encontró que en sus regiones regulatorias no está presente la secuencia de unión para factores homólogos a CTF1 α o CTF1 β , los únicos factores hasta entonces descritos como aquellos que regulan la expresión de cutinasas. Esto indicó que los factores que inducen la expresión de la enzima debían ser distintos a los conocidos. Como se sabía que MFCUT1 es regulada de forma negativa en presencia de compuestos fenólicos producidos por la planta hospedera, se buscaron sitios de unión a factores transcripcionales involucrados en la respuesta al estrés oxidativo*. Lee y colaboradores encontraron 6 sitios putativos de unión para el factor AP-1 en la región promotora del gen (Lee *et al.*, 2010). Este factor transcripcional es un componente central de las vías de transducción de señales para combatir el estrés oxidativo tanto en mamíferos como en levaduras. Los elementos centrales de muchas de estas vías son proteínas cinasas activadas por mitógeno o MAPKs que

* Aunque el término *oxidativo* es un anglicismo, su uso está ampliamente extendido en la literatura científica en español, por lo que será utilizado así en este trabajo.

interactúan con sistema de dos componentes (TCS) también conocidos como sistema de fosfotransferencia de Histidina a Aspartato. Las MAPKs que transmiten específicamente señales de estrés son también conocidas como SAPKs o proteínas cinasas activadas por estrés. En *A. nidulans*, existe la vía HOG-MAPK está conformada por las proteínas SskB, PbsB y Hog/SakA (Asano et al, 2007). Esta última se activa en presencia de las ERO por acción de la proteína reguladora de respuesta (RR) del TCS, SskA, que es responsable de la expresión de genes de tolerancia al estrés como *catB* en hifas para la inducción del gen de la catalasa CatB en respuesta al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y la acción de este factor también es requerida para que la catalasa CatA tenga una acción normal en los conidióforos (Aguirre et al, 2006; Hagiwara et al, 2007). El otro RR involucrado en la respuesta a estrés oxidativo es SrrA, un factor que también activa la transcripción de CatB pero uniéndose directamente a su región promotora; es decir, actuando por lo tanto como un factor transcripcional (Hagiwara et al, 2016) (Fig. 10).

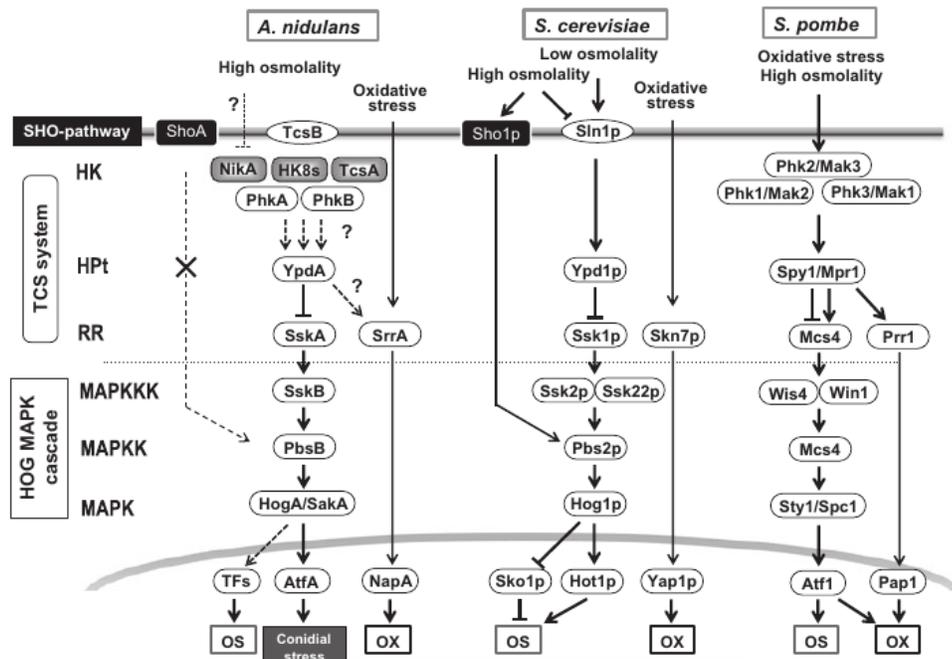


Figura 10. Esquema que demuestra la acción acoplada entre los TCS y las vías MAPK en respuesta a distintos tipos de estrés en *A. nidulans*, *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Tomado de Hagiwara et al., 2016).

El encendido de estas cascadas de señalización redox incluyen la activación de proteínas reguladas por este tipo de estrés y cambios en la expresión génica. La expresión del factor

AP-1 en levaduras está inducida por H_2O_2 y se sabe que componentes generados por la célula vegetal como los ácidos clorogénico y cafeico inducen cambios en el potencial redox del medio al que se enfrentan los patógenos. En el estudio de Lee y col., se observó que en *M. fruticola*, el H_2O_2 incrementa la expresión de *MfCut1* y previamente se había encontrado que en otros hongos patógenos como *Botrytis cinera* y *Sclerotinia sclerotiorum* se ha observado una correlación positiva entre los niveles de H_2O_2 y el desarrollo de síntomas de infección que generan en *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2010). Esta evidencia sugiere que el H_2O_2 generado durante la respuesta de la planta a la infección actúa a su vez como inductor de la virulencia, aumentando la expresión de cutinasas y otros factores de patogenicidad. Sin embargo, aún no se ha caracterizado más ampliamente este tipo de regulación.

Por todo lo anterior, hasta ahora se han propuesto algunos factores que afectan la expresión de cutinasas, como la fuente de carbono presente en el medio, la respuesta a la regulación global del catabolismo de lípidos o la respuesta a estrés generado por las plantas.

ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO

En el grupo de trabajo se comenzó a estudiar la producción de enzimas de interés biotecnológico, destacándose la búsqueda de aquellas involucradas en la degradación de lípidos y otros ésteres, en la cepa *A. nidulans* PW1. A partir de un medio base formulado por Peña-Montes (2008) para la detección de actividad tipo esterasa de ácidos carboxílicos (CEHM o Carboxylic Ester Hydrolase's Medium por sus siglas en inglés) y variando la fuente de carbono se detectó una esterasa involucrada en la biosíntesis de precursores de aflatoxinas, una proteasa con actividad promiscua de esterasa y, más recientemente, dos proteínas de 22 kDa y 29 kDa que corresponden a dos de las cuatro cutinasas reportadas en el genoma de *Aspergillus nidulans*. La de 22 kDa presentó un 65% de similitud para la secuencia reportada para el gen *an5309* y se reportó como ANCUT1 y la de 29 kDa tuvo un 72% de similitud con la secuencia reportada para el gen *an7541* denominada como ANCUT2 (Peña-Montes *et al.*, 2008, Castro-Ochoa *et al.*, 2012).

Para la producción de la ANCUT2, Castro-Ochoa formuló el medio CEHM utilizando aceite de olivo y almidón como fuentes de carbono; posteriormente se encontró que sustituyendo el almidón por sacarosa se obtenían las mismas unidades de actividad y se evitaba la gelatinización y retrogradación del almidón por efecto de la autoclave. Se probó la actividad enzimática en extractos crudos modificando la fuente de carbono y se encontró que la producción de la cutinasa de 29 kDa depende de la fuente de carbono presente; lo mismo se ha observado en muchas enzimas utilizadas para metabolizar fuentes de carbono secundarias. Además, se reportó que el hongo es incapaz de crecer en medios que contienen ácidos grasos de cadena media (entre C8 y C12); pero que metaboliza bien triglicéridos y ácidos grasos de cadena corta (menor a C8) y larga (entre C14 y C20) debido a la producción de esterases y lipasas (Castro-Ochoa *et al.*, 2012; Segoviano, 2012).

Por otro lado, para la producción de la ANCUT1 se modificó el medio CEHM usando cutina de manzana como fuente de carbono y se encontró que el glicerol al 0.1% aumentaba

considerablemente la actividad según lo demostrado por Esqueda en 2012 (Castro-Ochoa *et al.*, 2012, Esqueda, 2012).

Posteriormente, se realizó la purificación de las dos proteínas ANCUT1 y ANCUT2 utilizando una Electroforesis Desnaturalizante de Elusión Continua (CEDE por sus siglas en inglés). Una vez puras, se caracterizaron mediante pruebas espectrofotométricas con ésteres sintéticos para conocer sus temperaturas y pHs óptimos de ensayo, su estabilidad térmica, ácida y alcalina y su perfil hidrolítico (Bermúdez *et al.*, 2017; Vega *et al.*, sometido). Para observar la actividad en zimograma y espectrofotómicamente, las fracciones puras fueron renaturalizadas con Tritón X100 luego de su colecta. En la figura 11 pueden observarse las bandas correspondientes a las proteínas puras tanto en geles SDS-PAGE como zimogramas contra Acetato de α -Naftilo.

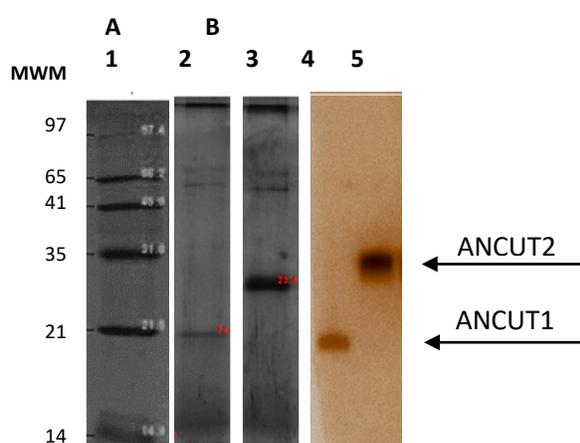


Figura 11. A. Geles SDS-PAGE (teñido con plata) y B. Zimograma revelado con Acetato de α -Naftilo y Fast Red de las fracciones purificadas de cada cutinasa. Carril 1: MPM Low Range (Biorad). Carriles 2 y 4: fracciones purificadas de la cutinasa de 22 kDa. Carriles 3 y 5: Fracciones purificadas de la cutinasa de 29 kDa (Bermúdez-García, 2017; Vega, sometido).

Los resultados abreviados de la caracterización pueden verse en la tabla 6; en donde observamos que la cutinasa ANCUT2 tiene una mayor afinidad por sustratos de cadena larga (>C16) mientras que la ANCUT1 presenta mayor afinidad por cadenas cortas. Esto podría ser una posible explicación para el hecho de que mediante Cromatografía de Capa Fina (CCF) no se detectó la hidrólisis de cutina por la cutinasa de 22 kDa y por la de 29 kDa sí. Sin

embargo, hacen falta todavía más estudios estructurales, regulatorios y analíticos para poder comprobar esta hipótesis.

Tabla 6: Caracterización bioquímica de las cutinasas de *A. nidulans* encontradas en el grupo de trabajo

Enzima	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Estabilidad a temperatura	Estabilidad a pH	Preferencia en largo de cadena	Hidrólisis de cutina
ANCUT1	60	9	>80% de actividad a 60 °C 1h	>80% hasta por 3h a pH 10	sustratos de cadena corta	No detectada por CCF
ANCUT2	60	9-10	>80% de actividad a 60 °C 1h	>80% hasta por 3h a pH 10	Sustratos de cadena corta y un poco frente a cadena larga	Positiva por CCF

(Bermúdez-García *et al.*, 2017; Vega, sometido)

Por último, se realizaron ensayos enzimáticos donde se encontró que ambas cutinasas, ANCUT1 y ANCUT2 luego de 72 h de reacción a 60 °C son capaces de llevar a cabo reacciones de entre metanol y aceite de ajonjolí para sintetizar metil ésteres que son precursores del biodiesel como se observa en la figura 12 (Bermúdez *et al.*, 2017).

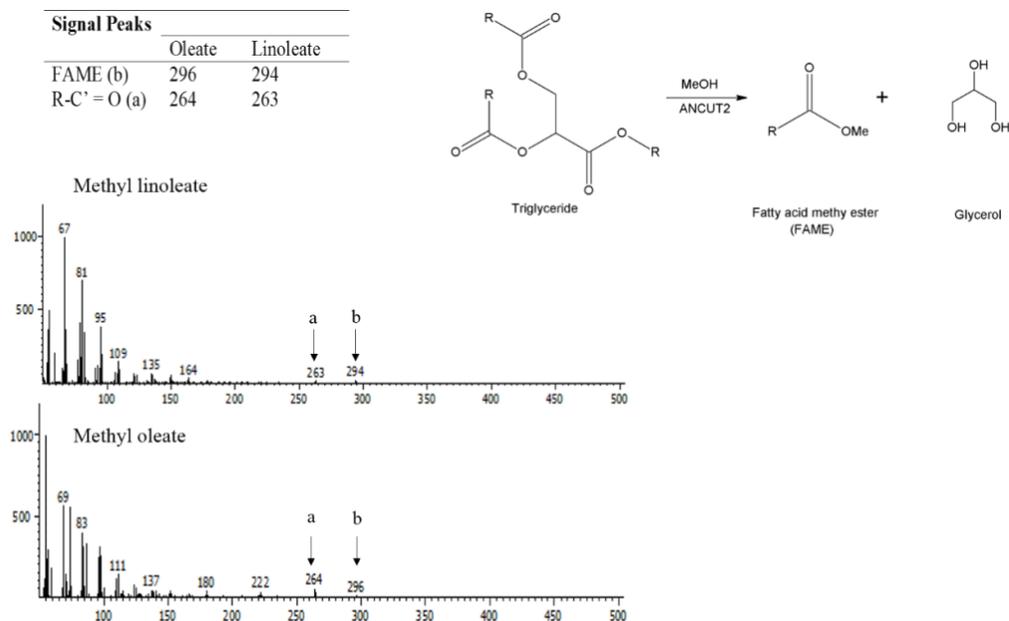


Figura 12. Cuantificación por RMN de los metil ésteres sintetizados por ANCUT2. Tomado de Bermúdez *et al.*, 2017.

Hasta ahora se han identificado y caracterizado dos de las cuatro cutinasas putativas reportadas en el genoma de *A. nidulans*: ANCUT1 y ANCUT2. Las dos cutinasas restantes no han sido detectadas y solamente se encontró el transcrito de una de ellas al utilizar como fuente de carbono corteza vegetal (Martins *et al.*, 2014).

Los trabajos previos en el grupo de investigación sugieren que, debido a las diferencias en el perfil hidrolítico de las 2 enzimas caracterizadas, probablemente las cutinasas producidas por *A. nidulans* tienen papeles diferentes dentro de la fisiología del microorganismo. Aunque se desconocen las condiciones en las que se expresan cada uno de los genes que las codifican, se propone que su regulación podría estar relacionada con la del metabolismo de lípidos como se ha visto en otros hongos (Hynes *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2012).

En este trabajo se buscarán las condiciones de expresión de las cuatro cutinasas producidas por *A. nidulans* y se estudiará su papel en la degradación de cutina para poder explicar si constituyen un sistema que actúa de manera conjunta o si por el contrario se expresan de forma diferenciada, permitiendo que el hongo crezca bajo distintas condiciones nutricionales. De esta forma se generará un modelo que explique el sistema cutinolítico en *A. nidulans*.

HIPÓTESIS

La expresión inducida o constitutiva de cada uno de los genes codificantes para cutinasas en *A. nidulans* depende de los factores transcripcionales que los regulan, en respuesta a las fuentes de carbono disponibles. Por tanto, al modificar la composición del medio de cultivo, los genes *ancut1*, *ancut2*, *ancut3* y *ancut4* son expresados de manera diferencial, ante la presencia de sustratos lipídicos o en condiciones de estrés.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de expresión de los genes que codifican para las cuatro cutinasas reportadas en el genoma de *A. nidulans*, así como los posibles factores transcripcionales que regulan su expresión para proponer un modelo que explique el papel de cada enzima dentro del sistema de estudio y su función en la degradación de cutina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si la expresión de cada una de las cutinasas se ve afectada por la presencia de distintas fuentes de carbono que pudieran inducir o reprimir la expresión.
- Determinar si la expresión de las cutinasas en *A. nidulans* está regulada por los factores de regulación global de lípidos o por algún otro no reportado hasta ahora, que afectan tanto la expresión génica de las cutinasas como la actividad cutinolítica.
- Estudiar la actividad hidrolítica de cada enzima sobre cutina.
- Proponer un modelo del sistema cutinolítico en *A. nidulans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico utilizado.

En este estudio se utilizó la cepa *Aspergillus nidulans* PW1 (*biA1*, *argB2*, *methG1*, *veA1*), auxótrofa para arginina y no patogénica como cepa nativa. Esta cepa puede obtenerse del *Fungal Genetic Stock Center* con el número de colección FGST A1048.

Adicionalmente se utilizaron las cepas mutantes de *A. nidulans* AN Δ FarA (*yA2*; *riboB2*; *pabaA1*; *farA* Δ (*pyrG*⁺)) y AN Δ FarB (*yA2*; *riboB2*; *pabaA1*; *farB* Δ (*pyrG*⁺)) para estudiar el efecto de los factores regulatorios del metabolismo de ácidos grasos sobre la expresión de los genes de cutinasas. Estas cepas fueron donadas por el Dr. Hynes, de la University of Melbourne, Australia y obtenidas a partir de la cepa silvestre FGSC A4 (Glasgow Strain) según el protocolo indicado en Hynes *et al.*, 2006. Por último, se utilizó la cepa mutante AN Δ NapA (*yA2*; *riboB2*; *pabaA1*; *farA* Δ (*pyrG*⁺)) para estudiar el efecto del factor transcripcional que regula la respuesta a estrés oxidativo sobre la expresión del gen *ancut4*. Esta cepa también fue donada por el Dr. Jesús Aguirre (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y obtenida mediante cruza sexual a partir de la cepa silvestre FGSC A4 (Glasgow Strain) según el protocolo indicado en Mendoza-Martínez *et al.*, (2017). Para su conservación, las cepas mutantes fueron depositadas en el cepario de la Facultad de Química UNAM bajo los números de acceso CFQH217 (AN Δ FarA), CFQH218 (AN Δ FarB) y CFQH216 (AN Δ NapA).

Preparación de los medios de cultivo.

Para el crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo se utilizó el medio mínimo de Käffer (1985). Adicionalmente, este medio fue usado también como base para la formulación del medio CEHM y del medio con cutina de manzana para detección de actividad de carboxilesterasas. Para la preparación del medio CEHM, el medio mínimo fue modificado según Castro Ochoa y Segoviano Reyes añadiendo 500 mg/L de sacarosa y 0.5% de Aceite de Olivo emulsificado (Castro-Ochoa, 2012; Segoviano 2012). Para la preparación del medio con cutina de manzana, el medio mínimo fue modificado según Castro-Ochoa y

Esqueda-Domínguez añadiendo 0.5% de cutina de manzana (Castro-Ochoa, 2012; Esqueda, 2012). La composición detallada de estos tres medios se describe en el Anexo B.

Los demás medios utilizados en este trabajo para observar la influencia de la fuente de carbono como inductor/represor sobre la expresión de los genes de las cutinasas de *A. nidulans* fueron preparados a partir del medio mínimo, sustituyendo a la glucosa por fuentes de carbono de origen lipídico como cutina, aceite de olivo, ácido 16-hidroxidecanoico, ricinoleato de propilo, triestearato, tributirato, triacetato, o por otras como almidón o pectina. Para el crecimiento de las cepas mutantes, según lo reportado previamente por Hynes y colaboradores (Hynes *et al.*, 2006), se utilizó un stock de vitaminas cuya composición se detalla en el Anexo B.

Para ensayar el efecto del estrés oxidativo sobre la expresión y producción de cutinasas, se modificó el medio con cutina agregando agentes causantes de EO a distintas concentraciones para encontrar una condición bajo la que el hongo estuviera sometido a estrés oxidativo no letal; de forma que se pudiera obtener RNA de calidad amplificable. Los agentes probados fueron H₂O₂ 0.5, 2, 3 y 4 mM y Paraquat® 10 µM. Primero, se creció a *A. nidulans* durante 24 h en medio sin EO para la generación de biomasa y posteriormente se añadieron los agentes oxidantes. Se ensayaron tres distintos tiempos de inducción: 30, 60, y 360 minutos.

En todos los cultivos se utilizaron matraces de 250 mL con medio a una quinta parte de su capacidad que se inocularon con 1x10⁶ esporas/mL como concentración inicial y se incubaron 24 h a 37°C y 300 rpm, salvo en los ensayos para probar las condiciones de inducción de estrés oxidativo. El micelio obtenido de la fermentación se filtró utilizando una gasa estéril y se utilizó inmediatamente para la extracción de RNA total. Los sobrenadantes se concentraron mediante ultrafiltración con una membrana de límite de corte de 10 kDa y se almacenaron a – 20 °C para determinar el perfil proteico del medio extracelular.

Conservación de las cepas

Las esporas de las cepas de *A. nidulans* fueron cosechadas en placas de medio mínimo y resuspendidas en una solución estéril de leche descremada al 5% y se conservaron

en sílica gel a 4 °C en tubos de vidrio con sello hermético. Para la conservación de estas esporas se colocó 1 mL de la solución de leche descremada sobre la caja Petri con el cultivo de esporas y se rasparon estas esporas con un asa micológica. Se tomaron 100 µL de la solución de leche con esporas y se pasaron a un frasco de vidrio que contenía sílica gel estéril y seca hasta una tercera parte. La sílica ya con las esporas se agitó en vórtex hasta deshacer los grumos y formar una mezcla uniforme. Las esporas ya preparadas se almacenaron a 4 °C para su reactivación posterior.

Reactivación de las cepas

Para la reactivación de las cepas, se sembraron aproximadamente cinco granos de sílica gel con esporas en cajas de medio mínimo y se incubaron entre cinco y siete días a 37 °C hasta observar la presencia de esporas. Para cosechar estas esporas se agregó a cada caja 5 mL de una solución de Tween 80 al 0.1%. Se raspó cada caja con el asa micológica y la solución de esporas se colectó en un tubo Falcon estéril de 50 mL. Se centrifugó cada tubo a 10,000 rpm por 15 minutos en una Centrífuga Biofuge (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) y se desechó el sobrenadante. Las esporas se lavaron con 10 mL de agua desionizada y estéril preenfriada en hielo y se centrifugaron a las mismas condiciones. El lavado se repitió dos veces más y al final las esporas se resuspendieron en 5 mL de agua estéril.

Posteriormente se llevó a cabo el conteo de esporas en una cámara de Neubauer (Ver Anexo C) para conocer el volumen necesario que debe agregarse a cada matraz para inocular 1×10^6 esporas/mL como concentración inicial. La solución de esporas se almacenó en un tubo Falcon sellado con Parafilm© a 4 °C.

Determinación de las condiciones de estrés oxidativo. Optimización del Medio de Inducción de Estrés Oxidativo (MIEO)

Para determinar las condiciones óptimas, se creció a *A. nidulans* PW1 por 24 h en medio mínimo para la generación de biomasa y posteriormente se añadieron los agentes hasta un tiempo total de contacto de 6 h. Posteriormente el micelio se filtró y se comparó

cualitativamente contra un control al que no se añadió agente para observar la letalidad del agente y se determinó cualitativamente la cantidad de biomasa obtenida en cada ensayo y además se realizaron extracciones de RNA total para observar en gel y espectrofotométricamente la calidad y cantidad obtenidas. Los sobrenadantes fueron concentrados mediante ultrafiltración con límite de corte de 10 kDa y almacenados a -20 °C para su posterior utilización.

Extracción de RNA total

Utilizando Trizol®

Se filtró el micelio del hongo utilizando una gasa estéril y se pesaron 300 mg por extracción. La cantidad pesada se colocó en un mortero previamente flameado con etanol al 70% y se agregaron 1.4 mL de solución TRI Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Se molió el micelio hasta obtener un homogenizado que se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL tratado con una solución de DEPC al 0.1% para terminar de homogenizarse utilizando un vórtex.

Posteriormente se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Biofuge (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 100 µL de cloroformo/mL de solución TRI. Se homogenizó la solución mezclando por inversión y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA).

Se centrifugó el tubo a 12,000 g por 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo. Se agregaron 500 µL de isopropanol/mL de reactivo TRI y se homogenizó en un vórtex durante 5-10 segundos para posteriormente incubar a TA durante 5-10 minutos.

Por último, se centrifugó el tubo a 7500 g durante 8 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. El RNA se observa como un pellet blanco-transparente; para lavarlo se añadió 1 mL de Etanol al 75%/mL de reactivo TRI y se centrifugó a 7500g durante 5 minutos para remover el etanol. Se dejó secar el pellet durante 3-5 minutos para al final disolver el RNA en agua tratada con DEPC al 0.1%.

El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Epoch (BioTek, VT, USA), con el plato Take3 y se analizaron los resultados en el Software Gen5 1.10 de la misma marca. La integridad del RNA se observó mediante un gel de agarosa con formaldehído al 37% en una electroforesis sumergida en una cámara Hoefer HE 33 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA).

Utilizando el kit RNeasy Mini de Qiagen® (Apartado para tejido vegetal y hongos filamentosos)

Se pesaron 300 mg de micelio fresco y se colocaron en un mortero previamente flameado con etanol al 70%. El tejido se pulverizó y se añadieron 450 μ L de Buffer RLC (Qiagen, MD, USA) para ayudar a romper el tejido. La mezcla resultante se colocó en un tubo eppendorf tratado con DEPC al 0.1% y se mezcló vigorosamente en un vórtex. El lisado se transfirió a una columna QIAshredder y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un eppendorf de 1.5 mL tratado con DEPC al 0.1%. A este sobrenadante se añadieron 0.5 volúmenes de etanol (96-100%) y se mezclaron por pipeteo. La mezcla se colocó en una columna RNeasy Spin Column (Qiagen, MD, USA) y se centrifugó a 10000 g durante 15 segundos. El sobrenadante se descartó y la columna se colocó en el mismo tubo colector.

Posteriormente se añadieron 700 μ L de buffer RW1 (Qiagen, MD, USA) y se centrifugó la columna a 10,000 g durante 15 segundos. El sobrenadante fue desechado nuevamente. Para lavar la columna se añadieron 500 μ L de buffer RPE + Etanol (Qiagen, MD, USA) y se centrifugó a las mismas condiciones. Luego de desechar el sobrenadante, se añadieron otros 500 μ L de buffer RPE y se centrifugó nuevamente a 10000 g durante 2 minutos. Para eliminar las trazas de etanol, se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se centrifugó a las mismas condiciones durante otro minuto. Por último, se colocó la columna en un eppendorf de 1.5 mL tratado con DEPC al 0.1% y se centrifugó a 10,000 g durante 1 minuto para eluir el RNA en 30-50 μ L de agua libre de RNasas.

Los dos métodos ensayados para la extracción de RNA total a partir del micelio del hongo, permitieron obtener RNA de calidad amplificable, como se observa en el gel de Agarosa-Formaldehído teñido con EtBr (Fig. 13) donde están presentes las bandas correspondientes a las subunidades mayores del RNA ribosomal (28S y 18S) y también es posible observar las

especies pequeñas de RNA en la parte baja del gel. Además, se observa que no hay presencia de DNA contaminante en la parte superior del gel. Al realizar la cuantificación espectrofotométrica (Tabla 7), se comprobó la buena calidad del RNA ya que la relación 260/280 se encuentra entre 1.8 y 2.1 en todos los casos. Sin embargo, como se obtuvo mayor concentración de RNA al utilizar el TRI Reagent, se decidió utilizar este método en todas las extracciones subsecuentes.

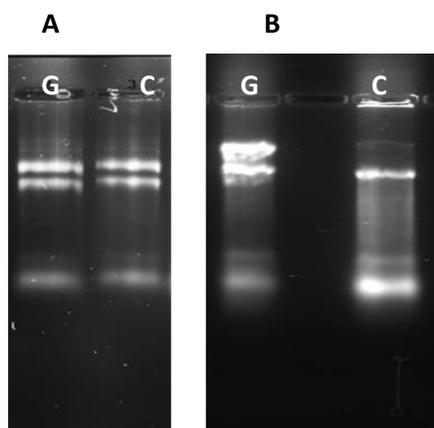


Figura 13. Geles de agarosa al 1.5% con formaldehído para visualizar la calidad del RNA total extraído con A: Tri Reagent®, B: RNeasy Plant Mini Kit. Carriles G: Medio mínimo, C: Medio con cutina

Tabla 7. Cuantificación del RNA total extraído con Tri Reagent® y RNeasy Plant Mini Kit en medio mínimo

	Trizol	RNeasy Plant Mini Kit
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	1198.14	474.635
Relación_{260/280}	2.199	1.828

Posteriormente se realizó una cinética para determinar el tiempo óptimo de crecimiento que permitiera obtener RNA de buena calidad y amplificable. Se eligieron puntos de obtención del micelio de *A. nidulans* crecido en medio mínimo y en medio con cutina (0.5%) luego de 12, 24, 36 y 48 h de crecimiento para evaluar la calidad y cantidad del RNA extraído. Como se observa en la gráfica 1 y en la tabla 8 el tiempo en el que se obtuvo una mayor cantidad de RNA fue a las 24 h, tiempo que corresponde con el final de la fase logarítmica de crecimiento. En este tiempo se obtuvo una relación de absorbancias 260/280 de aproximadamente 2.2, que se encuentra dentro del intervalo óptimo reportado para RNA puro (2.0 a 2.2).

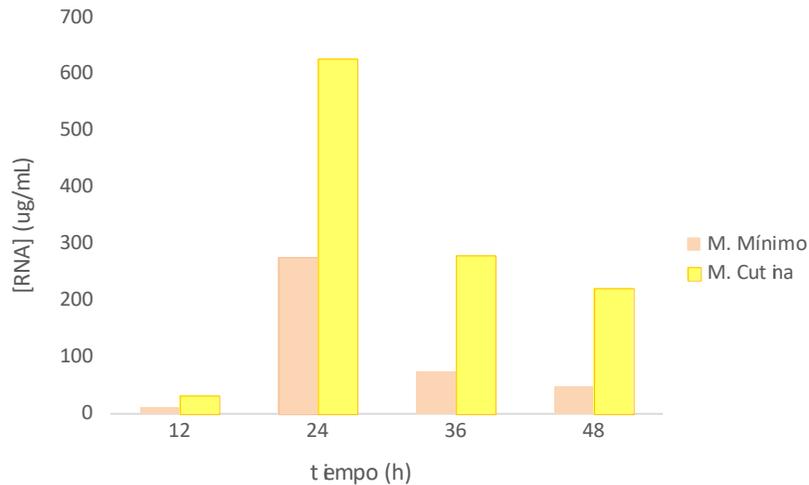


Gráfico 1. Cuantificación de RNA extraído a distintos tiempos de crecimiento.

Tabla 8. Resultados de la cuantificación de RNA en la cinética de crecimiento en MM y medio con cutina.

tiempo (h)	M. Mínimo			M. Cutina 0.5%		
	[ug/mL]	σ^2	Rel _{260/280}	[ug/mL]	σ^2	Rel _{260/280}
12	11.376	0.434	1.94	32.755	0.294	1.857
24	277.161	16.706	2.27	627.566	62.167	2.281
36	73.719	0.569	2.12	280.397	1.038	2.171
48	47.4635	1.968	1.83	222.29	110.917	2.295

Por tanto, se decidió realizar la extracción de RNA de los ensayos subsecuentes luego de 24 h de crecimiento, salvo que el tiempo fuera la variable en algún ensayo en particular. Bajo estas condiciones se sintetizó el cDNA utilizado para los ensayos de qRT-PCR.

Preparación de geles de agarosa/formaldehido

Para un gel (30mL) medir las siguientes cantidades:

Componente	Cantidad
Agarosa ultra pura	0.45 g
Agua desionizada estéril	21.6 mL
Buffer MOPS 10X	3 mL
Formaldehido al 37%	5.4 mL

*Nota: Añadir el formaldehido después de disolver la agarosa y cuando la mezcla no se encuentre tan caliente.

Para preparar 100 mL de buffer MOPS 10X, pesar:

Componente	Concentración	Cantidad
MOPS pH 7.0	0.4 M	9.248 g
Acetato de Sodio	0.1 M	1.36 g
EDTA	0.01 M	0.292 g

Antes de cargar, calentar la muestra con el buffer de carga a 65-70°C por 5 - 15 minutos para desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA y enfriar en hielo inmediatamente. Correr el gel en buffer MOPS 1X a 90 V durante 30 minutos.

Síntesis de cDNA

Se utilizó 1 µg de RNA para la reacción de síntesis de cDNA según lo recomendado en el protocolo de la enzima SuperScript II (Life Technologies, CA, USA). Primero se eliminó el DNA contaminante con un tratamiento con DNasa utilizando la DNase I Amplification Grade (Life Technologies, CA, USA). Para esto se realizó la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Cantidad
RNA	1 µg
Buffer 10X para DNasa	1 µL
DNasa	1 µL
Agua tratada con DEPC al 0.1%	c.b.p. 10 µL

La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a T_{Ay} posteriormente se añadió 1 µL de EDTA y se inactivó durante 10 minutos a 65°C.

Se utilizó esta mezcla de reacción para llevar a cabo la síntesis del cDNA utilizando cebadores oligodT (Sigma Aldrich, MO, USA) y amplificar preferentemente el RNA mensajero; a esta mezcla se adicionaron los siguientes componentes:

Componente	Cantidad
Primer oligodT	1 µL
RNA	1 ng-5 µg
dNTPs	1 µL
Incubar a 65°C durante 5 minutos/ Enfriar en hielo inmediatamente	
Buffer SS 5X	4 µL
DTT 0.1 M	1 µL
RNase out	1 µL
SuperScript II RT	1 µL

Incubar a 50°C durante 1 hora
Inactivar a 70°C durante 15 min

Controles a los que no se añadió Transcriptasa Reversa fueron incluidos para probar la efectividad del tratamiento con DNAsa y verificar que los amplicones obtenidos no provinieran de DNA genómico o contaminante.

Medición de los Niveles de Expresión de los genes de cutinasas bajo distintas condiciones de crecimiento.

Para medir los niveles de expresión de los genes de interés, se utilizaron qRT-PCR multiplex optimizadas según se reporta en el Anexo A. La cuantificación relativa de la expresión de cada gen se llevó a cabo por el método de las dobles deltas reportado por Pfaffl (2001) y según las ecuaciones detalladas en el anexo antes mencionado.

Para facilitar la interpretación de los resultados, se representaron como el logaritmo en base 10 de R (logR). De esta forma, valores positivos indican que el gen aumentó sus niveles de expresión en potencias de diez mientras que valores negativos indican que el gen fue reprimido en esa condición; mientras que valores cercanos a 0 se presentan cuando no hay cambios significativos en los niveles de expresión en comparación con la condición control. Para evaluar el efecto de los factores regulatorios, se compararon los niveles de expresión obtenidos en la cepa nativa contra los de las cepas mutantes en las mismas condiciones de cultivo y utilizando la misma metodología para su cuantificación.

Análisis de las secuencias regulatorias de los genes de cutinasas. Búsqueda de sitios de unión de Factores regulatorios

Se realizó un análisis bioinformático utilizando la herramienta PROMO y la versión 8.3 de TRANSFACT (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) para buscar posibles sitios de unión para factores transcripcionales localizados río arriba del inicio de la transcripción en las secuencias de los genes de las 4 cutinasas. Se analizó una

región de 1000 pares de bases antes del inicio de la transcripción utilizando los parámetros establecidos por Hynes y colaboradores (Hynes *et al.*, 2006).

Cuantificación de proteína en microplaca.

La cantidad de proteína en los sobrenadantes se determinó por el método de Bradford (Lee y Whiteley, 2006) ajustado a microplaca con un volumen final de reacción de 200 μL . Se colocaron en cada pozo 160 μL de muestra (previamente diluida) y 40 μL del reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Para el blanco se colocaron 160 μL de agua desionizada sustituyendo a la muestra. Se homogenizó la mezcla de reacción y se incubó 5 min a TA. La coloración generada se cuantificó en un lector de microplacas Epoch (BioTek, VT, USA) utilizando el software Gen5 1.10, a una absorbancia de 595 nm. La concentración de proteína se obtuvo interpolando la absorbancia en una curva patrón realizada con Albúmina Bovina Sérica (BSA) (Anexo D).

Determinación de actividad tipo carboxilesterasa (CEH) en microplaca. Método cualitativo y cuantitativo.

Determinación cualitativa de actividad CEH.

Para evaluar la actividad de tipo carboxilesterasa se realizaron ensayos cualitativos en microplaca utilizando soluciones de Acetato de α -naftilo (Sigma-Aldrich, MO, USA) como sustrato (*Solución A*) y Fast Red (Sigma-Aldrich, MO, USA) como revelador (*Solución B*). En cada pozo de la microplaca se adicionaron 50 μL del sobrenadante (o de la dilución pertinente del extracto concentrado) y 50 μL de la solución A. Como blanco se usó buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2. La reacción se incubó durante 15 minutos a TA y posteriormente se agregaron otros 50 μL de la solución de Fast Red (B). La aparición de un color rojizo-marrón es indicativa de actividad de carboxilesterasa debido a la hidrólisis del acetato de α -naftilo por parte de la enzima, lo que genera acetato y α -naftol. El naftol reacciona con la sal de diazonio presente en el Fast Red produciendo la coloración.

Preparación de las soluciones A y B:

- *Solución A:* Se pesaron 5 mg de Acetato de α -naftilo, se disolvieron en 0.2 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2
- *Solución B:* Se pesaron 10 mg de Fast Red TR, se agregaron 200 μ L de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2.

Determinación cuantitativa de actividad CEH.

La actividad de carboxilesterasa se cuantificó usando como sustrato *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) 1 mM. Se partió de un stock de *p*-NPA 10 mM en etanol y se hizo la dilución pertinente. Para la medición se utilizó buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.2 que también sirvió como blanco. Se añadió a cada pozo 170 μ L de buffer y 10 μ L de enzima (sustituida por buffer en el caso del blanco) y 20 μ L de *p*-NPA 1 mM para un volumen final de 200 μ L. La cinética de la reacción se monitoreó durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto, en un espectrofotómetro Epoch (BioTek, VT, USA) a una longitud de onda de 420 nm según lo indicado en reportes previos (Nawani, 2006; Schmidt y Bornscheuer, 2005). Las absorbancias obtenidas se interpolaron en una curva patrón de *p*-Nitro Fenol (*p*-NP) (Sigma-Aldrich, MO, USA) y así se obtuvieron las unidades de actividad (U) que se definen como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto (Anexo E).

Obtención del perfil de proteínas y zimogramas e identificación de las proteínas de interés.

Geles SDS-PAGE

La SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de acrilamida al 14% acrylamide, según lo descrito previamente por Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970). Las muestras fueron diluidas en un buffer de muestra desnaturante 4X con β -MercaptoEtanol (Sigma-Aldrich, MO, USA) y calentadas a 95°C durante 5 minutos antes de cargarse en el gel. El peso molecular de las bandas se determinó comparando su movilidad en el gel con la de un estándar de bajo rango

(Low Range Protein Standard) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) que contiene una mezcla de seis proteínas en un intervalo de pesos de 14 a 97 kDa. Los geles se corrieron en cámaras MiniProtean II o III (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) a 4 °C usando un buffer de corrida 1X y a un voltaje constante de 80 V que luego de 30 minutos se incrementó hasta 120 V.

El perfil proteico se visualizó tiñendo el gel con plata según el método de Chevallet (Chevallet, Luche y Rabilloud, 2006) y los geles se documentaron y analizaron con el sistema de fotodocumentación Gel Doc Imaging System y analizaron con el software Image Lab 4.0 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Las bandas con pesos moleculares similares a los reportados para cutinasas fueron cortadas del gel e identificadas mediante LC/MS-MS y los péptidos resultantes comparados contra los reportados en bases de datos del NCBI.

Los resultados de este trabajo fueron complementados con los de la tesis de licenciatura “Detección e Identificación de la cutinasa AN CUT4 de *Aspergillus nidulans* PW1”; en donde se realizó electroforesis en dos dimensiones para identificar otras proteínas secretadas durante la inducción del estrés oxidativo (Bastida, 2018).

Zimogramas

Luego de separar las proteínas presentes en los extractos mediante SDS-PAGE semidesnaturalizante (sin añadir β -MercaptoEtanol al buffer de carga ni calentar las muestras), la actividad tipo CEH con Acetato de α -naftilo y Fast Red fue detectada por zimografía bajo las condiciones reportadas por Castro Ochoa (Castro Ochoa *et al.*, 2012). El gel se incubó a 37 °C con la mezcla de reacción hasta la aparición de bandas color rojo intenso.

Ensayos cutinolíticos

Obtención de cutina

La cutina de manzanas Golden Delicious® se preparó según lo descrito por Walton y Kolattukudy (1972). La estructura de la cutina obtenida fue confirmada mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR). Las mediciones espectrofotométricas por ATR-FTIR se llevaron a cabo a TA en un espectrofotómetro Brüker IFS66/S FTIR (Brüker Daltonics, MA, USA) en el Instituto Tecnológico Químico e Biológico de la *Universidade Nova de Lisboa* en Oeiras, Portugal, bajo la asesoría del grupo de trabajo del *Applied and Enviromental Mycology Lab*, dirigido por la Dra. Cristina Silva Pereira.

Preparación de las muestras para ATR-FTIR.

La cutina en contacto con cada una de las cepas utilizadas en este trabajo se separó del medio de cultivo por filtración con tela Miracloth (Merck-Millipore, MA, USA) se lavó con agua estéril y se congeló en nitrógeno líquido para luego liofilizarse. La cutina seca se molió utilizando un mortero hasta obtener partículas homogéneas que se utilizaron como muestra para los ensayos de ATR-FTIR y de hidrólisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE 1. IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA INDUCCIÓN Y LA REPRESIÓN DE CUTINASAS EN *A. NIDULANS*.

Cuantificación de la Expresión Génica mediante qRT-PCR Multiplex

Con la optimización de dos ensayos multiplex se logró medir los niveles de expresión relativa de tres de los cuatro genes de cutinasas codificados en el genoma de *A. nidulans*; así como un gen endógeno y dos factores transcripcionales que regulan el metabolismo de lípidos mediante reacciones multiplex de RT-qPCR. La implementación de esta técnica permitió evaluar los genes de interés de forma más eficiente, ya que permite el ahorro de tiempo y de consumibles. Los pasos críticos para la optimización fueron la elección del método de extracción de RNA; la adecuada selección del gen endógeno, y la elección de las sondas adecuadas para el multiplex. Una vez optimizados estos parámetros, se pudo encontrar las concentraciones de cebadores y sondas que permitieron la detección de los genes de interés con eficiencias altas de amplificación.

Como se muestra en los anexos A y F, las eficiencias de amplificación de los genes *ancut1*, *ancut2*, *ancut3*, *ubq1*, *farA* y *farB* en las reacciones uniplex y multiplex se encuentran entre el 90 y el 110%, dentro del intervalo óptimo para obtener una correcta cuantificación relativa por el método de dobles deltas modificado por Pfaffl (2001); sin embargo, no fue posible detectar la expresión del gen *ancut4* bajo las condiciones ensayadas. Las razones de porqué no fue posible detectar el transcrito de *ancut4* queda como una interrogante que deberá ser explorada más adelante.

Por lo tanto, se cuantificaron los niveles de expresión de las 3 cutinasas que pudieron detectarse en este ensayo: *ancut1*, *ancut2* y *ancut3* y de los factores transcripcionales del metabolismo de lípidos *farA* y *farB* homólogos a los que regulan la expresión de cutinasas en *F. solani*. Para dar cumplimiento al objetivo específico 1, se probaron distintas condiciones de crecimiento, para detectar si es que existía un efecto de inducción y/o represión asociado al tipo de fuente de carbono en la expresión de los transcritos de

cutinasas y también se analizó, bajo estas mismas condiciones, el perfil de proteínas producidas y la actividad de estas.

Efecto de distintas fuentes lipídicas sobre la expresión de los genes de cutinasas.

Al utilizar sustratos de origen lipídico como fuentes de carbono encontramos una respuesta distinta de la expresión de cada gen. Las fuentes de origen lipídico ensayadas fueron cutina, aceite de olivo (compuesto principalmente por ácido oleico C18:1 y palmítico C16) y dos monómeros sintéticos de cutina: el ácido 16-hidroxihexadecanoico y el propil-ricinoleato. Además, se usaron triglicéridos de cadena corta, media y larga para ver si los efectos estéricos del sustrato afectaban directamente la regulación transcripcional de los genes de cutinasas.

Como se observa en los gráficos 2 y 3 la cutina fue el sustrato que tuvo el mayor efecto positivo sobre todos los genes, seguido del aceite de olivo y del monómero de ácido 16-hidroxihexadecanoico. En presencia de cutina, el gen *ancut1* se sobreexpresa 10000 veces más respecto a la condición control. Este fue también el gen que tuvo los niveles más altos de expresión cuando están presentes en el medio los monómeros de cutina, aunque la expresión bajo estas condiciones solamente aumentó aproximadamente 10 veces con respecto al control. El gen *ancut2* por otra parte aumentó sus niveles de expresión en los medios con cutina y aceite de olivo, pero no parecen incrementarse ante la presencia de monómeros de cutina. Contrariamente a lo observado para estos dos genes, los niveles de expresión de *ancut3* permanecieron constantes en los diferentes medios ensayados, es decir, ninguna de las fuentes de carbono provocó un aumento de los transcritos de este gen y, como ya se mencionó, no fue posible detectar la expresión de *ancut4* en ninguna de las condiciones probadas.

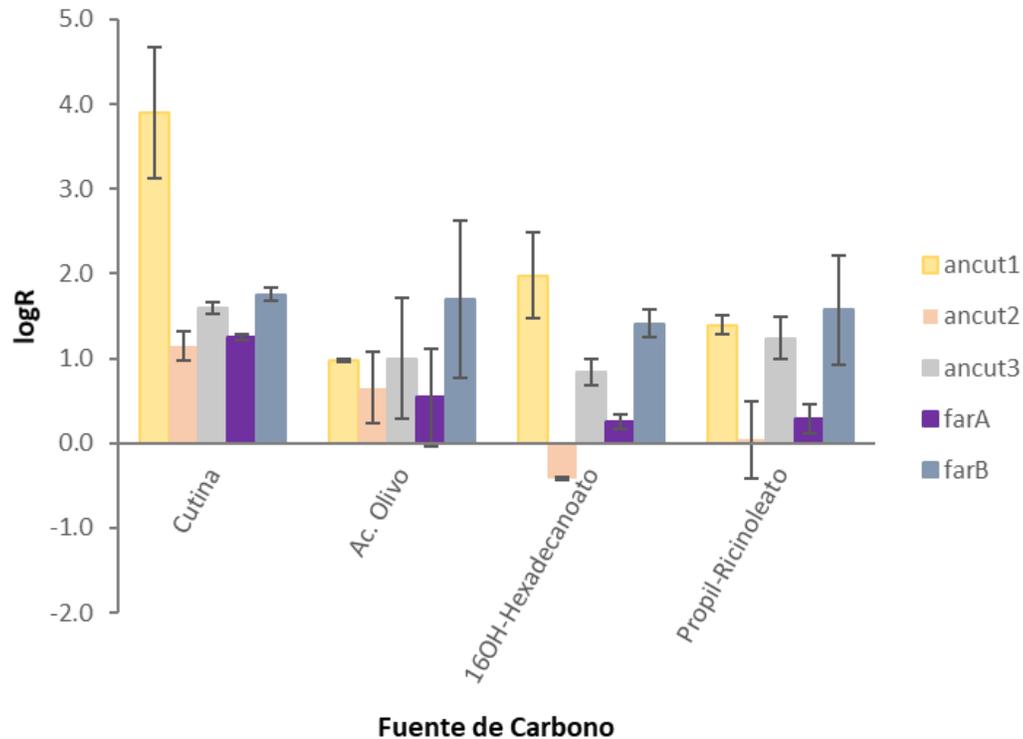


Gráfico 2. Efecto de fuentes de Carbono de origen lipídico en los niveles de expresión de los genes de las cutinasas *ancut1*, *ancut2* y *ancut3* y los FT *farA* y *farB* en *A. nidulans*. Los niveles de expresión se presentan como log de R (número de cambio, que es el número veces que la expresión aumenta o disminuye con respecto a la condición control). Los datos presentados corresponden al promedio de 3 réplicas experimentales de 3 experimentos independientes y las barras de error simbolizan la desviación estándar de los mismos.

La expresión del factor regulatorio *farA* se vió aumentada en todas las condiciones ensayadas, siendo el medio con cutina el que tiene el mayor efecto mientras que los niveles de *farB* fueron constantes en todas las condiciones. De hecho, el comportamiento de *farA* se asemeja al observado para las cutinasas *ancut1* y *ancut2* donde sus niveles de expresión aumentaron al utilizar compuestos lipídicos como fuente de carbono, mientras que para *ancut3* y *farB* parece no haber un efecto de la fuente de carbono. Este comportamiento ya se esperaba, pues FarA es el homólogo al FT CTF1 α cuya expresión se ve afectada por la fuente de carbono; mientras que FarB es homólogo a CTF1 β , cuya expresión es constitutiva (Li *et al.*, 2002).

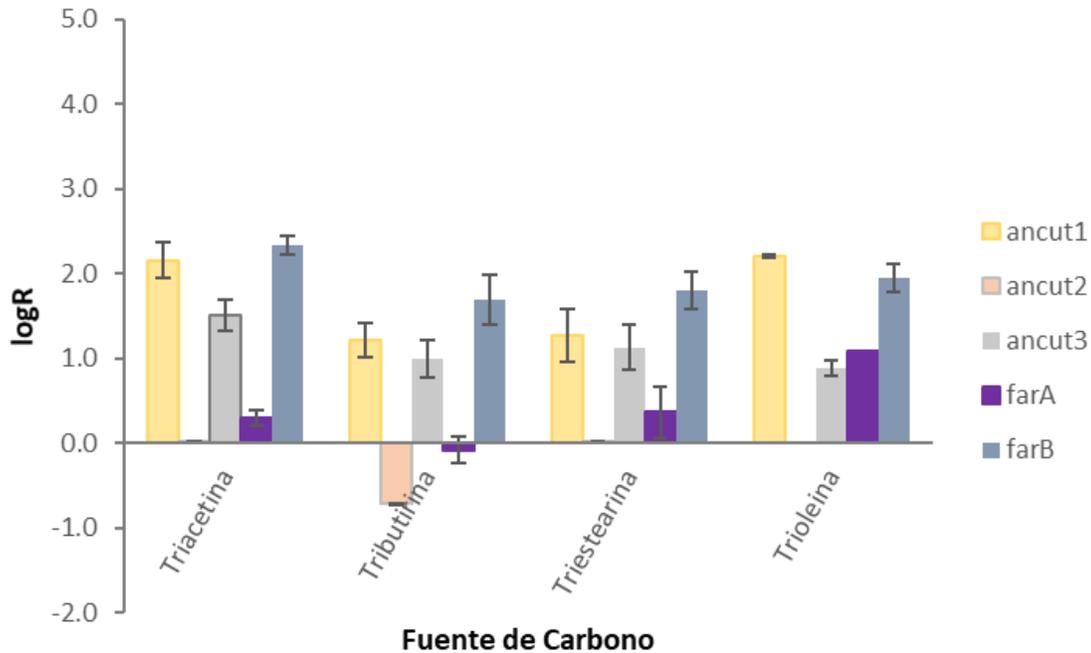


Gráfico 3. Efecto de triglicéridos de distinto largo de cadena en los niveles de expresión de las cutinasas y los FT en *A. nidulans*. Los niveles de expresión se presentan como log de R (número de cambio, que es el número veces que la expresión aumenta o disminuye con respecto a la condición control). Los datos presentados corresponden al promedio de 3 réplicas experimentales de 3 experimentos independientes y las barras de error simbolizan la desviación estándar de los mismos.

Cuando los sustratos utilizados fueron triglicéridos observamos que el hongo fue incapaz de utilizar moléculas de cadena media como única fuente de carbono, pero sí pudo metabolizar triglicéridos de cadena corta o larga. Algunos ácidos grasos de cadena media son tóxicos para los ascomicetos (Castro-Ochoa *et al.*, 2012; Hynes *et al.*, 2006). Por tanto, únicamente se presentan los resultados obtenidos al utilizar triglicéridos de C2, C4, C16 y C18.

Los cuatro triglicéridos tuvieron un efecto activador de aproximadamente 100 veces sobre la expresión de *ancut1* y únicamente de 3 veces sobre el factor *farA*, el cual se expresa en mayor cantidad conforme aumenta el largo de cadena utilizada, como había sido observado previamente (Hynes *et al.*, 2006).

Así mismo, estos lípidos tuvieron un efecto de represión sobre el gen *ancut2* mientras que los genes *ancut3* y *farB*, como se observa en el gráfico 3, siguieron expresándose a niveles constantes independientemente de la fuente de carbono presente.

La sobreexpresión de *ancut1* en presencia de cutina o sus monómeros es similar a lo que se ha observado en otras hidrolasas secretadas por hongos que se inducen en presencia de sus

sustratos principales o de hidrolizados de estos mediante la activación de cascadas de señalización que, sin embargo, todavía no se encuentran bien descritas. Por ejemplo, en el hongo *Trichoderma reesei*, uno de los hongos celulolíticos mejor estudiados, se encontró que la expresión de los genes de endoglucanasas y β -glucosidasas aumenta en presencia de celulosa, pero más tarde se descubrió que dado que la celulosa es un polímero insoluble que no puede internalizarse, la molécula que actúa como inductor del sistema es en realidad un derivado de la hidrólisis de esta, la sofrosa, generada por la acción de una glucosidasa de membrana cuya expresión es constitutiva. Así en presencia de este azúcar se induce la producción de endo y exo glucosidasas que llevan a cabo la degradación de celulosa (Mandels y Reese, 1960).

Efecto de posibles represores sobre la expresión de los genes de cutinasas y sus factores regulatorios

Para estudiar si la expresión de las cutinasas se ve afectada por mecanismos de Represión Catabólica por Carbono (RCC) se probaron fuentes de carbono más fácilmente metabolizables y que están reportadas como represoras para enzimas hidrolíticas de la pared vegetal, ya que son componentes que conforman a las células vegetales como la glucosa en concentraciones mayores al 0.5%, el almidón, y la pectina.

Este mecanismo regulatorio está ampliamente distribuido en los sistemas microbianos y funciona principalmente para asegurar una utilización organizada y secuencial de las fuentes de carbono cuando más de una está presente en el medio. En estas condiciones, la célula cataboliza la mejor fuente de carbono (aquella que proporcione más rápidamente energía y carbono para el crecimiento) presente en el medio. De manera simultánea, la síntesis de enzimas que utilizan los otros sustratos es reprimida hasta que el sustrato preferente es terminado (Sánchez y Demain, 2002). Este tipo de regulación está mediada por factores transcripcionales del tipo dedos de Zinc que reconocen y se unen a la secuencia específica 5'-SYGGRG-3' ubicada río arriba del inicio de transcripción de los genes que modulan.

Es importante recalcar que la RCC no es un simple mecanismo de encendido y apagado de genes, sino un proceso complejo que no sólo depende de la presencia o ausencia de proteínas regulatorias, sino también de la fuente de carbono existente en el medio, que puede actuar como represor fuerte, represor intermedio o no represor (Mogensen *et al.*, 2006).

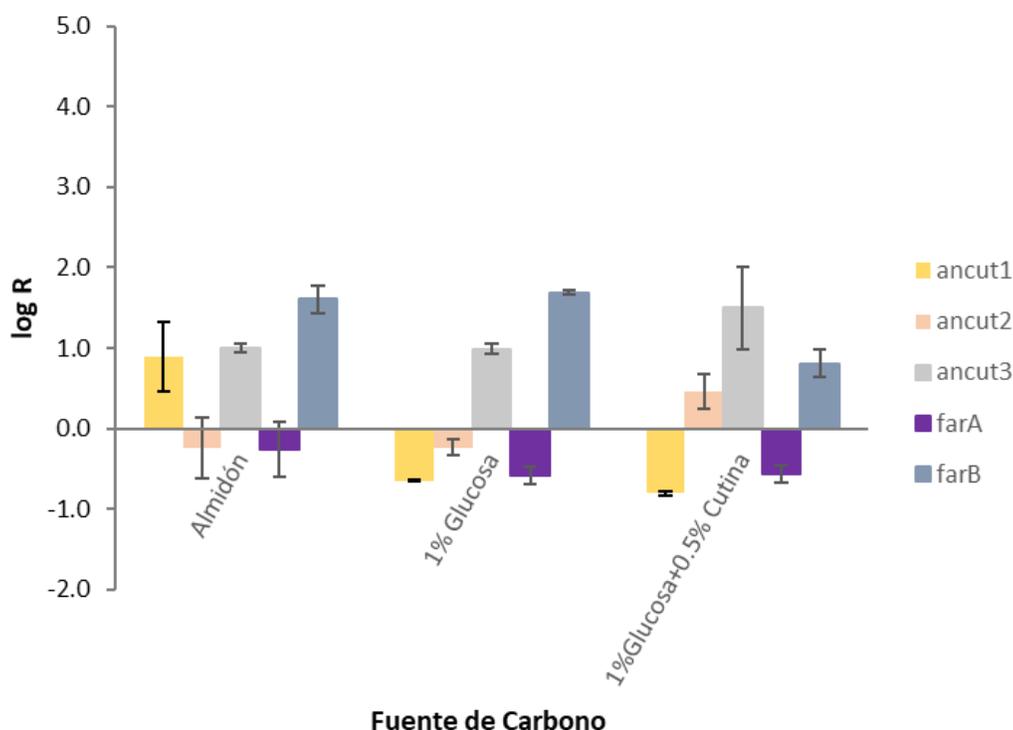


Gráfico 4. Efecto de posibles represores en los niveles de expresión de las cutinasas y los FT en *A. nidulans*. Los niveles de expresión se presentan como log de R (número de cambio, que es el número veces que la expresión aumenta o disminuye con respecto a la condición control). Los datos presentados corresponden al promedio de 3 réplicas experimentales de 3 experimentos independientes y las barras de error simbolizan la desviación estándar de los mismos.

Como vemos en el gráfico 4, de los posibles represores probados la glucosa al 1% tuvo el mayor efecto represor sobre la expresión de los genes *ancut1* y *ancut2* y sobre el factor regulatorio *farA*; pero no tuvo efecto sobre la expresión de *ancut3* y *farB*. Esto sugirió que las cutinasas *ancut1* y *ancut2* se encuentran bajo la regulación de fuentes de carbono más fácilmente asimilables, es decir que presentan RCC como muchas otras hidrolasas involucradas en la degradación del tejido vegetal.

En *Aspergillus nidulans*, se identificó un factor tipo dedos de C_2H_2 Zinc, CreA, que media el catabolismo de numerosas fuentes de carbono como celulosa, xilanos, pectinas, alcoholes

y aminoácidos (Strauss *et al.*, 1999; Aro *et al.*, 2005). Estudios moleculares de este factor han revelado que puede actuar mediante dos maneras: ya sea como competidor directo de otros factores transcripcionales que reconocen secuencias que se traslapan con su secuencia blanco (Mathieu y Felenbok, 1994) o indirectamente previniendo la unión de activadores como en la vía de utilización de prolina (Cubero y Scazzocchio, 1994). Se han identificado ortólogos de CreA en otros hongos, como CRE1 en *H. jecorina* o CreA en *A. niger*, *T. harzianum* y *B. cinerea* y en todos estos organismos esta proteína se encarga de regular la asimilación de diversas fuentes de carbono (Tudzynski *et al.*, 2000; Tamayo *et al.*, 2008; Glass, 2013).

La represión de los genes *ancut1* y *ancut2* en presencia de glucosa 1% podría estar regulada por CreA, cuya acción puede generarse por al menos tres mecanismos: la activación de la expresión del gen *creA* dependiente de monosacáridos; la autorrepresión del gen *creA*, dependiente de la formación de glucosa-6-P, y la regulación de la función de CreA por modificaciones traduccionales o postraduccionales (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015). Sin embargo, en este trabajo no se estudió de manera directa el efecto de esta proteína por lo que es necesario realizar más experimentos que comprueben esta hipótesis.

En el caso de FarA, al ser un factor transcripcional involucrado en el catabolismo de lípidos, fuentes de carbono preferenciales como azúcares simples reprimieron su expresión. Esto coincide con lo que se describió en el modelo regulatorio de Li y colaboradores en donde la expresión del factor homólogo CTF1 α se reprime en presencia de glucosa por la acción de la proteína CreA que es el principal regulador de la RCC en *F. solani* (Li *et al.*, 2002).

Para corroborar la condición constitutiva de *ancut3*, se utilizó un medio en el que no había ninguna fuente de carbono que pudiera inducir ni reprimir la expresión de cutinasas. Se añadió proteosa peptona al medio mínimo como fuente de carbono y se cuantificó la expresión génica de los tres genes a partir de micelio crecido en estas condiciones. Como se muestra en el gráfico 5, los niveles de *ancut3* nuevamente fueron similares a los obtenidos, mientras que *ancut1* y *ancut2* se reprimieron completamente por lo que se confirmó que la expresión de la cutinasa AN CUT3 no depende del tipo de fuente de carbono que esté presente en el medio.

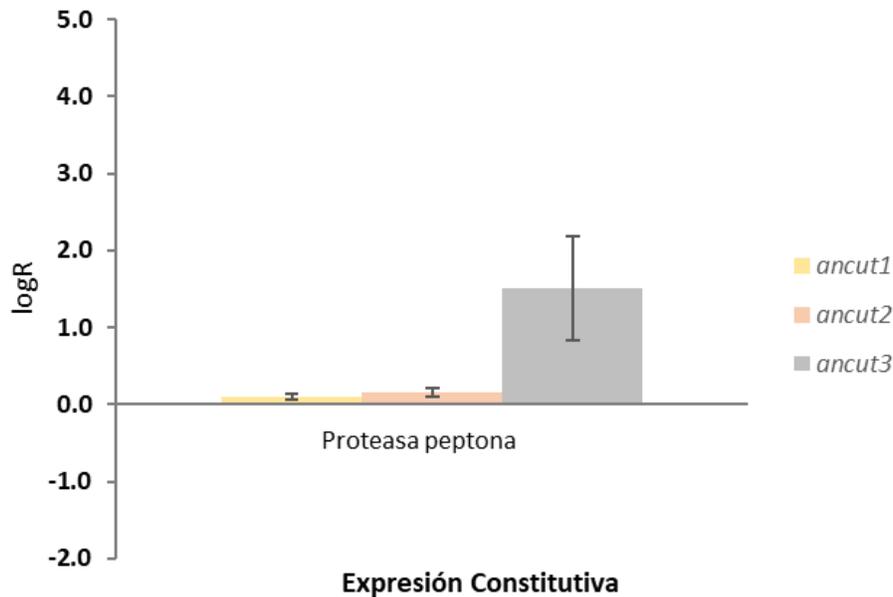


Gráfico 5. Cuantificación relativa de los niveles de expresión de las cutinasas de *A. nidulans* en ausencia de posibles fuentes inductoras o represoras. Los niveles de expresión se presentan como log de R (número de cambio, que es el número veces que la expresión aumenta o disminuye con respecto a la condición control). Los datos presentados corresponden al promedio de 3 réplicas experimentales de 3 experimentos independientes y las barras de error simbolizan la desviación estándar de los mismos.

Correlación de la Expresión Génica y la Actividad de CEH

Para correlacionar los niveles de expresión de los genes con la actividad de las cutinasas se midió espectrofotométricamente la capacidad para hidrolizar *p*-NPA en los sobrenadantes y se hicieron zimogramas revelados con acetato de α -naftilo y Fast Red.

El medio de cutina fue el que presentó una mayor actividad específica, seguido del medio con aceite de olivo y el medio que con ácido 16-hidroxihexadecanoico. Estos medios presentaron también la mayor actividad en zimogramas. La actividad detectada en los medios con almidón o pectina podría deberse a la presencia de otras enzimas que también son capaces de hidrolizar enlaces tipo éster ya que el medio con pectina por ejemplo presentó una banda de actividad en zimogramas de un peso molecular mucho mayor a los reportados para cutinasas.

Por otro lado, en el medio con glucosa al 1% no se detectaron bandas de actividad, pero sí se detectó actividad espectrofotométricamente; que puede deberse a la acción de la

ANCUT3 que no está sujeta a la regulación por carbono y que al tener una expresión tan baja no se detecta en los geles de SDS-PAGE (Gráfico 6 y Figura 14).

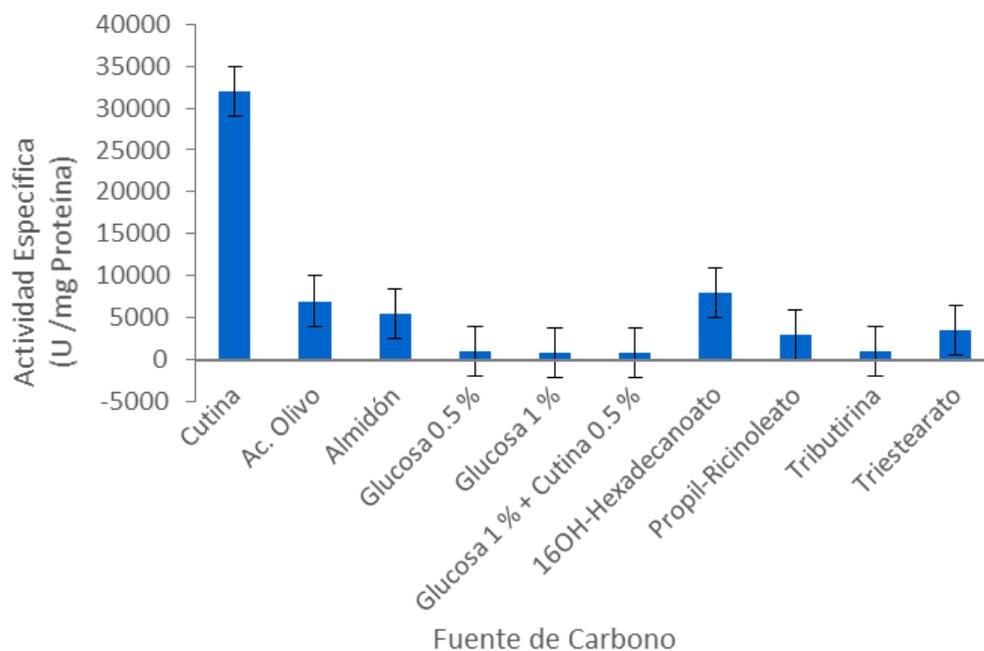


Gráfico 6. Actividad específica de los sobrenadantes de *A. nidulans* crecido en los diferentes medios ensayados, utilizando como sustrato *p*-NPA. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un mmol de *p*-NP por unidad de tiempo.

Lo observado en este trabajo demuestra que fuentes de origen lipídico como los triglicéridos, la cutina y sus monómeros o el aceite de olivo favorecen la actividad de CEH. Mientras que esta actividad se ve disminuida cuando hay otras fuentes de carbono que inducen la RCC, como la glucosa en concentraciones mayores al 0.5%.

La identidad de las bandas obtenidas en el zimograma (Fig.14) corresponde con lo que se reportó en otros trabajos del grupo, donde se identificó la presencia de ANCUT2 en el medio con aceite de olivo a un PM promedio de 28 kDa y de ANCUT1 en el medio con cutina a los 21 kDa aproximadamente (Castro-Ochoa *et al.*, 2012; Bermúdez-García *et al.*, 2017). Sin embargo, la banda con actividad de esterasa de ácidos carboxílicos, visualizada en el medio con proteosa peptona, fue identificada en este trabajo por primera vez, y mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopía de masas, se logró identificar por primera vez a la ANCUT3 con un 42% de cobertura de la secuencia. Los péptidos obtenidos en la identificación de las cutinasas se presentan en la Tabla 9.

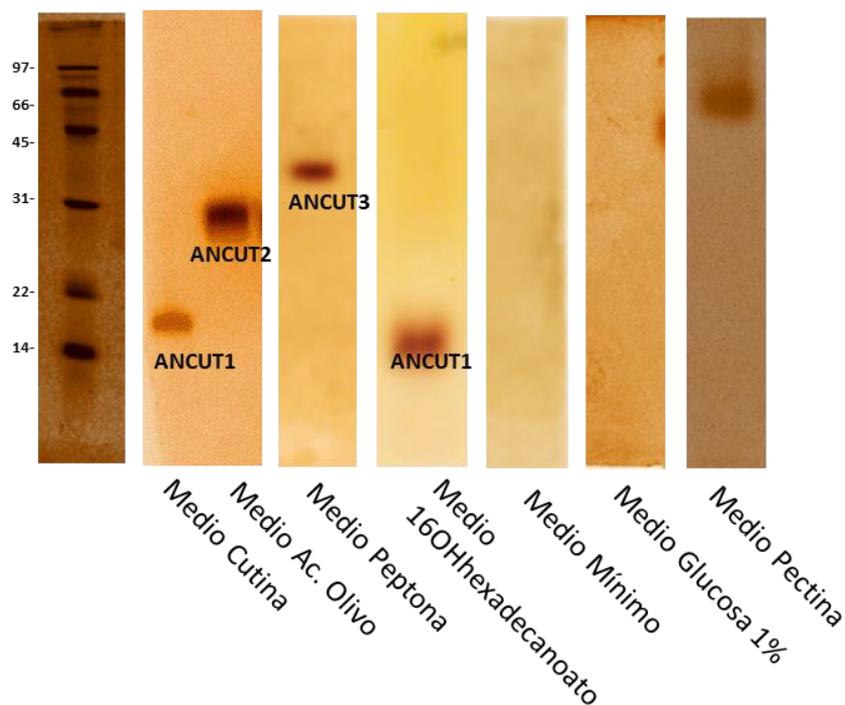


Figura 14. Zimograma de los sobrenadantes obtenidos de los distintos medios ensayados. En cada carril se cargaron 100 μg de proteína total y los geles fueron renaturalizados con Tritón X-100 y revelados con Acetato de α -Naftilo y Fast Red (Bermúdez *et al.*, 2019). Se señalan las bandas cuyo PM coincide con el de AN CUT1, AN CUT2 y AN CUT3 y que fueron identificadas mediante LC/MS.

Tabla 9. Péptidos identificados a partir de las bandas de actividad de tipo CEH detectadas en los zimogramas de los sobrenadantes de *A. nidulans*.

Péptidos identificados	Números de acceso de las proteínas	Cobertura	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> ● IRLDQRQITGNELRDGSCHDVTFFIFARGST ● ELGYLGSTVGPATCNVLK ● KPGQVACQGVAPAYIADLAS ● AVMHAAISTL SSTVQDQIKGVVLFGDTR ● IPNFPTDKTK 	CBF82125.1 (AN CUT1)	56%	Bermúdez-García <i>et al.</i> , 2017
<ul style="list-style-type: none"> ● ADASLGGVACQGVGPKYTAGLAENALPQG ● TSSAAINEAKELFELAASK ● IAGVVLFGDTRNKQDGGQIK 	AN CUT2	26%	Bermúdez-García <i>et al.</i> , 2017
<ul style="list-style-type: none"> ● CPDTQIVAGGYSQGSVIDNAIQK ● GSTEIGNMGFVVGPGVCSNLK ● GVVLFGFTR ● SVAFIFAR ● VACQGVGGAYTAGLIQNALPANTDSGSIK 	CUT13_EMENI (AN CUT3)	42%	Este trabajo

La banda tenue que se observa en el medio con almidón puede deberse a la acción de otras lipasas o esterasas presentes en ese medio, ya que mediante PCR en tiempo real no se detectó un aumento en la expresión de los transcritos en estas condiciones.

Con los resultados obtenidos, observamos que la cutina actúa como inductor para los genes *ancut1*, *ancut2* y *farA* mientras que los monómeros de ella inducen la expresión de *farA* y *ancut1*, pero no de las otras cutinasas estudiadas. Ya que FarA y las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 se inducen en las mismas condiciones, mientras que FarB y ANCUT3 se expresan de forma constante, y recordando que los factores FarA y FarB son homólogos a los que en *F. solani* regulan el sistema cutinolítico. Los datos sugieren que FarA es el factor encargado de regular a las cutinasas que se expresan en presencia de cutina (ANCUT1 y ANCUT2) o sus monómeros (ANCUT1), es decir, a las cutinasas inducibles, mientras que FarB es el factor que regula la expresión constitutiva de ANCUT3. Además, vemos que cada una de las cutinasas responde a distintas condiciones ya que mientras ANCUT1 se induce por los monómeros de cutina, ANCUT2 presenta sus mayores niveles de expresión en presencia del polímero de cutina y ANCUT3 tiene una expresión basal incluso en ausencia de fuentes inductoras.

Esta información nos lleva a proponer que la expresión de las cutinasas en *Aspergillus nidulans* ocurre de manera diferencial dependiendo de las condiciones de crecimiento en que se encuentre el hongo y que el tipo de fuente de carbono a la que tenga acceso va a definir el patrón de expresión cutinolítico. Por ejemplo, cuando no hay cutina presente en el medio, se generan cantidades pequeñas del transcrito del gen *ancut3* que actuaría como una enzima de expresión constitutiva, de forma similar a las Cut2 y Cut3 en *F. solani* (Li *et al.*, 2002). Esta actividad basal permitiría que cuando el hongo perciba cutina en el medio, comience a hidrolizarla y que genere pequeñas cantidades de monómeros de cutina que inducirían la expresión del gen *ancut1*, que según lo observado en zimogramas presenta la mayor actividad, para continuar con la degradación del polímero. Una vez activada la expresión de ANCUT1, la acción hidrolítica de ANCUT3 dejaría de ser significativa. Por otro lado, si desde un principio el hongo sensa la presencia del polímero de cutina podría

inducirse la expresión de la cutinasa AN CUT2 que generaría monómeros de cutina, que dispararán la expresión de AN CUT1. Esto concuerda con lo observado en el grupo de trabajo, ya que AN CUT2 es capaz de hidrolizar el polímero de cutina liberando ácidos grasos libres como el palmítico mientras que AN CUT1 no (Bermúdez *et al.*, 2017, Vega *et al.*, sometido). Demostrar el perfil hidrolítico de AN CUT1 será importante para comprobar esta aseveración, ya que, el hecho de que varias enzimas estén clasificadas dentro de la misma familia indica únicamente el potencial de degradación. Sin embargo, enzimas que tienen la misma actividad pueden tener especificidad por sustratos distintos y generar diferentes productos. Lo que justifica la existencia de varios genes codificantes para un mismo tipo de enzima; sobre todo cuando el sustrato natural es una molécula compleja como lo es la cutina. Esto se ha observado en otro tipo de hidrolasas, específicamente en las llamadas CAZymes (Carbohydrate-Active Enzymes), término utilizado para referirse a aquellas enzimas que actúan hidrolizando polímeros de carbohidratos (Cantarel *et al.*, 2009). Por otro lado, para probar la hipótesis propuesta de que la regulación de las enzimas inducibles está mediada por el FT FarA y la de la enzima constitutiva por FarB se realizaron ensayos de qRT-PCR con cepas mutantes para cada uno de los FT en donde se observó si había cambios en los niveles de expresión de las cutinasas ensayadas y también se estudiaron los cambios en la actividad cutinolítica de estas mismas cepas.

PARTE 2. EFECTO DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES FarA y FarB SOBRE LA EXPRESIÓN DE CUTINASAS EN *A. nidulans*

Análisis bioinformático de las secuencias de las cutinasas en *A. nidulans*.

Identificación de sitios de unión de FarA y FarB

Con los resultados encontrados en este trabajo se propone que *farA* regula la expresión de *ancut1* y *ancut2* cuando hay fuentes lipídicas en el medio y que al haber glucosa se reprime la expresión de *farA* y por tanto la de las cutinasas AN CUT1 y 2. Por otro lado, *farB* se expresa de manera constitutiva y regula la expresión basal de *ancut3*. Estudios previos demostraron que los genes involucrados en la degradación de polímeros complejos, así como en el catabolismo y biosíntesis de metabolitos, están regulados por la disponibilidad de las fuentes de carbono y de nitrógeno y que poseen numerosos sitios de unión para Factores Transcripcionales (FT) especialmente los del tipo Cys₆Zn₂ que caracterizan al género *Aspergillus* (Kobayashi y Kato, 2010).

En la Tabla 10 se muestran las principales familias de FT encontradas en tres especies del género *Aspergillus* y el número de cada uno de ellos. La predicción se llevó a cabo mediante herramientas de análisis bioinformático utilizando la clasificación de familias de Pfam y comprueba la mayor abundancia de los dominios del tipo dedos de Zinc (Machida M y Gomi K, 2010).

Tabla 10. Predicción de las distintas familias de FT en el género *Aspergillus* según PFam.

Tipo de Dominio	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. fumigatus</i>
Clúster de Dedos de Zinc	232	178	187
Dedos de Zn tipo Cys2-His2	58	40	52
Dedos de Zn tipo GATA	6	6	6
Zipper de Leucina bZIP	10	17	19
Hélice- Loop- hélice HLH	13	10	9
Tipo proteínas Myb	18	15	14
Cajas MADS	2	2	2
ATTS	1	3	1
Horquilla	4	4	4
Hélice- Loop- hélice-AraC	1	2	1
RFX	1	1	1

Modificado de Machida M y Gomi K, 2010

La secuenciación del genoma completo de *Aspergillus nidulans* permitió llevar a cabo un análisis bioinformático de las secuencias de los genes *ancut1-4*, para buscar río arriba del inicio de transcripción sitios de unión de Factores Transcripcionales, y de esta forma corroborar la hipótesis anterior sobre el efecto de FarA y FarB en la regulación de la expresión de los genes codificantes para cutinasas.

La búsqueda se realizó 1000 pb arriba del inicio de la transcripción para cada gen y como se muestra en la Tabla 11 los genes *ancut1*, *ancut2* y *ancut3* presentan la secuencia de reconocimiento CCGAGG característica de los factores transcripcionales de cutinasas (Li *et al.*, 2002; Hynes *et al.*, 2006). El hecho de que el gen *ancut4* no la presente puede dar una posible explicación al hecho de que no se logró detectar su transcrito en ninguna condición ensayada.

Tabla 11. Búsqueda de los sitios de unión potenciales de FarA y FarB en las secuencias río arriba de los genes de cutinasas en *A. nidulans*.

SECUENCIA MOTIVO	TF	Gen	Nombre	Posición antes de la región 5'
CCTGCC/GGCAGG	FarA, FarB	AN5309	ancut1	-222, -370, -496
		AN7541	ancut2	-245, -389, -640
		AN7180	ancut3	-212, -629
		AN10451	ancut4	ND

El análisis bioinformático aportó más pruebas para validar la hipótesis sobre el efecto de los FT FarA y FarB sobre las distintas cutinasas; por lo tanto, se decidió trabajar con dos cepas mutantes en las que se interrumpió la secuencia de cada uno de estos factores regulatorios (AN Δ FarA y AN Δ FarB). Estas cepas fueron obtenidas por Hynes y colaboradores mediante recombinación homóloga utilizando un plásmido que contenía el gen marcador *pyrG* flanqueado por secuencias homólogas de cada uno de los factores (Hynes *et al.*, 2006).

Se extrajo RNA de las cepas mutantes AN Δ FarA y AN Δ FarB y se utilizó el cDNA generado para correr una PCR punto final utilizando cebadores específicos para los genes *farA* y *farB* según lo reportado en el Anexo A para confirmar que en las cepas mutantes no había expresión del gen regulatorio. Posteriormente, se utilizaron las cepas mutantes para

estudiar el efecto de estos factores regulatorios sobre los niveles de expresión de los genes de cutinasas y en la actividad de las proteínas que permiten a *A. nidulans* degradar cutina.

Niveles de expresión de los genes de cutinasas en las cepas mutantes AN Δ FarA y AN Δ FarB

Los niveles de expresión de las cutinasas *ancut1*, *ancut2* y *ancut3* fueron determinados en las cepas mutantes bajo las condiciones en las que se había observado previamente una mayor variación de los niveles de expresión (ver resultados de la Parte 1) es decir en presencia de cutina, de aceite de olivo, del monómero sintético de cutina, el ácido 16-hidroxihexadecanoico y de glucosa al 1% bajo la misma cinética que la utilizada con la cepa PW1. Esto se realizó para comprobar si la ausencia de los factores FarA o de FarB afectaba la expresión del sistema. Sin embargo, las cepas mutantes no fueron capaces de crecer en medios con ácido 16-hidroxihexadecanoico como única fuente de carbono por lo que no fue posible obtener valores para este medio. Los resultados de las condiciones restantes se presentan en el gráfico 7 como el logaritmo base 10 de R.

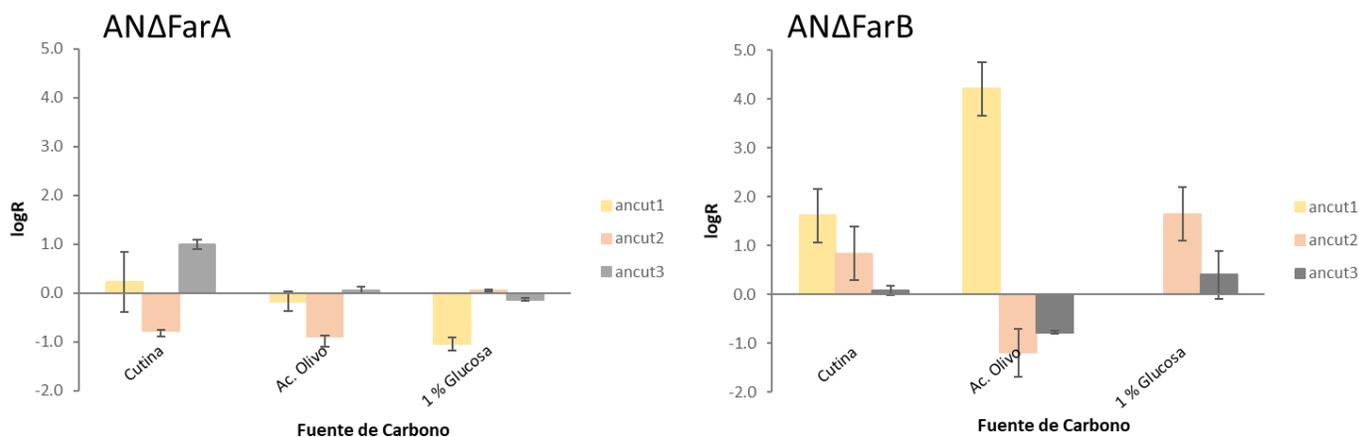


Gráfico 7. Niveles de expresión relativos de los genes *ancut1*, *ancut2* y *ancut3* en las cepas mutantes bajo las condiciones en que se observaron cambios significativos en la cepa control. Se graficó el promedio de 3 réplicas experimentales independientes.

Como se puede observar, en ausencia del FT FarA, los genes de las cutinasas 1 y 2 en presencia de fuentes inductoras como cutina y aceite de olivo disminuyeron considerablemente sus niveles de expresión. El gen *ancut1*, en presencia de cutina, fue el

que presentó mayor variación con respecto a la cepa nativa ya que disminuyó sus niveles casi 10,000 veces. Por otro lado, el gen *ancut3* mantuvo sus niveles de expresión constantes en el medio con cutina, pero disminuyó su expresión en el medio con aceite de olivo. En condiciones represoras (glucosa al 1%) se observó una represión total para los 3 genes estudiados, lo que nos indica que deben existir otros factores transcripcionales involucrados en la RCC de estas enzimas.

Los resultados demuestran que, en presencia de cutina, el FT FarA regula la expresión de las cutinasas *ancut1* y *ancut2*, pero no la de *ancut3*, ya que este gen se sigue expresando de manera constante en ausencia de este factor. Sin embargo, cuando están presentes otras fuentes de carbono de origen lipídico, como el aceite de olivo, la expresión de *ancut3* se ve afectada negativamente por la ausencia de FarA. Esto podría deberse a que FarA regula también el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, como aquellos que componen al aceite por lo que al no estar presente este factor, se afecta la expresión de enzimas que hidrolizan este tipo de sustratos. Otra posible explicación a este fenómeno sería que cuando estas enzimas no están presentes, la expresión de *ancut3* deja de ser basal y se elevan sus niveles al ser la única cutinasa que se expresa en esas condiciones.

Por otro lado, cuando no se expresa el factor FarB se observa una represión del gen *ancut3* cuando la cutina y el aceite de olivo actúan como fuentes de carbono y de forma interesante, en el medio con cutina también se reprime la expresión de *ancut1* y *ancut2*. La explicación probable es que al reprimirse la expresión de *ancut3*, no se generan los monómeros de cutina que sirven de inductores para la expresión de *ancut1* y también afecta la expresión de *ancut2*. El hecho de que en medio con aceite de olivo la *ancut1* no vea afectada su expresión parece indicar que es la presencia de los monómeros de cutina lo que activa su expresión, ya que el aceite de olivo está compuesto por ácidos grasos de C16 y C18:1 (palmítico y oleico) principalmente, similares a los monómeros de cutina (Boskou, 1996).

Por último, en la mutante de FarB, el gen *ancut3* reprime su expresión en presencia de glucosa al 1% lo que confirma que es este factor el que regula su expresión y que al no sintetizarse tampoco se sintetiza el transcrito de esta cutinasa ni en presencia de fuentes lipídicas ni de fuentes represoras.

En el hongo fitopatógeno *F. solani* sp. pisi la expresión de cutinasas está regulada por dos factores de tipo dedos de Zn. Posteriores estudios sobre estos factores transcripcionales permitieron identificar su secuencia y encontrar proteínas homólogas en otras especies de hongos ascomicetos (Garrido *et al.*, 2012). Estas proteínas comparten gran similitud en secuencia en la región de los dominios que conforman el clúster binuclear Zn²-Cys₂ que es el que se une a las secuencias regulatorias del DNA.

La evaluación de los niveles de expresión de las cutinasas en las cepas mutantes ANΔFarA y ANΔFarB refuerza la hipótesis inicial de que los genes *ancut1* y *ancut2* se ven regulados por la acción de FarA y que *ancut3* responde a FarB, de manera similar a lo que ocurre en otros hongos, como *F. solani* sp. pisi, *F. oxysporum*, *A. oryzae*, y *Candida albicans* donde la expresión de cutinasas está regulada por dos factores de tipo dedos de Zn homólogos a FarA y FarB en otras especies de hongos ascomicetos y ortólogos en levaduras (Martinez-Rocha *et al.*, 2008; Ramírez y Lorenz, 2009; Garrido *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos también demostraron que el sistema cutinolítico es más complejo que el reportado anteriormente para *F. solani* (Li *et al.*, 2002) ya que a pesar de que FarA parece ser el principal regulador de la vía, encargado de la acción de las cutinasas que son sensibles a la regulación por fuente de carbono, la ausencia de FarB también causa una disminución en los niveles de expresión de las tres cutinasas cuando la cutina es la única fuente de carbono. Por tanto, la regulación del sistema requiere de ambos factores y sería interesante estudiar si FarA y FarB pueden alternar sus funciones cuando uno de los dos factores no se expresa. Otra perspectiva sería observar qué efecto tiene la eliminación de los dos factores que regulan el sistema en una misma mutante, aunque se ha reportado previamente que los intentos por construir esta doble mutante no han sido fructíferos; probablemente porque esta condición incapacitaría al hongo para metabolizar lípidos e incorporar a los derivados de C₄ de la acetil CoA a la gluconeogénesis mediante la vía del glioxalato (Hynes *et al.*, 2006).

Actividad de las cutinasas en las cepas mutantes evaluada mediante zimogramas

Una vez observado que los factores transcripcionales del catabolismo de lípidos regulan el sistema cutinolítico en *A. nidulans* a nivel de expresión de los transcritos de cutinasas, se decidió observar mediante geles SDS-PAGE y zimogramas si se afecta la actividad de las enzimas. Se utilizó el medio con cutina ya que fue la condición en donde se observaron los mayores cambios a nivel transcripcional y porque es además el sustrato natural de las enzimas en estudio.

En la figura 15 se observa el perfil proteico y las bandas de actividad que encontramos al cargar los sobrenadantes de cada una de las cepas luego de crecer utilizando cutina como fuente de carbono. Cabe destacar que las cepas mutantes tuvieron una menor tasa de crecimiento en este medio comparadas con la cepa control, y que la cantidad de proteína extracelular obtenida fue menor. Para contrarrestar esto, en los geles se cargó la misma cantidad del sobrenadante concentrado por carril (50 µg) y en las mediciones de actividad se trabajó siempre con actividades específicas. Como vemos en el zimograma no se detectaron bandas de actividad en sus extractos. La única banda que se observa corresponde al control de la cepa nativa *A. nidulans* PW1. Así se comprueba que además de afectar la expresión de las cutinasas, los factores regulatorios también tienen efecto a nivel post-transcripcional sobre la actividad de estas. Cabe resaltar que a pesar de que en medio con cutina sí se detectó expresión del transcrito de *ancut3* en la mutante para FarA, esta expresión basal no se tradujo en una actividad posible de identificar en zimograma, por lo que probablemente el transcrito sufre modificaciones post transcripcionales que inactivan a la proteína, como fosforilaciones; o su actividad se encontraba por debajo del límite de detección de la prueba.

En esta misma figura también se observa que el perfil proteico de las dos mutantes es similar entre ellas y difiere considerablemente del obtenido para la cepa control donde también se presenta la banda de aproximadamente 20 kDa que presentó actividad en zimograma y que no se encuentra en los extractos obtenidos de las cepas mutantes.

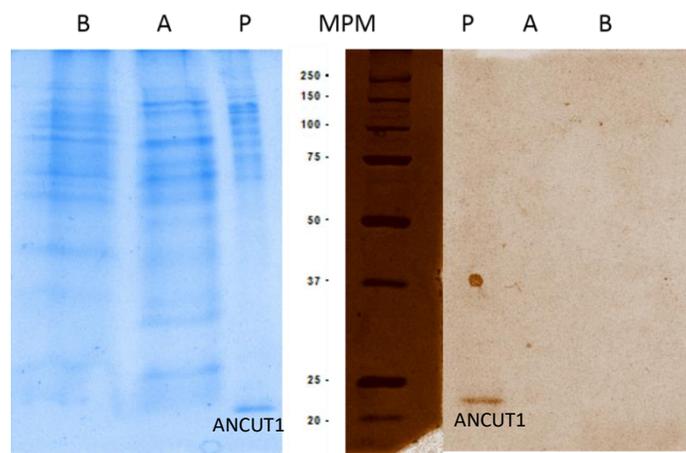


Figura 15. Perfil proteico y zimograma de los sobrenadantes de las diferentes cepas crecidas en medio con cutina obtenidos a partir de geles SDS-PAGE al 14% teñidos con Coomasie (A) o revelados con Acetato de α -Naftilo y Fast Red (B). Carriles MPM: Marcador de Peso Molecular Low Range de Biorad, P: *Aspergillus nidulans* PW1, A: *A. nidulans* AN Δ FarA y B: *A. nidulans* AN Δ FarB. Se señala la banda cuyo PM corresponde al esperado para ANCUT1.

Análisis de la actividad cutinolítica de las cepas mutantes

Una vez que se comprobó que las cepas mutantes no mostraron actividad en zimogramas frente a ésteres sintéticos, se decidió hacer un ensayo para verificar si la ausencia de los factores regulatorios incapacitaba al hongo para degradar cutina. Para este ensayo, se creció a las tres cepas en medio optimizado con cutina y luego de 24 h de crecimiento se separó la cutina mediante filtración. Esta cutina que estuvo en contacto con el micelio del hongo se liofilizó y se pulverizó usando nitrógeno líquido antes de analizarse mediante ATR-FTIR. Se utilizaron como control muestras de cutina intacta y el micelio del hongo, la primera para obtener las señales típicas de la estructura de la cutina y la segunda para observar si la presencia del hongo no interfiere en la observación de las señales esperadas. La interpretación señales correspondientes a todos los espectros se encuentra en el Anexo G. El análisis se realizó con base en lo reportado previamente por Heredia-Guerrero y colaboradores (2010) y Villena y colaboradores (2000). Este análisis permitió identificar las señales características de la cutina y los cambios luego de la acción de las distintas cepas del hongo.

En la figura 16 se observan los espectros de ATR-FTIR obtenidos normalizados con respecto a la línea base. En la figura además se indican las principales señales que presentaron cambio en su intensidad de luego del ataque de cada una de las cepas.

El espectro B representa a la cutina intacta; mientras que el espectro C representa la estructura de la cutina luego del ataque de la cepa control PW1. Como se observa en la figura, hay varios cambios en la intensidad de los picos luego de que la cepa control actúa sobre el biopolímero. El mayor cambio se presenta en la disminución de las señales cercanas a los 1728 y 1640 cm^{-1} que representan la vibración entre el Carbono y el Oxígeno del enlace éster y la vibración del estiramiento débil del enlace éster (C-O-C) aunque también se observa una disminución en las señales entre 1169 y 1104 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones asimétricas y simétricas del enlace éster (Heredia-Guerrero *et al.*, 2010). Además, también se observa un cambio en las señales correspondientes a los carbonos alifáticos que forman parte de la cutina y de otras ceras que aparecen a los 2854 y 1463 cm^{-1} . Por tanto, podemos concluir que la cepa control PW1 degrada el enlace éster dentro de la molécula de cutina, lo que corresponde a la acción de las cutinasas que codifica.

Por otro lado, los espectros D y E representan la estructura de cutina expuesta a la acción de las cepas mutantes AN Δ FarA y AN Δ FarB respectivamente. Como puede verse, la mutante para FarA no fue capaz de hidrolizar el enlace éster de la cutina ya que las señales características de este enlace, que vemos disminuidas cuando actúa la cepa control, no presentaron cambios en el espectro correspondiente a la acción de AN Δ FarA. En el caso del espectro de cutina obtenido luego de la acción de la mutante AN Δ FarB (E), observamos una disminución en algunas de las señales características del enlace éster presente en la cutina; por ejemplo, las señales a 1729 cm^{-1} del enlace Carbono – Oxígeno y el doblete de 1169 y 1104 cm^{-1} que representa las vibraciones simétricas y asimétricas de este enlace. Sin embargo, no vemos un cambio en las señales correspondientes a las vibraciones de Carbonos alifáticos en 1463 cm^{-1} ni en la vibración ácida fuerte del enlace éster característica en 1641 cm^{-1} . Por tanto, concluimos que la mutante AN Δ FarB sí es capaz de degradar cutina, aunque en menor grado que la cepa control.

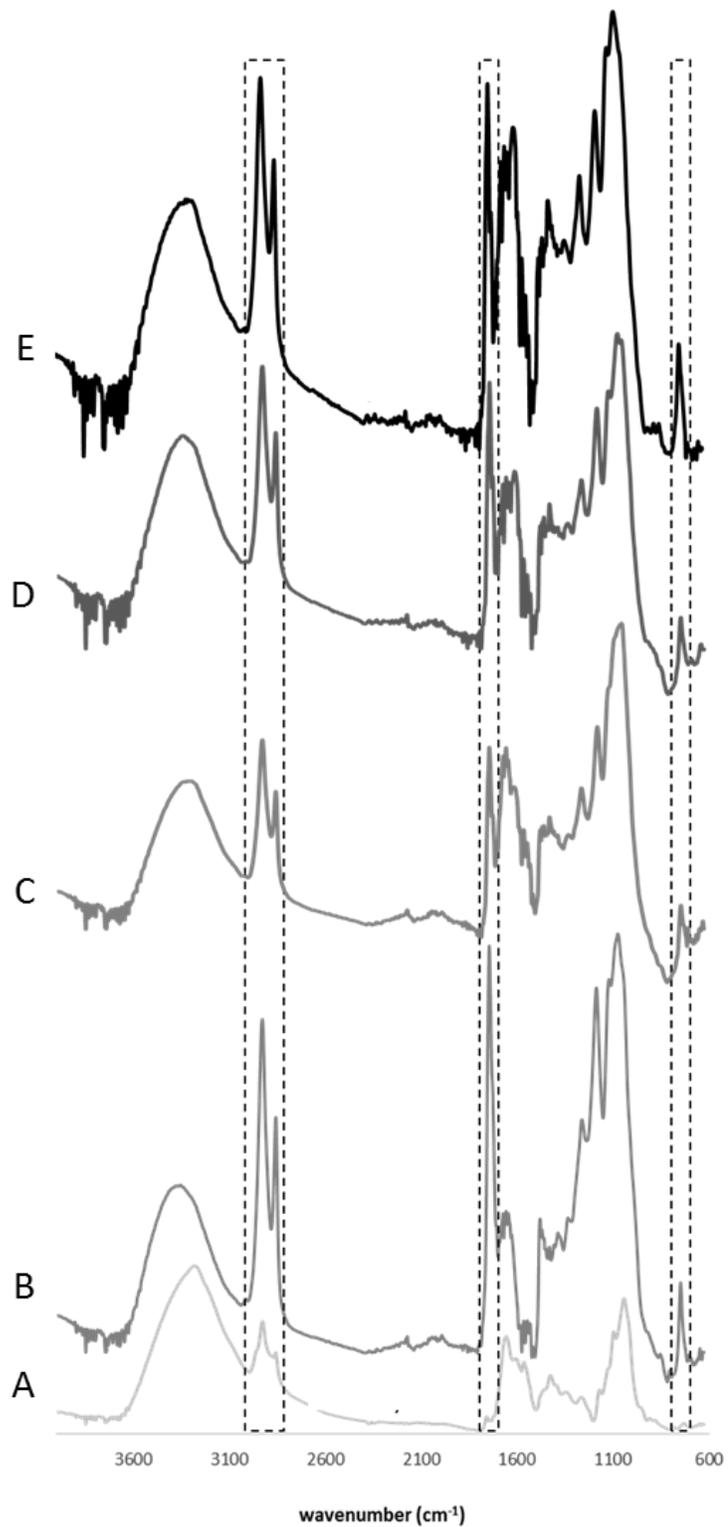


Figura 16. Espectro de ATR-FTIR de la cutina antes (B) y después del ataque de las diferentes cepas de *Aspergillus nidulans*. Cada espectro representa la acción de una cepa distinta: A. *nidulans* PW1 (C), A. *nidulans* ANΔFarA (D) y A. *nidulans* ANΔFarB (E). El espectro (A) son las señales de A. *nidulans* únicamente.

En la tabla 12 se indican las señales características de la cutina que se vieron modificadas después del ataque de las diferentes cepas ensayadas.

Tabla 12. Descripción de las señales de ATR-FTIR del espectro de cutina que presentaron cambios luego de la acción de las diferentes cepas de *A. nidulans* sobre el biopolímero.

No. pico	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Descripción	Asignación	Espectros en los que se observa un cambio
1	2854	va(CH ₂) estiramiento alifático	Cutina, ceras	C, E
2	1728	v(C=O) éster	Cutina	C, E
3	1641	v(C-O-C) ácido fuerte	Cutina	C
4	1463	δ(CH ₂) flexion alifática de tijera	Cutina, ceras	C
5	1169	va(C-O-C) éster	Cutina	C, E
6	1104	vs(C-O-C) éster	Cutina	C, E

Este resultado termina por confirmar la importancia de FarA en la regulación de las enzimas inducibles que degradan cutina en *A. nidulans*. Sin embargo, la acción de FarB también es importante para el sistema cutinolítico ya que regula la expresión de la cutinasa constitutiva y cuando no se expresa este factor transcripcional también se observa una disminución en la expresión global de las cutinasas reguladas por la fuente de carbono.

Los ensayos realizados con las mutantes ANΔFarA y ANΔFarB permitieron demostrar que estos dos factores transcripcionales son los encargados de regular la expresión de las cutinasas que responden a la fuente de carbono presente en el medio. De esta forma FarA regula la transcripción de las cutinasas inducibles *ancut1* y *ancut2* mientras que FarB regula la expresión de la cutinasa constitutiva *ancut3*, aunque también afecta la expresión de *ancut1* y *ancut2* que se ven afectadas si *ancut3* no libera monómeros de cutina que inducen su expresión. Por tanto, la eliminación de alguno de estos factores genera una disminución de los niveles de expresión de cutinasas, afecta la forma en que las cutinasas inducibles responden a la represión catabólica por glucosa y también afecta la capacidad de *A. nidulans* para degradar a la cutina.

Por otro lado, también se demostró que a pesar de que estos FT son homólogos a los reportados para *F. solani* el mecanismo de acción no es el mismo ya que en *A. nidulans* son dos las enzimas inducibles y sólo una la constitutiva mientras que en *F. solani* esta relación es inversa; además en *A. nidulans* parece haber una mayor coordinación entre ambos factores ya que en las mutantes, la eliminación de uno de los factores afecta a las tres

cutinasas sensibles a la regulación por fuente de carbono dependiendo del medio utilizado. En la figura 17, se resumen los cambios observados en la expresión de los genes de cutinasas en las cepas mutantes. Resalta que en condiciones de RCC, en la cepa AN Δ FarA disminuye la expresión de los tres genes, incluyendo *ancut3*, que no se regula directamente por este factor. Esto sugiere que la especificidad de los FT puede verse alterada debido a las vías de señalización activadas por CreA y a otros factores que intervienen (Fig. 17).

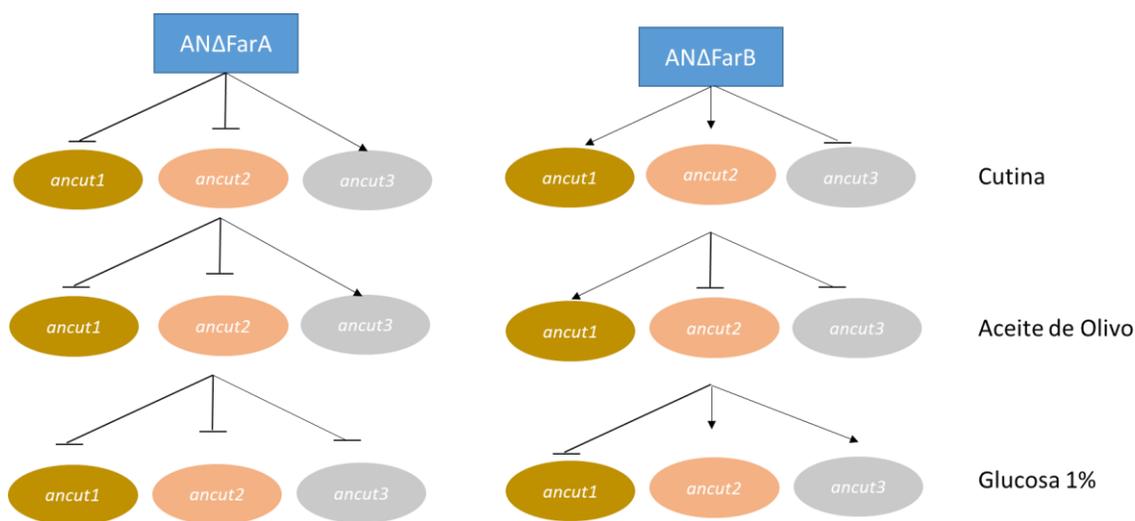


Figura 17. Esquema que representa los cambios en los niveles de expresión de los genes *ancut1*, *ancut2* y *ancut3* en las cepas mutantes AN Δ FarA y AN Δ FarB. Las flechas simbolizan un aumento en los niveles de expresión, mientras que las barras indican que la expresión disminuyó.

Hasta ahora, conocemos la forma en la que se regula la expresión de tres de las cuatro cutinasas que están codificadas en el genoma de *A. nidulans*. Sólo resta encontrar las condiciones que activan la expresión de *ancut4* y conocer el papel de cada enzima en la degradación del polímero de cutina; así como los productos que se generan de por esta degradación.

PARTE 3: IDENTIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE *ancut4*

Análisis bioinformático de las secuencias regulatorias de *ancut4*

Como se mencionó anteriormente, al realizar el análisis bioinformático de las regiones reguladoras de la cutinasa codificada por *ancut4*, no fue posible detectar sitios de unión putativos para los factores transcripcionales FarA y FarB que son los encargados de regular la expresión del metabolismo de lípidos y, como se demostró en este trabajo, además regulan la expresión de las cutinasas que se inducen por el tipo de fuente de carbono presente en el medio. La región reguladora del gen *ancut4* no presentó las secuencias palindrómicas consenso que se encontraron en las otras tres cutinasas y en muchas otras reportadas; por el contrario, el análisis bioinformático identificó sitios de unión para FT relacionados con la respuesta celular a estrés (Tabla 13 y Fig. 18).

Tabla 13. Identificación de sitios de unión de factores de transcripción en la secuencia de *ancut4*

Secuencia Motivo	TF	Gen	Nombre	Posición en la región 5'
GGAATTGG/GGCATTGG	napA/NF-Y1	AN10451	<i>ancut4</i>	-28, -124,-238, -370
TGCCTCA/ TGGCTCA	AP-1	AN10451	<i>ancut4</i>	-384, -826
CTCTGTT	CTF-1	AN10451	<i>ancut4</i>	-616, -652,-680,-767

De los FT detectados, NapA, presenta una estructura que consiste en un dominio tipo bZip seguido de un dominio conservado rico en cisteínas (CRD) en el extremo carboxilo terminal y es un factor relacionado estrechamente con las vías de transducción de señales que activan la respuesta a especies reactivas de oxígeno; se encarga además de regular la expresión del gen de la catalasa B uniéndose directamente a su región promotora (Asano *et al.*, 2007). Por otro lado, el FT AP-1 está relacionado con las vías de transducción de señales que regulan la respuesta a estrés oxidativo en hongos como *Monilinia frutícola*, un patógeno

del durazno, donde se encontró que la región reguladora del gen codificante para la cutinasa MfCUT1 presenta seis sitios putativos de unión a este factor. En ese mismo estudio, se observó que la expresión del gen MfCUT1 está regulada por estrés oxidativo y que los niveles de este gen aumentaron 1.7 veces luego de la exposición a H₂O₂ 0.25 mM (Lee *et al.*, 2010). Además, en los hongos necropatógenos *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* se observó que en presencia de especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂, aumentaban los síntomas de patogénesis en *Arabidopsis*.

GGCCACGCTGGTCTAGGTGGCTCTGCAAGGAATTGGTGGTTTCAGGTTCCGCTACCGGGGAGGCTGGTGCATCTGCGTCCGGG
 CTGCTGGTCTCGGAGGTCATGCCGGTCTTGAGGCTCCGCTGGCATTGGTGGCTCTGGATCAGCCACTGGCGAAGCTGACGC
 CTF-1 CTF-1 NF-Y1 NF-Y1 NF-Y1 NF-Y1
 CTCTGCTCGGGCAGTGCAGGTCTTGAGGCCACGCCGGTCTCGGTGGCTCTGCAGGTATCGGCGGTTTCAGCTGGCATTGGT
 GGCTCGGGCTCTGCCCCTGGCTCGGCGGCTCTGCTGCTGTGTTGGAGGTTCTGGATCTGCGCTCAAGCTCTCTGCTGACTTGGGGGC
 CTF-1 CTF-1 AP-1 AP-1 CTF-1
 ACGTGGCTTAGGCGGTTCCGCTGGTCTAGGTGGCTCTGCTGGCATTGGTGGCTCAAGGATCCGCTACCGGGAAGCTGGCGC
 AP-1
 GTCTGTTCCGGTCTGCTGGTCTTGGTGGCTCCGCTGGCGGCTCTGCTGGTCTCGGTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGCTGGCA
 TCGGAGGATCTGCTGGCGGCTCTGCTGGTCTTAGTGGCTCTGCTCCGGCTCCGCTGGTGGCTCTGCTTCTGGTCCGCTGAA
 GGTTCCGCTGGTCTTGGCGGCTCCGTTCCGCTGAAGGCTTACTTCTGGCTCTGCTTCTGGCTCTGCTTCTGGCTCTGCTTCT
 GGCTCTGCTTCTGGCTCTGCTTCTGGCTCTGCTTCTGGCTCTGCTTCTGGCTCTGGCTCTCTCGGCGGCTCC
 GGCTCTTTCGATGGCTTGTTCGCTCTGCCACCCCATCTGGTCGACTTCTTCTCTACCTCCTTCTCAACCGCCGGGATAACCA
 CTCCACTGGTGAAGCCCTGTGCGCAGGAGAGGACTGTGGCTGTGAAGAGCAAGAGGCTGTTCCACCGATGAAGCCCTT
 TGCTAACGGTGGCTCCAAATCTGAACTCATCCCACCGGCTCGGTGGCTTTGATCTTCCAGCCTCGGCAGCCTGTTCGGTTC
 CGGCGATGCTCTGCTCTGCTACCCCTCTGCTACTGCCACTGGAAGCACTACTGGATCTGGCTCTGCACTTGGTGGATTCAA
 CTGGGGTAGCCTATTCGGCTCGTCAAGTACTCCGACAGCTCCTCTTCTCTGCTTCTGTCGAGCAGCGGCTTGGTTCTTTCGC

Figura 18 Análisis de sitios de unión a factores regulatorios en la secuencia río arriba de *ancut4*. Se marcan en cajas de colores los sitios de unión de posibles FT. En azul sitios de unión para el factor CTF-1. En naranja sitios de unión para el factor NF-Y1 o NapA. En morado sitios de unión para el factor AP-1. El cuadro en rojo marca el sitio de inicio de la transcripción. Analizado con la herramienta PROMO v8.3 y la base de datos TRANSFAC.

El hecho de que la cutinasa AN CUT4 tuviera en su región reguladora sitios de reconocimiento para FT relacionados con condiciones de estrés oxidativo (EO) es una explicación de por qué hasta entonces no se había logrado detectar la expresión de esta cuarta cutinasa en ninguno de los medios en los que se variaban las fuentes de carbono, y a su vez indicó que la función de esta cutinasa era distinta a las otras tres.

Para comprobar esta hipótesis se decidió formular un medio en el que se indujeran condiciones de EO para probar si bajo estas condiciones era posible detectar el transcrito

de la *ancut4* y utilizar una cepa mutante en la que el factor NapA estuviera deletado para ver si se afectaba la expresión de la enzima.

Optimización del Medio de Inducción de Estrés Oxidativo (MIEO)

Para encontrar las condiciones óptimas de inducción de EO, se ensayaron distintos agentes causantes oxidantes reportados en trabajos anteriores como causantes de estrés (Kroll, Pähzt y Kniemeyer, 2013). Se utilizaron distintas concentraciones de cada agente y se evaluó cualitativamente la capacidad del hongo para crecer bajo estas condiciones. Los cultivos se crecieron 24 h antes de añadir el agente oxidante.

En la tabla 14 podemos observar que el Paraquat® y el NaNO₂, así como concentraciones de H₂O₂ mayores a 2 mM disminuyeron considerablemente la cantidad de biomasa obtenida, y por consiguiente el material disponible para la extracción de RNA. Por tanto, se seleccionó como agente causante de estrés oxidativo al H₂O₂ a una concentración de 0.5 mM.

Tabla 14. Efecto de los agentes causantes de EO sobre el crecimiento de *A. nidulans*

Agente	Biomasa	Agente	Biomasa	Agente	Biomasa
Control s/H ₂ O ₂	+++	Control s/NaNO ₂	+++	Control s/Paraq.	+++
H ₂ O ₂ 0.5 mM	++	NaNO ₂ 250 μM	+	Paraquat 10 μM	+
H ₂ O ₂ 2 mM	++	NaNO ₂ 500 μM	+		
H ₂ O ₂ 3 mM	+				
H ₂ O ₂ 4 mM	+				

Una vez seleccionado el agente, se cultivó al hongo en el medio optimizado con cutina durante 24 h para generar biomasa. Posteriormente se adicionó el agente y se dejó en contacto durante 6 h luego de las cuales se filtró el micelio y se realizó la extracción de RNA. Los rendimientos de RNA obtenido fueron muy bajos por lo que se decidió realizar una cinética de exposición al agente para encontrar el tiempo adecuado en el que el RNA se encuentra en cantidad y calidad amplificable. Los resultados se observan en el gráfico 8 y en la tabla 15.

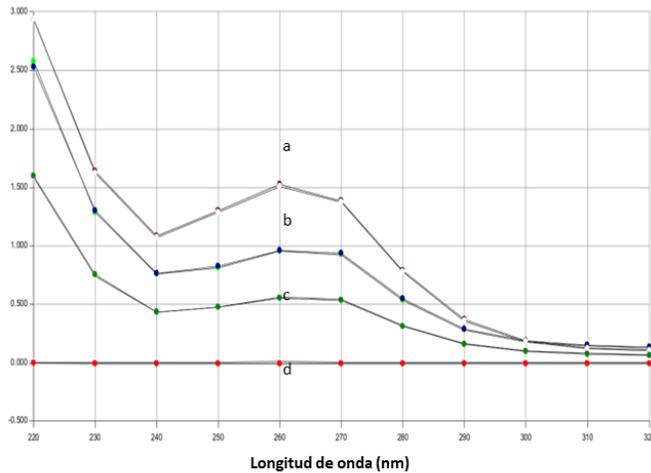


Tabla 15. Concentración en ng/μL de RNA total extraído en condiciones de EO.

Tiempo inducción (min)	RNA ng/μL
*Control (a)	2045.280
30 (b)	1477.746
60 (c)	869.630
360 (d)	296.159

Gráfico 8. Cinética de concentración de RNA a distintos tiempos de contacto con el agente de EO. Las letras corresponden con los tiempos de exposición mostrados en la tabla 15.

Los resultados de esta cinética mostraron que un tiempo de inducción de 30 minutos permitió obtener RNA de buena calidad, por lo que se decidió utilizar este tiempo para las reacciones de qRT-PCR para identificar el transcrito de *ancut4*. Los resultados de la medición de los niveles de expresión de *ancut4* se muestran en el gráfico 9.

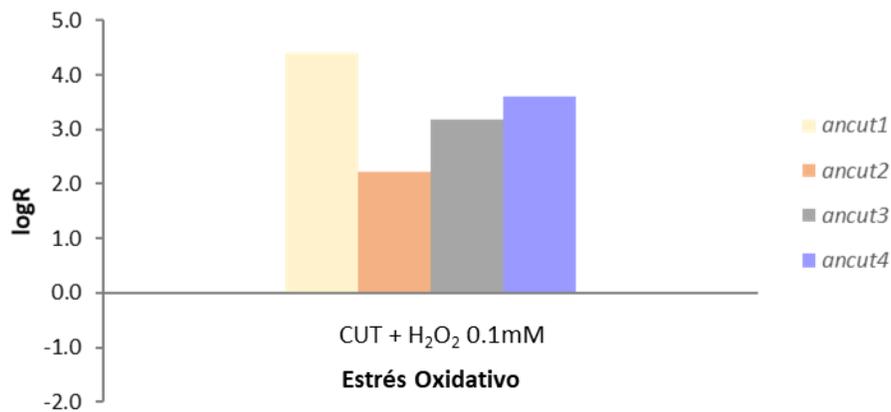


Gráfico 9. Niveles de expresión relativos de los genes *ancut1*, *ancut2*, *ancut3* y *ancut4* cuantificados a partir de la obtención de cDNA de micelio crecido en el medio MIEO.

Cuantificación de los niveles de expresión de *ancut4* en condiciones de estrés oxidativo.

En el gráfico 9 se observa que fue posible medir cuantitativamente los niveles de expresión del transcrito de *ancut4*; con lo que se demostró que esta cutinasa se regula positivamente en presencia de condiciones de estrés oxidativo, específicamente en presencia de H₂O₂. Cabe señalar que la expresión de las otras tres cutinasas también fue detectada bajo estas condiciones, debido a que el medio optimizado MIEO contiene cutina que es el inductor de *ancut1* y *ancut2* y que la expresión de *ancut3* se mantiene constante comparada con las otras condiciones probadas.

Para comprobar que la expresión de *ancut4* en condiciones de EO está regulada por el factor transcripcional NapA, se utilizó la cepa mutante ANΔNapA y luego de recibir el mismo tratamiento que la cepa control, se cuantificaron los niveles de expresión de las cuatro cutinasas. Como se observa en el gráfico 10, al no estar presente el FT NapA, la expresión de *ancut4* disminuyó drásticamente mientras que la expresión de las tres cutinasas restantes no se vió afectada.

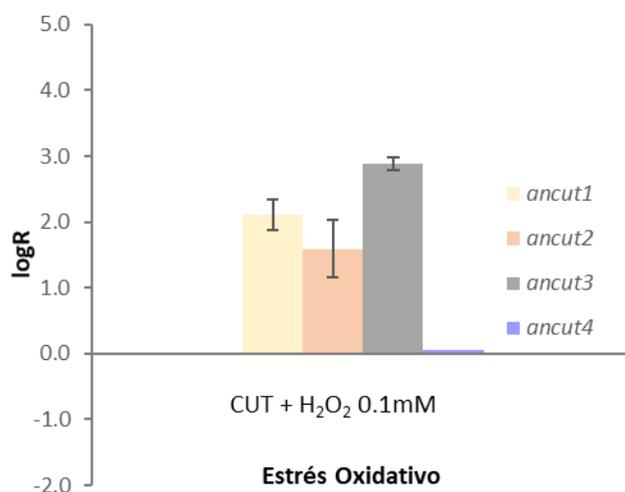


Gráfico 10. Niveles de expresión relativos de los genes *ancut1*, *ancut2*, *ancut3* y *ancut4* para la mutante ANΔNapA, cuantificados a partir de la obtención de cDNA de micelio crecido en el medio MIEO.

En estudios recientes sobre el papel de NapA en la respuesta a estrés oxidativo se demostró, mediante microarreglos, que NapA regula positivamente un número importante de hidrolasas clasificadas como CWDE entre las que se reportan varias xilanasas, pectinasas y la cutinasa, entonces putativa AN10451 (Mendoza-Martinez *et al.*, 2017). Esta información y los resultados del presente trabajo terminan por confirmar el efecto regulatorio de NapA sobre la cutinasa ANCUT4.

Identificación de la proteína ANCUT4 en condiciones de estrés oxidativo

Hasta ahora se demostró que la activación de la transcripción de *ancut4* requiere condiciones de estrés oxidativo y que por tanto su función debe ser distinta a las de las otras cutinasas, actuando probablemente en situaciones en las que el hongo busca promover la invasión en respuesta a la producción de ERO por la planta. Sin embargo, para poder probar esta hipótesis primero es necesario identificar el producto de este gen y observar si tiene actividad de tipo esterasa; ya que hasta ahora la ANCUT4 sigue reportada como cutinasa putativa.

Para identificar a la proteína, el sobrenadante concentrado de los mismos cultivos se cargó en geles SDS-PAGE y en zimogramas y fue posible detectar una banda menor a 20 kDa con actividad de tipo carboxilesterasa (Fig. 19). Esta banda fue cortada e identificada mediante LC/MS-MS. Los resultados de la identificación arrojaron varios péptidos que corresponden con los de la proteína ANCUT4 (Tabla 16) con lo que comprobamos que la expresión del transcrito del gen *ancut4* en condiciones de estrés da como resultado una proteína funcional con actividad hidrolítica que no había sido reportada con anterioridad.

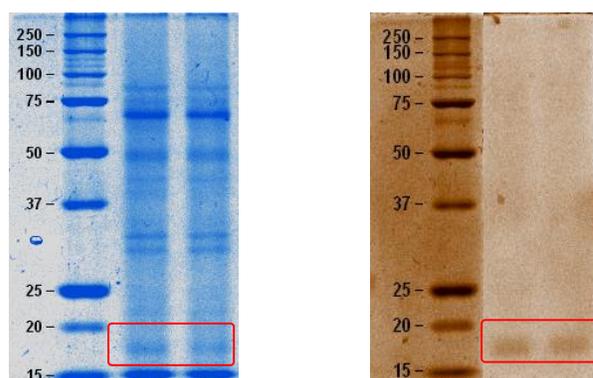


Figura 19. Geles SDS-PAGE y zimograma al 14% de los SN concentrados obtenidos en condiciones de estrés. Modificado de Bastida, 2018.

Tabla 16. Péptidos identificados en la banda con actividad CEH detectada en condiciones de estrés oxidante.

Peptidos identificados	Números de acceso de las proteínas	% Cobertura	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> LSSGQVVGAVTFGDPEK GTTEIGNMGTVVGPK SQKPDNIDQFK 	CBF83913 (ANCUT4)	19	Este trabajo y Bastida, 2018.

El bajo porcentaje de cobertura se debe a que en la misma banda que se identificó se encontraron péptidos que corresponden a la ANCUT1; por un fenómeno de comigración que se debe a que ambas proteínas tienen pesos moleculares muy similares. Para lograr obtener cada cutinasa por separado, Bastida realizó geles de electroforesis desnaturizante en dos dimensiones, para separar a las proteínas en función de su punto isoeléctrico. Para detectar aquellas proteínas que se expresan en condiciones de estrés oxidativo, se comparó el MEIO contra la condición control sin inducción. La tabla 17 presenta agrupadas según su función a las proteínas que identificaron en el MEIO y no en la condición control, y cuya función está relacionada con la respuesta del hongo frente al estrés oxidativo. La información de cada uno de los péptidos fue reportada por Bastida (2018).

Tabla 17 Proteínas identificadas en el sobrenadante de *A. nidulans* mediante 2D-SDS-PAGE en condiciones de EO.

Especie	Función/Proteína identificada	Gen/ No. Acceso	No. spot detectado	No. péptidos identificados
<i>Aspergillus nidulans</i>	Factores de transcripción de EO			
	hogA ortólogo, AtfA	AN1017	2	1
	Ytp1	AN3714	1-3	1
	Factor hipotético de respuesta a estrés oxidativo	AN1390	1	1
	REDOX			
	Catalasa B	XP_682608.1	1-9	19
	Oxidorreductasa	AN7193	1-5	5
		AN5563	2-4 y 7	7
Peroxirredoxina	XP_681961.1	1	1	
SOD	XP_657845.1	1-5	11	

	Tiorredoxina	XP_657774.1	1-3	3	
		XP_681899.1	2	1	
	Tiorredoxina reductasa	XP_661185.1	2 y 3	3	
		XP_681487.1	3 y 5	2	
	Hidrolíticas/Invasión				
	ANCUT1	AN5309	1, 5 y 8	14	
ANCUT2	AN5309, AN7541	1, 5	2		
ANCUT4	AN10346	1, 3	2		

Como se observa en la tabla 17, la inducción de condiciones de estrés oxidativo no sólo genera la activación de genes de enzimas relacionadas directamente con la contención de este estrés; también se activa la transcripción de proteínas que forman parte de los mecanismos de invasión que tienen los hongos. Los hongos fitopatógenos se enfrentan a condiciones de estrés oxidativo cuando al tratar de invadir el tejido vegetal, activan la respuesta inmune de las plantas, que generan en los cloroplastos y en los peroxisomas, especies reactivas de oxígeno como mecanismos de defensa. Para contender contra este tipo de estrés, los hongos fitopatógenos producen un gran número de enzimas antioxidantes. Las más importantes son las superóxido dismutasas (SOD), que dismutan el O_2^- en H_2O_2 ; las catalasas que descomponen el H_2O_2 en H_2O , las peroxidasas que descomponen el H_2O_2 a través de la oxidación de otros sustratos, las glutatión peroxidasas que utilizan el glutatión para descomponer el H_2O_2 en H_2O y las peroxirredoxinas que usan poder reductor para descomponer H_2O_2 en H_2O (Aguirre *et al.*, 2006).

La inducción de la *ancut4* por H_2O_2 es un ejemplo más de lo complejas e interconectadas que están las vías metabólicas en los hongos. Por sí sola, la respuesta al estrés oxidativo está regulada por mecanismos globales que involucran sistemas de transducción de señales como los sistemas de sistema de dos componentes (TCS), acoplado a una vía de MAP cinasas (MAPK) (Asano *et al.*, 2007).

Aunque todavía es necesario comprender con detalle cómo es que ANCUT4 responde sólo a condiciones de estrés y no simplemente a la presencia de cutina en el medio; la identificación de esta proteína como cutinasa dependiente de estrés oxidativo es un dato

novedoso que plantea que la presencia de múltiples genes codificantes para cutinasas en *A. nidulans* es producto de la adaptación a las distintas condiciones a las que este organismo se ha enfrentado y que cada uno de los genes ha ido adquiriendo funciones distintas que los diferencian.

La variabilidad en el número de cutinasas codificadas en los genomas de distintas especies de hongos microscópicos, ha generado diversos cuestionamientos sobre el papel biológico de estas enzimas. Partiendo de la premisa de que todas las cutinasas que existen actualmente provienen de una proteína común, se han identificado dos subfamilias antiguas que se diferenciaron, según se propone, debido a un evento de duplicación que ocurrió antes de la divergencia entre basidiomicetos y ascomicetos, ya que se han identificado cutinasas de las dos subfamilias en ambas fila (Skamnioti *et al.*, 2008).

La preservación de un alto grado de diversidad entre las secuencias de genes fúngicos de cutinasas puede aportar al hongo numerosas ventajas adaptativas o la capacidad para degradar cutícula de distintas fuentes, lo que ha permitido que los organismos productores colonicen diferentes nichos. Si además existen diferencias entre las regiones que regulan la expresión de estos genes, las ventajas adaptativas se multiplican (Skamnioti *et al.*, 2008; Adnan *et al.*, 2017). Pongamos como ejemplo el caso de los celulosomas, complejos multi enzimáticos que garantizan mayor eficiencia para hidrolizar sustratos celulósicos y hemicelulósicos de la pared celular (Bayer *et al.*, 2004).

En el genoma de *Aspergillus nidulans* habían sido reportados 4 genes que codifican para cutinasas: *ancut1*, *ancut2*, *ancut3* y *ancut4* (Galagan *et al.*, 2006). Hasta ahora no se sabía si estos genes tenían funciones redundantes o si cada uno cumplía una función específica. Dentro del grupo de trabajo se reportó previamente la actividad de dos de las proteínas expresadas por estos genes: AN CUT1 y AN CUT2, que se purificaron y caracterizaron confirmando que la principal diferencia entre ambas era su perfil hidrolítico (Castro-Ochoa *et al.*, 2012; Bermúdez *et al.*, 2017). En este trabajo se estudió la regulación transcripcional de los cuatro genes y se buscaron los factores transcripcionales encargados de esta regulación para poder proponer un modelo que explique la función de cada una de las

cutinasas. La información recabada contribuye a la identificación de nuevas cutinasas con potencial de aplicación en procesos biotecnológicos.

El análisis de las regiones codificantes demostró que los cuatro genes comparten el motivo cut-1 (GYSQG) en donde está contenida la Serina del sitio activo y el motivo cut-2 que contiene al aspartato y a la histidina que completan la triada catalítica (Ettinger *et al.*, 1987). Del análisis del motivo cut-1, se concluye que las cuatro cutinasas pertenecen a la subfamilia 2 propuesta por Skamnioti y colaboradores (2008). Sin embargo, el análisis de las secuencias de las cuatro cutinasas realizado por Castro y colaboradores (Fig. 7) arrojó que la secuencia de la ANCUT4 únicamente comparte de un 24 a un 32 % de similitud con las otras tres (Castro-Ochoa *et al.*, 2012). Esto concuerda con el árbol filogenético propuesto por Skamnioti en donde se observa que la ANCUT4 se separa en un clado distinto al de las otras tres (Skamnioti *et al.*, 2008). Por otro lado, la falta de consenso en la posición de los intrones sugiere que estas cuatro cutinasas no son productos redundantes que se hayan duplicado recientemente a partir de un mismo gen. Por el contrario, el grado de similitud entre ellas sugiere una diferenciación evolutiva antigua, es decir, que, a lo largo del tiempo, la secuencia ancestral común sufrió modificaciones que permitieron una subfuncionalización de los distintos genes que brinda a *A. nidulans* una ventaja adaptativa. Esto es consistente con lo reportado en otros hongos como *M. grisea* (Skamnioti *et al.*, 2008). Por otro lado, el análisis de las regiones regulatorias reveló importantes diferencias entre cada uno de los genes, por ejemplo, la presencia de sitios de unión para diferentes factores de transcripción, lo que conlleva a variaciones en las condiciones de expresión de cada cutinasa. Esta flexibilidad reguladora permitiría al hongo responder mejor a los cambios ambientales.

Tres de las cuatro cutinasas producidas por *A. nidulans* requieren cutina para su transcripción, pero los niveles de expresión de cada una de ellas fueron muy diferentes: *ancut1* mostró los niveles más altos de transcripción en presencia de cutina, alrededor de 10,000 respecto al medio control; *ancut2* únicamente eleva sus niveles unas 10 veces en presencia de cutina y *ancut4* necesita además de la cutina, la presencia de especies reactivas de oxígeno para elevar sus niveles unas 100 veces. Esta diferencia en su comportamiento se explica parcialmente por las diferencias en las regiones reguladoras, ya que *ancut1* y *ancut2*

se regulan por el FT FarA mientras que *ancut4* por NapA (Fig. 18). Por otro lado, *ancut3*, mantiene una expresión constitutiva y se regula por el FT FarB en medios con cutina y con fuentes de carbono de origen lipídico, ya que en la cepa mutante ANΔFarB no hubo expresión del gen de esta cutinasa. Las diferencias de expresión en presencia de cutina pueden estar relacionadas con el papel que tiene cada cutinasa en la hidrólisis de cutina durante el proceso de invasión.

Para corroborar esta hipótesis, se llevó a cabo la identificación de los productos de hidrólisis de cutina de cada una de las cutinasas mediante UHPLC-MS-MS utilizando la metodología reportada por Bermúdez-García (2019). Los resultados obtenidos en la tabla 18 confirmaron las diferencias entre las cuatro cutinasas. ANCUT1 y ANCUT3 generaron productos de degradación similares a los reportados previamente como los principales constituyentes de la cutina (Velasco *et al.*, 2017). Sin embargo, la generación del ácido 9,10-dihidroxihexadecanoico por ANCUT1 sugiere que esta enzima es capaz de hidrolizar los enlaces de entrecruzamiento que se forman entre ésteres de alcoholes secundarios, por lo que podría considerarse una endocutinasa. Esto explicaría porqué no se había detectado la actividad cutinolítica de ANCUT1 en ensayos de CCF, puesto que ANCUT1 no genera ácidos grasos libres al no cortar en los extremos del polímero.

Tabla 18. Compuestos de degradación de cutina generados por cada una de las cutinasas de *A. nidulans*.

Enzima	Compuestos de degradación	Fórmula	PM _{detec}	error*
ANCUT1	Ácido floionólico	C18 H36 O5	332.2569	1.9700
	Ácido 7-ceto palmítico	C16 H30 O3	270.2198	1.1000
	Ácido 9,10-dihidroxihexadecanoico	C16 H32 O4	288.231	3.380
	Ácido 10-hidroxi-16-oxo-hexadecanoico	C16 H30 O4	286.2138	2.1600
	Ácido 9-hidroxi-10E-octadecen-12-inoico	C18 H30 O3	294.2199	1.2300
ANCUT2	Ácido floionólico	C18 H36 O5	332.2565	0.5400
	Ácido 10-hidroxi-16-oxo-hexadecanoico	C16 H30 O4	286.2149	1.8900
	Ácido 9-hidroxi-10E-octadecen-12-inoico	C18 H30 O3	294.2194	0.2700
	Ácido 9-hidroxi-10E-octadecen-12-inoico	C18 H30 O3	294.22	1.72
ANCUT3	Ácido floionólico	C18 H36 O5	332.256	0.900
	Ácido 7-ceto palmítico	C16 H30 O3	270.2181	4.9900
	Ácido 10-hidroxi-16-oxo-hexadecanoico	C16 H30 O4	286.2142	0.5600
	Ácido 9-hidroxi-10E-octadecen-12-inoico	C18 H30 O3	294.2188	2.5200
	Ácido 9-hidroxi-10E-octadecen-12-inoico	C18 H30 O3	294.2194	0.2500
ANCUT4	Ácido floionólico	C18 H36 O5	332.2554	2.5100
	Ácido 9-hidroxi-10E-octadecen-12-inoico	C18 H30 O3	294.2195	0.0700

*error: Se define como el valor absoluto de la desviación entre la masa calculada y la masa teórica del pico seleccionado en [ppm].

Los productos obtenidos por ANCUT2 y ANCUT4 fueron principalmente ácidos grasos omega de C18, abundantes entre los constituyentes de la cutina; aunque el rendimiento obtenido por ANCUT4 fue bastante bajo comparado con las otras enzimas, ya que fue la enzima que presentó el menor número de iones de distinta relación masa/ carga (m/z) por unidad de actividad enzimática. Sin embargo, es necesario realizar una cuantificación de los productos de hidrólisis para poder confirmar esta observación que podría deberse a que la función de ANCUT4 no es propiamente hidrolítica si no que es parte de los mecanismos de defensa que tiene el hongo durante la invasión del tejido vegetal.

La actividad hidrolítica de ANCUT2, ANCUT3 y ANCUT4 libera ácidos grasos similares a los que se encuentran en los extremos de las cadenas de cutina y que están involucrados en la formación de enlaces éster primarios, por lo que estas cutinasas actuarían como exocutinasas. El hecho de que ANCUT1 sea la única enzima capaz de hidrolizar enlaces de ésteres secundarios, que dan mayor rigidez a la molécula de cutina quizá sea la razón de que esta cutinasa tenga mayores niveles de expresión en presencia de su sustrato principal como se observó en el gráfico 2. Además, *ancut1* eleva su expresión cuando están presentes los monómeros de cutina (ácido 16 hidroxihexadecanoico o propil ricinoleato) y en presencia de triglicéridos, su expresión va en aumento conforme aumenta el largo de cadena de estos (gráfico 3).

Por otro lado, el comportamiento general, en presencia de fuentes de carbono no lipídicas es similar al mecanismo de RCC antes reportado para celulasas producidas por hongos filamentosos (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015). Los resultados de este trabajo evidencian que tanto la glucosa como el almidón reprimen fuertemente la expresión de *ancut1* y *ancut2*, mientras que la pectina tiene un mayor efecto represor sobre *ancut2*. Estas fuentes de carbono no lipídicas no tienen efecto alguno en la expresión de *ancut3* (Bermudez-García *et al.*, 2019).

El análisis global, tanto de las condiciones de inducción de cada cutinasa como de su perfil hidrolítico sugieren que ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 permiten que *A. nidulans* crezca en material vegetal en descomposición preferentemente como un hongo saprófito; mientras que ANCUT4 le será de mayor utilidad durante la colonización de plantas vivas, cuando es

más seguro que existan condiciones de estrés como parte de los mecanismos de defensa de las plantas. La producción de ERO en el sitio de infección, es parte de la respuesta inmune de las plantas, disparada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados patógenos o PAMPs por sus siglas en inglés; uno de los dos principales mecanismos de resistencia que tienen las plantas contra el ataque de patógenos (Heller y Tudzynski, 2011). Estas especies juegan un papel muy importante en la interacción entre hongos y plantas, sirviendo principalmente como moléculas señalizadoras, que activan la maquinaria fúngica que involucra la diferenciación celular, el desarrollo de estructuras de infección y la secreción de numerosas enzimas y factores que regulan estos mecanismos (Kawasaki *et al.*, 2002; Aguirre *et al.*, 2005).

Aunque la expresión de prácticamente todos los genes pudo ser detectada en distintos medios de cultivo, los zimogramas de cada medio solamente revelaron una banda de actividad atribuible en la mayoría de los casos a una sola proteína, según se confirmó la identificación por LC/MS-MS. Estos resultados sugieren la existencia de otros mecanismos de regulación post-transcripcional que explicarían, por ejemplo, por qué ANCUT3 no se detectó en todos los zimogramas a pesar de que su expresión es constitutiva. Probablemente esta cutinasa actúe solamente como la que enciende la expresión de las cutinasas inducibles al liberar pequeñas cantidades de monómeros de cutina y su actividad sólo pueda ser detectada antes de la penetración en el tejido vegetal, como sucede en el oomiceto *Phytophthora capsici*, quien expresa una cutinasa constitutiva únicamente en las etapas previas al contacto con la superficie de la planta (Muñoz and Bailey, 1998).

Algunas de las modificaciones post-transcripcionales podrían llevar a la inactivación de la proteína, como la fosforilación de ciertos residuos o la ubiquitinación como se ha observado en *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira y Sauer, 2011).

Es necesario llevar a cabo más experimentos para poder responder estas interrogantes sobre ANCUT3, pero con la información general de la que se dispone hasta este momento, podría proponerse un modelo para explicar cómo se constituye el sistema cutinolítico en *A. nidulans* (Figura 20).

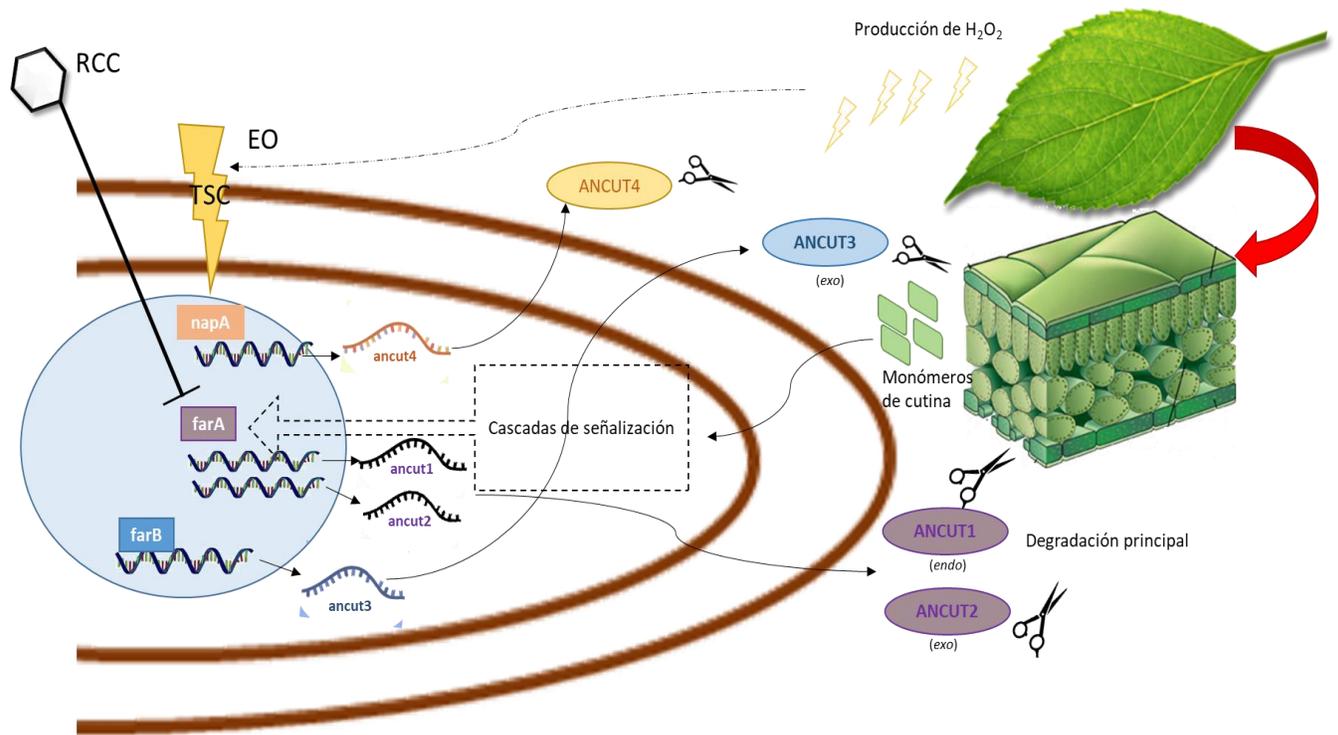


Figura 20. Modelo propuesto para la regulación del sistema cutinolítico en *Aspergillus nidulans*.

Este modelo propone que de las cuatro cutinasas presentes en *A. nidulans*, tres de ellas actúan de forma conjunta cuando las esporas del hongo sienten la presencia de cutina u otras fuentes de carbono de origen lipídico, siendo ANCUR1 y ANCUR2 de expresión inducible mientras que ANCUR3 tiene una expresión constitutiva y se regula por el FT FarB. La cuarta cutinasa actúa en condiciones de estrés oxidativo, cuando la planta activa mecanismos de defensa para evitar la colonización. Cuando el hongo está en presencia de cutina, la actividad constitutiva de ANCUR3 permitiría hidrolizar pequeñas cantidades del polímero liberando monómeros que probablemente enciendan cascadas de señalización celular en *A. nidulans* para iniciar la transcripción de FarA. Una vez que esta proteína está activa, reconocerá el sitio de unión río arriba de los genes *ancut1* y *ancut2* y promoverá su transcripción. Una vez sintetizadas, las proteínas ANCUR1 y ANCUR2 son secretadas y comenzarán a degradar, ANCUR1 en el interior de la molécula y ANCUR2 en los extremos. De esta forma el hongo será capaz de penetrar la cutícula y avanzar hacia el interior de la

pared celular para colonizar el tejido vegetal. Cuando en el medio están presentes otras fuentes alternativas de carbono como la glucosa, el almidón o la pectina, se reprimirá la expresión de ANCUT1 y ANCUT2 debido probablemente a que una proteína represora se unirá a la región reguladora de estos genes impidiendo la unión de FarA. ANCUT3 mantendrá su expresión basal pero dada su baja actividad, el hongo no será capaz de degradar cantidades considerables de cutina.

Por último, con los resultados obtenidos es posible proponer que cuando la planta genera los ERO, el sistema de dos componentes en *A. nidulans* se encenderá y se activarán las cascadas MAPKs de respuesta al estrés oxidativo, así como las proteínas que actúan como elementos de respuesta (RR); una de ellas, SrrA activará al FT NapA (Hagiwara *et al.*, 2016) quien además de promover la expresión de genes que contienden contra el estrés también activará la transcripción de ANCUT4.

El modelo regulador del sistema cutinolítico del hongo *A. nidulans* propuesto en este trabajo presenta similitudes con el reportado previamente en *F. solani* (Li y Kolattukudy, 2002); sin embargo, resulta ser mucho más complejo quizá debido a que en *A. nidulans* existen cuatro genes codificantes para cutinasas mientras que en *F. solani* solamente dos. El hecho de involucrar a una cuarta cutinasa (ANCUT4) que responde en situaciones de estrés oxidativo nos habla de que los mecanismos de adaptación de *A. nidulans* son amplios y de que su carácter ubicuo le ha obligado a diversificar sus estrategias para colonizar materia vegetal. La generación de este modelo permite contribuir al conocimiento que existe sobre la expresión y regulación de enzimas involucradas en la colonización del tejido vegetal que están presentes en muchos otros hongos de importancia biotecnológica y fitosanitaria.

CONCLUSIONES

- El estudio de la regulación del sistema cutinolítico en *A. nidulans* mediante la implementación de reacciones multiplex de qRT-PCR permitió conocer las condiciones bajo las que se regula cada uno de los genes codificantes de cutinasas, así como identificar factores transcripcionales que participan en los mecanismos de regulación.
- *nidulans* produce dos cutinasas inducibles, ANCUT1 y ANCUT2, cuya expresión depende de la fuente de carbono presente en el medio y que se regulan por el factor transcripcional FarA, que también interviene en la regulación del metabolismo de lípidos de cadena media y larga. Además, produce una tercera cutinasa, ANCUT3 cuya expresión es constitutiva y se regula por FarB, proteína que participa en la utilización de lípidos de cadena corta. La expresión de la cuarta cutinasa, ANCUT4, no depende de FarA o FarB, ya que se expresa en condiciones de estrés oxidativo en presencia de cutina y H₂O₂.
- Se confirmó que las proteínas ANCUT3 y ANCUT4 son cutinasas verdaderas y no putativas como estaban reportadas, gracias a la detección de la actividad cutinolítica de los productos de los genes en estudio. Esto se logró al combinar herramientas de biología molecular con técnicas bioquímicas y analíticas.
- El modelo propuesto demuestra que las cuatro cutinasas son capaces de hidrolizar cutina, aunque su expresión es diferencial y depende tanto de las condiciones nutricionales como de la presencia de condiciones de estrés. ANCUT1 presenta una mayor actividad sobre cutina y es además una endo-cutinasa. Las otras tres generan productos de degradación típicos de las exo-cutinasas.

PERSPECTIVAS

- Para profundizar en el estudio de la regulación génica del sistema cutinolítico en *A. nidulans*, queda como perspectiva estudiar las posibles modificaciones post-transcripcionales que conllevan a la inactivación de las proteínas en distintas condiciones; específicamente para la AN CUT3.
- Es importante también, estudiar el efecto de la proteína CreA sobre la expresión de cutinasas, para dilucidar cuáles son las señales que desencadenan la represión en el sistema y así demostrar las partes del modelo que se mantienen como hipotéticas.
- También se propone dilucidar las cascadas de señalización que permiten que, tras la generación de monómeros de cutina, o bajo la existencia de condiciones de estrés oxidante, se activen las proteínas reguladoras.
- Otra perspectiva interesante sería generar mutantes *knock out* para cada uno de los genes de cutinasas y luego estudiar si en ausencia de una de estas proteínas se modifica la expresión de las otras cutinasas.
- En cuanto a los factores transcripcionales, se propone estudiar si FarA y FarB pueden reemplazar sus funciones cuando uno de los dos factores no se expresa. Otra perspectiva sería observar qué efecto tiene la eliminación de los dos factores que regulan el sistema en una misma mutante, es decir, la generación de una doble mutante.
- Sobre el papel de cada cutinasa en la degradación de cutina, se propone realizar un estudio más profundo que incluya la cuantificación de los productos hidrolizados y ensayos *in vivo*.

REFERENCIAS

- Adnan M, Islam W, Arif M, A Y, Wang Z y Lu G. 2017. Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *Int J Mol Sci* 19:48
- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D y Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13:111–18
- Aguirre J, Hansberg W y Navarro R. 2006. Fungal responses to reactive oxygen species. *Med Mycol* 44
- Aro N, Pakula T y Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 29(4):719-739
- Asano Y, Hagiwara D, Yamashino T y Mizuno T. 2007. Characterization of the bZip-Type Transcription Factor NapA with Reference to Oxidative Stress Response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1800-3
- Bakar FDA, Murad AMA, Hamid AA, Zamrod Z, Mahadi NM y Sullivan P. 2005. Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. *Asia-Pac J Mol Biol* 13(2):63-69
- Bastida C. 2018. Detección e Identificación de la cutinasa ANCUT4 de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM
- Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ y Somerville CR. 2006. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11417-22
- Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y y Lamed R. 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 58:521-54
- Berbee ML. 2001. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiol Mol Plant P* 54(4):165-187
- Bermúdez-García EP, Peña-Montes C, Castro-Rodríguez A, González-Canto A, Navarro-Ocaña A y Farrés A. 2017. ANCUT2, a thermo-alkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and its potential applications. *Appl Biochem Biotechnol* doi:10.1007/s12010-016-2378-z
- Bermudez-García EP, Peña-Montes C, Martins I, Pais J, Silva-Pereira C, Sánchez S Farrés A. 2019. Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 103. 10.1007/s00253-019-09712-3.
- Bordusa F. 2002. Proteases in organic synthesis. *Chem Rev* 102(12):4817-4867
- Boskou D, Blekas G y Tsimidou M. 1996. Olive Oil Composition. En J. Pokorny, ed. *Olive Oil Chemistry and Technology*. 1a ed. Illinois, D. Boskou. 41-47
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V y Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37(suppl1): D233-D238
- Carvalho C, Serralheiro MLM, Cabral JMS y Aires-Barros MLR. 1998. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electron J Biotechnol* 1(3):160-173
- Castro-Ochoa D, Peña-Montes C y Farrés A. 2010. Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 13:16-20.
- Castro-Ochoa D, Peña-Montes C, González-Canto A, Alva-Gasca A, Esquivel-Bautista R, Navarro-Ocaña A y Farrés A. 2012. ANCUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Appl Biochem Biotech* 166(5):1275-1290.

- Chen S, Su L, Chen J y Wu J. 2013. Cutinase: characteristics, preparation and application. *Biotech Adv* 31: 1754-1767.
- Chevallet M, Luche S y Rabilloud T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* 1(4):1852-8
- Costa-Silva J, Domingues D y Lopes FM. 2017. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE* 12(12): e0190152
- Cubero B y Scazzocchio C. 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 13:407-415
- Curtis H, Barnes NS, Schnek A y Massarini A. 2008. *Biología*. Editorial Médica Panamericana 7a ed., Buenos Aires, 861.
- Dickman M y Suresh P. 1986. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. *Physiol Molec Plant Pathol* 28(2):235-242
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P y Trent JM. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21(1S):10-4
- Egmond MR y de Vlieg J. 2000. *Fusarium solani* pisi cutinase. *Biochemie* 82:1015-1021
- Esqueda-Domínguez KL. 2012. Producción, Identificación y Caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM
- Ettinger WF, Thukral SK y Kolattukudy PE. 1987. Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. *Biochem* 26 (24): 7883–7892
- Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA y Ugalde U. 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* 18(12):569-76
- Fan CY y Köller W. 1998. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: differential and sequential expression of cutinolytic esterases by *Alternaria brassicicola*. *FEMS Microbiol Lett* 158:33.38
- Farrés A. Peña-Montes C, Hernández-Domínguez EE, Morales-García SL, Sánchez-Sánchez M y Solís-Báez I. UNAM. Cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans* para biodegradación de poliésteres. México. PCT/MX20 17/000056. Fecha de presentación internacional 26/05/2017
- Fett W, Wijey C, Moreau y Osman S. 1999. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Lett Appl Microbiol* 31(1):25-29
- Flipsen JA, Kramer RA, van Duijnhoven JP, van der Hijden HT, Egmond MR y Verheij HM. 1998. Cutinase binding and activity at the triolein-water interface monitored by oil drop tensiometry. *Chem Phys Lipids* 95(2):169-80
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA y Birren BW. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438:1105-15
- Garrido SM, Kitamoto N, Watanabe A, Shintani T y Gomi K. 2012. Functional analysis of FarA transcription factor in the regulation of the genes encoding lipolytic enzymes and

hydrophobic surface binding protein for the degradation of biodegradable plastics in *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng* 113(5):549-555

- Glass LN, Schmoll M, Cate JHD y Coradetti S. 2013. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annu Rev Microbiol* 67:477-498
- Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N y Montoya D. 2015. Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: classical cases and new models. *Rev Iberoam Micol* 32:1-12
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Furukawa K, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Yamashino T, y Mizuno T. 2007. The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1003–1014.
- Hagiwara D, Sakamoto K, Abe K y Gomi K. 2016. Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Biosci Biotechnol Biochem* 8(9): 1667-1680.
- Heller J y Tudzynski P. 2011. Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *Annu Rev Phytopathol* 49:369–90
- Heredia-Guerrero JA, Domínguez E, Luna M, Benítez JJ y Heredia A. 2010. Structural characterization of polyhydroxy fatty acid nanoparticles related to plant lipid biopolyesters. *Chem Phys Lipids* 163:329-333.
- Hiscock SJ, Dewey FM, Coleman JOD y Dickinson HG. 1994. Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* 193:377–384.
- Hynes MJ, Murray SL, Duncan A, Khew GS y Davis MA. 2006. Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 5(5):794-805.
- Käfer E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and chromosomal aberrations. *Adv Genet* 19:33-131.
- Kapat A, Zimand Y y Elad Y. 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 52(1):127-137
- Kawasaki L, Sanchez O, Shiozaki K y Aguirre J. 2002. SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 45:1153–63
- Kikot GE, Hours RA y Alconada TM. 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J Basic Microbiol* 49(3):231-41
- Kim YH, Ahn JY, Moon SH y Lee J. 2005. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, Malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase. *Chemosphere* 60(10):1349-55
- Kim YK, Wang Y, Liu ZM y Kolattukudy PE. 2002. Identification of a hard surface contact-induced gene in *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a sterol glycosyl transferase, a novel fungal virulence factor. *Plant J* 30(2):177-187
- Kobayashi T y Kato M. 2010. Transcriptional Regulation in *Aspergillus* en *Aspergillus*: Molecular Biology and Genomics. Ed: Machida M. y Gomi K. Caister Academic Press, U.K.
- Köller W y Kolattukudy PE. 1982. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases. *Biochem* 21(13):3083-90

- Kroll K, Pähz V y Kniemeyer O. 2013. Elucidating the fungal stress response by proteomics. *J Proteomics* 97:151-63
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laneve P y Giangrande A. 2014. Enhanced Northern Blot Detection of Small RNA Species in *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp* (90), e51814.
- Lazniewska J, Macioszek V y Kononowicz A. 2012. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. *Physiol Molec Plant Pathol* 78:24-30
- Lee MH, Chiu CM, Roubtsova T, Chou CM y Bostock RM. 2010. Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, MfCUT1, increases virulence of the brown rot pathogen *Monilinia fruticola* on *Prunus spp.* *Mol Plant Microbe Interact* 23(2):176-86.
- Leroch M, Kleber A, Silva E, Coenen T, Koppenhöfer D, Shmarvahu A, Valenuela PDT, y Hahn M. 2013. Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidia germination reveals upregulation of infection-related genes during the penetration stage. *Eukaryot Cell* 12(4):614-626
- Li TS y Kolattukudy PE. 1980. Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. *J Biol Chem* 272:12462-12467
- Li D y Kolattukudy PE. 1997. Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys₆Zn₂ binuclear cluster DNA-binding motif. *J. Biol Chem* 272:12462–12467
- Li D, Sirakova T, Rogers L, Ettinger WF y Kolattukudy PE. 2002. Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium solani* f. sp. pisi (*Nectria haematococca*). *J Biol Chem* 277(10):7905–7912
- Li D, Ashby AM y Johnstone K. 2003. Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. *Mol Plant Microbe Interact* 16(6):545-52.
- Lu SW, Kroken S, Lee BN, Robbertse B, Churchill AC, Yoder OC y Turgeon BG. 2002. A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10):5980-5
- Lu L, Rong W, Massart S y Zhang Z. 2018. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Cutinase Gene Family in *Rhizoctonia cerealis* and Functional Study of an Active Cutinase RcCUT1 in the Fungal–Wheat Interaction. *Front Microbiol.* 8:1813-
- Machida M y Gomi K (Eds.). 2010. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. *Biotechnol J.* 5:336-337
- Maeda H, Youhei Y, Keietsu A, Fumihiko H, Masayuki M, Ryoji I, Katsuya y Tasuku N. 2002. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(1):778–788
- Mandels M y Reese ET. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J Bacteriol* 79(6):816-26
- Martínez C, De Geus P, Lauwerevs M, Matthyssens G y Cambillau C. 2008. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* 356(6370):615-618
- Martínez-Rocha A, Roncero MI, López-Ramírez A, Mariné M, Guarro J, Martínez-Cadena G, Pietro A. 2008. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cell Microbiol* 10:1339-51

- Martins I, Garcia H, Varela A, Núñez O, Planchon S, Galceran MT y Silva-Pereira C. 2014. Investigating *Aspergillus nidulans* secretome during colonization of cork cell walls. *J Proteomics* 98:75–88
- Masaki K, Kamini R, Hiroko I y Iefuji H. 2005. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus sp.* strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Appl Environ Microbiol* 71(11):7548–7550
- Mathieu M y Felenbok B. 1994. The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator. *EMBO J* 13(7):4022-4027
- McQueen R y Schottel J. 1987. Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J Bacteriol* 169(5):1967-1971
- Mendoza-Martínez A, Lara-Rojas F, Sanchez O y Aguirre J. 2017. NapA Mediates a Redox Regulation of the Antioxidant Response, Carbon Utilization and Development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* 1
- Mogensen J, Nielsen HB, Hofmann G y Nielsen J. 2006. Transcription analysis using high-density microarrays. *Fungal Genet Biol* 43(8):593-603
- Muñoz CI y Bailey AM. 1998. A cutinase-encoding gene from *Phytophthora capsici* isolated by differential-display RT-PCR. *Curr Genet* 33(3):225-30
- Murphy CA, Cameron JA, Huang SJ y Vinopal RT. 1996. *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl Environ Microbiol* 62(2):456-60
- Nawani N, Khurana J y Kaur J. 2006. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus sp.*: purification and characterization. *Mol Cell Biochem* 290(1-2):17-22
- Oakley BR. 2013. *Aspergillus nidulans*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics* 2ed:212-215
- Oliveira A P y Sauer U. 2011. The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS Yeast Res* 12: 104-17
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa y Farrés A. 2008. Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(5):603-12
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
- Pollard M, Beisson F, Li Y y Ohlrogge JB. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13(5):236-46
- Purdy RE y Kolattukudy PE. 1975. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f. pisi. *Biochem* 14(13): 2832-40
- Pyrzak W, Miller KY y Miller BL. 2008. Mating type protein Mat1-2 from asexual *Aspergillus fumigatus* drives sexual reproduction in fertile *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 7(6):1029-40
- Ramírez MA y Lorenz MC. 2009. The transcription factor homolog CTF1 regulates β -oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8(10):1604-1614
- Rubio M, Cardoza E, Hermosa R, Gutiérrez S y Monte E. 2008. Cloning and characterization of the Thcut1 gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr Genet* 54(6):301-312
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T y Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78:141-73

- Sánchez S y Demain AL. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb Tech* 31(7):8895-906
- Schmelzer JM y Hartel RW. 2001. Interactions of Milk Fat and Milk Fat Fractions with Confectionery Fats. *J Dairy Sci* 84(2): 332-344
- Schmidt M y Bornscheuer UT. 2005. High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol Eng* 22(1-3):51-6
- Sebastian J, Chandra AK y Kolattukudy PE. 1987. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *J Bacteriol* 169(1):131-6
- Sebastian J y Kolattukudy P. 1988. Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllospher. *Arch Biochem Biophys* 263(1):77-85
- Segoviano-Reyes LM. 2012. Regulación de la producción de cutinasas en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM
- Seo HS, Um HJ, Min J, Rhee SK, Cho TJ, Kim YH y Lee J. 2007. *Pseudozyma jejuensis* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Res* 7(6):1035-45
- Shayk M y Kolattukudy PE. 1977. Production of a Novel Extracellular Cutinase by the Pollen and the Chemical Composition and Ultrastructure of the Stigma Cuticle of *Nasturtium* (*Tropaeolum majus*). *Plant Physiol* 60(6):907-15
- Skamnioti P y Gurr SJ. 2007. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell* 19(8):2674-89
- Skamnioti P, Furlong RF y Gurr SJ. 2008. Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. *New Phytol* 180: 711–721
- Srivastava A, Ohm R, Oxiles L, Brooks F, Lawrence C, Grigoriev I y Cho Y. 2011. A Zinc-Finger-Family Transcription Factor, AbVf19, Is Required for the Induction of a Gene Subset Important for Virulence in *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 25:443-52
- Stahl DJ y Schäfer W. 1992. Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *Plant Cell* 4(6):621-629
- Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL y Kubicek CP. 1999. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol Microbiol* 32(1):169-178
- Sung HH, Kao WY y Su YJ. 2003. Effects and Toxicity of Phthalate Esters to Hemocytes of Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquat toxicol* 64:25-37
- Sweigard JA, Chumley FG y Valent B. 1992. Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol Gen Genet* 232(2):183-90
- Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D y Orejas M. 2008. CreA mediates repression of the regulatory gene xlnR which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 45(6):984-993
- Tanabe K, Syoyo N y Keisuke K. 1988. Pathogenicity of cutinase and pectic enzymes-deficient mutants or *Alternaria alternata*. *Ann Phytopath Soc Japan* 54(2):552-555
- Trail F y Koller W. 1990. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiol Mol Plant P* 36(4):495-508

- Tudzynski B, Liu S y Kelly JM. 2000. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: Isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* creA genes. FEMS Microbiol Lett 184(1):9-15
 - van Kan JA, van't Klooster JW, Wagemakers CA, Dees DT y van der Vlugt-Bergmans CJ. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. Mol Plant Microbe Interact 10(1):30-38
 - Velasco B, Arrieta-Baez D, Sotelo P, Méndez-Méndez J Martínez B y Gómez-Patiño M. 2017. Comparative studies of cutins from lime (*Citrus aurantifolia*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) after TFA hydrolysis. Phytochem 144:78-86
 - Villena JF, Domínguez E y Heredia A. 2000. Monitoring biopolymers present in plant cuticles by FI-IR. J Plant Physiol 156: 419–422
 - Voigt CA, Schäfer W y Salomon S. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. Plant J 42(3):364–375
 - Walton TJ y Kolattukudy PE. 1972. Determination of the structures of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. Biochem 11(10):1885-96
 - Wang Z, Gerstein M y Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet 10(1):57-6
 - Whitchurch AK. 2002. Gene expression microarrays. IEEE Potentials 21(1):30-34
- Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D, Bencina M, Braus G, Coutinho P, von Döhren H, Doonan J, Driessen AJ, Durek P, Espeso E, Fekete E, Flipphi M, Estrada CG, Geysens S, Goldman G, de Groot PW, Hansen K, Harris SD, Heinekamp T, Helmstaedt K, Henrissat B, Hofmann G, Homan T, Horio T, Horiuchi H, James S, Jones M, Karaffa L, Karányi Z, Kato M, Keller N, Kelly DE, Kiel JA, Kim JM, van der Klei IJ, Klis FM, Kovalchuk A, Krasevec N, Kubicek CP, Liu B, Maccabe A, Meyer V, Mirabito P, Miskei M, Mos M, Mullins J, Nelson DR, Nielsen J, Oakley BR, Osmani SA, Pakula T, Paszewski A, Paulsen I, Pilsyk S, Pócsi I, Punt PJ, Ram AF, Ren Q, Robellet X, Robson G, Seiboth B, van Solingen P, Specht T, Sun J, Taheri-Talesh N, Takeshita N, Ussery D, vanKuyk PA, Visser H, van de Vondervoort PJ, de Vries RP, Walton J, Xiang X, Xiong Y, Zeng AP, Brandt BW, Cornell MJ, van den Hondel CA, Visser J, Oliver SG y Turner G. 2008. The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. Fungal Genet Biol 46(S1):S2-S13

ANEXOS

ANEXO A. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS qRT-PCR MULTIPLEX PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CUTINASAS EN *Aspergillus nidulans*.

El término *transcriptoma* se utiliza, desde hace algunos años, para nombrar al conjunto de RNAs mensajeros (mRNAs) en una célula y la cantidad que de ellos se está expresando bajo una determinada condición fisiológica o ambiental. En contraste con el genoma, que se caracteriza por su estabilidad, el transcriptoma cambia constantemente, dependiendo de las condiciones existentes. Entender el transcriptoma de un organismo nos permite interpretar los elementos funcionales del genoma y relacionarlos con procesos globales del metabolismo y su reacción frente a los cambios ambientales. Esto involucra entender la estructura transcripcional de los genes, los sitios donde comienzan y terminan, las secuencias regulatorias, las regiones no codificantes, los sitios de *splicing* u otras modificaciones postranscripcionales así como cuantificar los cambios en los niveles de expresión de cada transcrito bajo distintas condiciones (Wang *et al.*, 2009).

La expresión génica es el proceso por el cual la información genética se convierte en un producto funcional. Este proceso utiliza como intermediario al mRNA que se transcribe a partir del DNA y se utiliza como templado para generar el producto final o proteína. Los análisis de expresión génica permiten detectar las condiciones bajo las que un gen se induce o se reprime. Cuando se quiere conocer cuándo, dónde y en qué condiciones se expresan los genes, así como qué dispara o previene esta expresión. Existen varias técnicas que permiten responder estas preguntas y pueden dividirse tres grandes rubros: las técnicas dependientes de hibridación, las dependientes de PCR y las dependientes de secuenciación.

Los métodos basados en hibridación generalmente utilizan una secuencia de DNA marcada que se une al transcrito de interés. Entre los métodos más utilizados están el Northern Blot y los Microarreglos.

Medición de la expresión génica por hibridación de sondas.

Los niveles de mRNA pueden medirse por Northern Blot que además da información del tamaño y secuencia de las moléculas de mRNA presentes. En esta técnica, lo primero que se hace es desnaturalizar al RNA para deshacer estructuras secundarias. Posteriormente se separan los fragmentos en un gel de agarosa que después se transfiere a una membrana. Luego de la transferencia, todos los fragmentos de RNA migran a la membrana y es momento de incubarla con una sonda de DNA específica que hibrida con la secuencia del gen que se busca. Esta sonda tiene además un marcador radioactivo o fluorescente que es el que permite detectar el transcrito de interés una vez que se revela. El Northern Blot era una técnica de uso común hasta hace unos años para estudiar la expresión génica, sin embargo, no permite una adecuada cuantificación y ha sido reemplazada por técnicas más precisas y modernas.

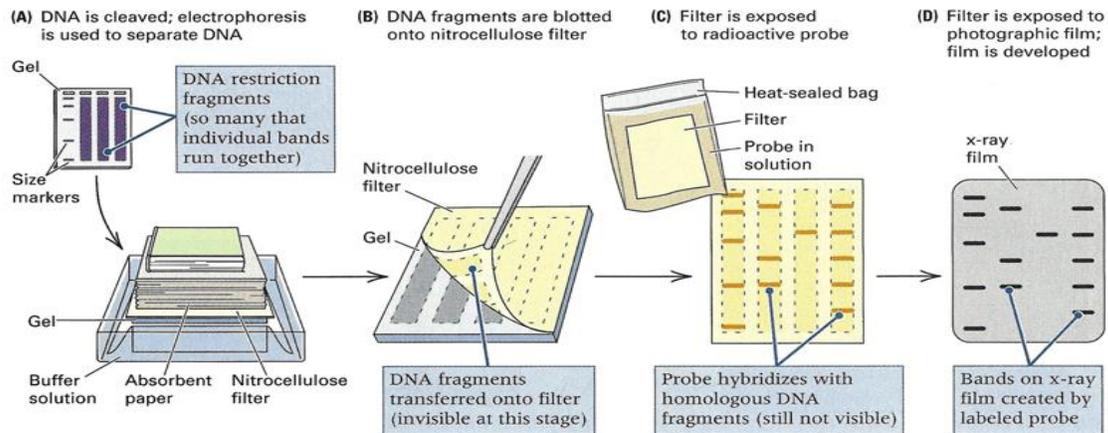


Figura A.1 Esquematización del proceso de Northern Blot (Tomado de Laneve & Giangrande, 2014)

Otra técnica más moderna que también se basa en la hibridación de una sonda para detectar transcritos de interés son los Microarreglos de cDNA que permiten monitorear la expresión de miles de genes al mismo tiempo. Esta técnica involucra el arreglo de sondas de cDNA (de secuencias conocidas alojadas en bases de datos como UniGene® o GenBank® que representan los genes de interés) sobre una placa de vidrio y su hibridación

con fragmentos de cDNA de secuencias diana (de las condiciones problema) marcados por fluorescencia. Lo que se cuantifica es el nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana de cDNA a través de un análisis de imagen de la fluorescencia que representa el nivel de expresión de cada gen.

El RNA de las condiciones problema y de la condición control es retrotranscrito a cDNA y cada uno es marcado con un fluoróforo distinto. Una vez marcados, los cDNAs diana se hibridizan con la placa de ensayo y posteriormente la placa se lava y está lista para escanearse.

El arreglo ya hibridado es excitado por láser, lo que genera una emisión con un espectro determinado. Un microscopio láser de barrido confocal mide la intensidad de fluorescencia de las sondas hibridadas. Este escaneo produce dos imágenes monocromáticas, una para cada fluoróforo marcado, que son sobrepuestas con la ayuda de un software para analizar los resultados. El color de cada spot en la imagen resultante representa la abundancia relativa del RNA hibridado en el ensayo y de esta forma es posible comparar los niveles de expresión en la condición problema contra los de la condición control para cada uno de los miles de genes ensayados (Whitchurch, 2002).

El método de microarreglos permite detectar en un mismo ensayo muchos genes de interés y es relativamente económico, pero tiene como desventajas que está limitado al conocimiento disponible de la secuenciación del genoma del organismo de estudio y que tiene un rango dinámico de detección bajo debido al ruido de fondo y a la saturación de las señales de fluorescencia; además la comparación entre experimentos necesita muchas veces de una normalización complicada (Wang *et al.*, 2009).

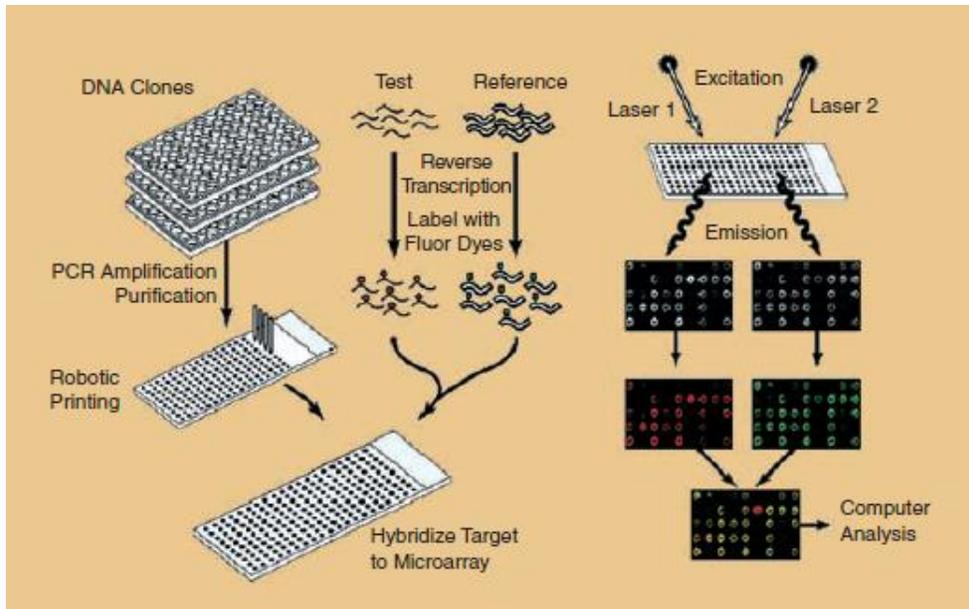


Figura A.2 Diseño de un Ensayo de microarreglos de cDNA (Tomada de Duggan *et al.*, 1999).

Medición de la expresión génica por qRT-PCR.

La PCR en tiempo real es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de DNA o mRNA. Utilizando cebadores específicos es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia. Cuando se combina con una RT-PCR se determina la cantidad de mRNA de una muestra. Mediante PCR en tiempo real es posible monitorear el progreso de la reacción conforme va ocurriendo; por tanto, los datos son colectados a lo largo del proceso y no al final como sucede en la PCR normal. Para la detección del producto de qPCR se utilizan dos tipos de químicas, un colorante intercalante a la doble cadena como el SYBR Green o una sonda específica marcada con un fluoróforo. La principal desventaja del SYBR Green es que al intercalarse de manera no específica al DNA puede generar falsos positivos al detectar productos inespecíficos de amplificación; para evitar estos errores es muy importante optimizar el diseño de los cebadores. Por otro lado, las sondas permiten una detección específica del gen o transcrito de interés. Estas sondas son oligos de DNA que tienen un fluoróforo en su extremo 5' y una molécula apagadora (*quencher*) en el 3'. Si la sonda está intacta, la proximidad del apagador reduce

drásticamente la fluorescencia emitida por el reportero, pero cuando la sonda hibrida con la molécula de interés, la acción de nucleasa 5' de la polimerasa escinde la sonda y libera al fluoróforo reportero, incrementando su señal fluorescente que es medida por el equipo.

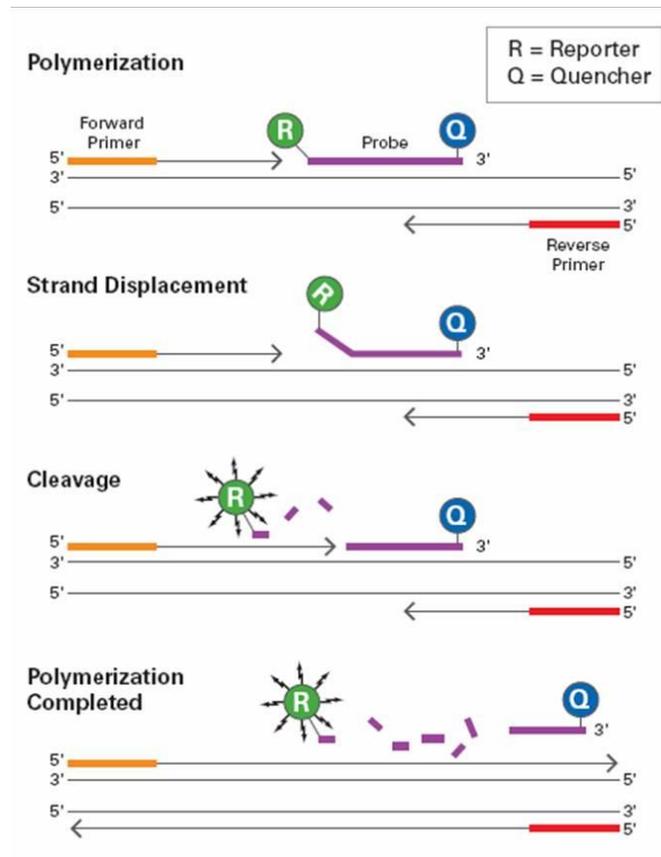


Figura A.3 Fluorescencia de una sonda TaqMan en qPCR. (Tomado de: Applied Biosystems)

Utilizando la qPCR es posible analizar la expresión génica de dos maneras, mediante una cuantificación absoluta o una cuantificación relativa.

La cuantificación absoluta se basa en la construcción de una curva estándar que es preparada con diluciones seriadas de una muestra donde el templado se encuentra en una concentración conocida. Para la medición de expresión génica, no es posible utilizar DNA como estándar para la cuantificación absoluta, ya que las muestras a analizar provienen de mRNA, y no existe un control preciso sobre la eficiencia del paso de la transcripción reversa. Generalmente se utiliza cDNA o RNA transcrito *in vitro*. Es importante que este RNA no presente contaminación con DNA genómico ya que se requiere de un estándar de alta

pureza para asegurar resultados confiables. La concentración de este estándar debe medirse espectrofotométricamente a A_{260} y para convertir a número de copias se utiliza el peso molecular del RNA templado.

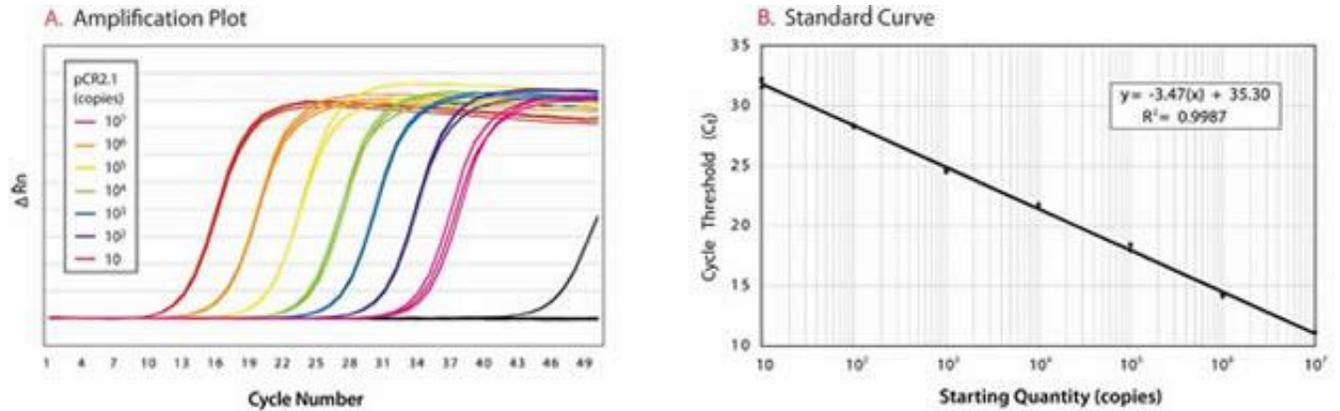


Figura A.4 Curva de amplificación y su curva estándar para cuantificación absoluta por qPCR.

Para generar esta curva estándar a partir de la curva de amplificación que se obtiene luego de correr los ensayos, los resultados deben graficarse como la regresión lineal de los valores de C_q (C_t) versus el logaritmo de la concentración de RNA o cDNA para cada punto de la curva.

La curva estándar además provee de mucha información sobre el ensayo. La pendiente obtenida refleja la eficiencia de la amplificación. Pendientes entre -3.1 y -3.6 son consideradas aceptables para ensayos de expresión génica, ya que la eficiencia estaría entre 90 y 110%. Una pendiente de -3.32 es indicativa de un 100% de eficiencia ya que matemáticamente, toma 3.32 ciclos de amplificación para incrementar el número de moléculas de templado 10 veces ($2^{3.32} = 10$) en cualquier muestra.

El valor de R^2 es un indicador del desempeño del ensayo y es el coeficiente de correlación entre los datos generados y los resultados esperados en condiciones ideales. El valor de r^2 debería ser mayor a 0.99.

Una vez que se tiene la curva estándar, la concentración de las muestras problema se determina mediante la simple interpolación de su señal de fluorescencia (C_t) en la curva

estándar. Para conocer la concentración de la muestra problema se utiliza la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$\text{Concentración} = 10^{\frac{(Ct-b)}{m}} \dots\dots (\text{Ec. 1})$$

Donde Ct es el ciclo en el que la amplificación es exponencial, b es el valor de intersección con el eje y y m es la pendiente, ambas a partir de la curva estándar. Las unidades de la cuantificación serán las mismas utilizadas para la construcción de la curva estándar.

Por el contrario, la cuantificación relativa compara la expresión de un gen en una muestra o condición problema con la expresión de ese mismo gen bajo una condición control, utilizando un gen de referencia como normalizador.

Una cuantificación relativa compara entre diferentes muestras o condiciones la cantidad relativa o relación del mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo o control endógeno. En un ensayo de este tipo, la variación en la expresión génica se reporta en base a una condición control y la cuantificación relativa mide la diferencia entre los valores de Ct del gen de interés y los valores de un gen que no varía al cambiar las condiciones (gen de referencia o endógeno). Como se va a normalizar con base en un gen de referencia, es necesario que este gen esté validado experimentalmente para asegurar que se puede utilizar para comparar las variaciones existentes en el gen de interés bajo las distintas condiciones de estudio. Idealmente se recomienda utilizar más de un gen de referencia.

Para calcular los niveles de expresión génica relativa existen dos métodos principales. El primero no toma en cuenta la eficiencia de amplificación ni del gen problema ni del gen endógeno y por tanto no es necesario construir una curva de calibración para ninguno de ellos, haciendo relativamente más sencillo el procedimiento. Este modelo, conocido como de Doble Delta y presentado por Applied Biosystems, compara las diferencias entre los Ct s de el gen problema y el gen de referencia en la condición problema y la condición control (Pfaffl *et al.*, 2001). Para este modelo, la eficiencia de amplificación del gen problema y del endógeno se considera idénticas y óptimas, es decir, del 100% ($E_{\text{gen problema}} = E_{\text{gen control}} = 2$) y, por tanto, la ecuación que permite calcular los niveles de expresión es la siguiente (Ec. 2):

$$R = 2^{-[\Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{control}]} \dots\dots\dots(Ec. 2)$$

Donde R es el número de veces que el gen se eleva o disminuye su expresión en la condición problema en comparación con la condición control y ΔCt es la diferencia de Ct entre el gen en estudio y el gen endógeno en una misma condición. Simplificando:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \dots\dots\dots (Ec. 3)$$

La desventaja de este modelo es que, en condiciones reales, cada gen ensayado tiene una eficiencia de amplificación distinta y pocas veces es del 100% para todos, por lo que este método sólo da una aproximación de la relación (R) de la expresión génica en condiciones ideales.

Existe un segundo modelo que permite una cuantificación relativa más exacta y cercana a la realidad que toma en cuenta la eficiencia de amplificación de cada gen y el C_p o Punto de cruce (es el ciclo en el cual la señal de fluorescencia sobrepasa apreciablemente el ruido de fondo) de cada transcrito en la condición problema y la condición experimental (muestra). Este método fue propuesto por Pfaffl en 2001 y su modelo matemático es una adaptación del método de Doble Deltas, como se aprecia a continuación en la ecuación 4 (Pfaffl *et al.*, 2001):

$$R = \frac{E_{gen\ problema}^{\Delta Cp(control-muestra)}}{E_{gen\ referencia}^{\Delta Cp(control-muestra)}} \dots\dots (Ec. 4)$$

Para calcular la eficiencia de los genes es necesario hacer una curva estándar construida a partir de diluciones seriadas del mRNA con el que se trabajará. No es necesario utilizar estándares altamente puros provenientes de un plásmido o de RNA transcrito *in vitro*, lo que disminuye los costos y genera resultados altamente confiables. La eficiencia se calcula en la fase exponencial de amplificación con la siguiente ecuación:

$$E = 10^{\frac{-1}{m}} \dots\dots\dots (Ec. 5)$$

Donde m es la pendiente obtenida por la regresión lineal de la curva estándar. Para que la eficiencia sea aceptable, la pendiente de la curva debe tener un valor entre -2.8 y -3.6.

Los cambios en la expresión de los genes generalmente se representan en forma de gráficas en las que se muestra el número de veces que el gen blanco aumentó o disminuyó su expresión con respecto al gen endógeno bajo las condiciones de estudio (*R*). Muchas veces los datos se presentan como el logaritmo en base 10 de esta relación.

Nuevas tecnologías: el RNA-seq

La secuenciación de RNA o RNA-seq permite medir la expresión génica utilizando las nuevas tecnologías de secuenciación. Esta técnica permite mapear y cuantificar transcriptomas eucariontes de una forma más rápida y da más información que otras tecnologías y consiste en la secuenciación profunda de cDNA de diferentes tipos celulares, condiciones ambientales o estados de desarrollo, y la cuantificación de las lecturas correspondientes a cada transcrito como medida de su nivel de expresión en valores absolutos. Esta técnica es mucho más eficaz para distinguir entre genes parálogos y para detectar transcritos poco abundantes, y permite cuantificaciones reproducibles. Además, resulta útil para la identificación de polimorfismos y de nuevas isoformas (Costa-Silva *et al.*, 2017). Al contrario que los microarreglos, la RNA-Seq no requiere necesariamente un genoma de referencia, pues hay programas capaces de cuantificar la expresión aun cuando no existan anotaciones disponibles, si bien es cierto que se obtienen mejores resultados cuando hay se dispone de un genoma de referencia para determinar la identidad de los genes.

De forma general, un pool de RNA (total o poli adenilado) es convertido en una biblioteca de fragmentos de cDNA con adaptadores en uno o ambos extremos. Cada molécula (con o sin amplificación) es secuenciada con alto rendimiento por un solo extremo (*single end*) o por ambos extremos de cada fragmento (*paired-end*). Con esto se obtienen lecturas cortas de entre 40 a 300 pb. Posteriormente, estas lecturas son alineadas al genoma o a los transcritos de referencia o ensambladas *de novo* para obtener un mapa transcriptómico con la estructura transcripcional del genoma y los niveles de expresión de cada gen.

Entre las ventajas de esta técnica están la rapidez con que es posible evaluar la expresión de muchos genes simultáneamente y el relativo bajo costo que tiene (Wang *et al.*, 2009). Otra

de las ventajas es que la RNA-seq no presenta ruido de fondo (a diferencia de los microarreglos) lo que permite la detección de transcritos en baja abundancia, y tampoco tiene un límite máximo de detección por lo que su rango dinámico es muy grande. La cuantificación que arroja es tan precisa como el qPCR y no necesita el diseño de cebadores y/o sondas ni la construcción de curvas estándar.

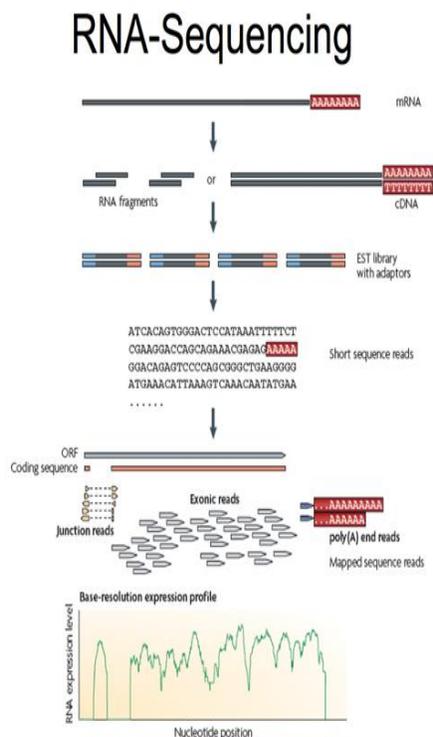


Figura A.5 Proceso de RNA-seq para evaluar la expresión génica (Wang *et al.*, 2009).

Metodología utilizada para la medición de los niveles de expresión de cutinasas mediante qRT-PCR Multiplex.

Identificación de los genes de cutinasas y genes endógenos mediante PCR punto final.

Se llevaron a cabo PCRs utilizando como templado el cDNA obtenido a partir del micelio de *A. nidulans* crecido durante 24 h en medio con cutina. Se extrajo RNA total y se sintetizó el cDNA con el uso de cebadores oligodT para enriquecer el RNA mensajero (mRNA). En todos los casos se utilizó 1 µg de RNA total para la retro transcripción. Con los cebadores específicos para cada uno de los genes de las cutinasas *ancut1*, *ancut2*, *ancut3* y *ancut4** y para los genes endógenos probados. Para la amplificación se utilizó la Pfu Polimerasa (Thermo Scientific Inc., MA, USA). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tabla A.1 Mezcla de reacción para la PCR punto final para detectar los genes de cutinasas de *A. nidulans*

Componente	Cantidad
Buffer Pfu 5X	5 µL
dNTPs	1 µL
Primer Forward	1 µL
Primer Reverse	1 µL
cDNA	200 ng
Pfu polimerasa	0.5 µL
Agua grado biología molecular	c.b.p. 50 µL

*Nota: Los cebadores utilizados para cada una de las cutinasas fueron diseñados en el grupo de trabajo por Hernández y no se enlistan sus secuencias por encontrarse en proceso de publicación.

La PCR se llevó a cabo con un paso de desnaturalización inicial a 95° C durante 3 minutos. Para los genes de las cutinasas y la β-tubulina se siguió el siguiente programa en el que se utilizó un gradiente de -1° C/ciclo para la temperatura de extensión; mientras que para la ubiquitina 1 se utilizó una única temperatura de 55° C durante los 35 ciclos.

Desnaturalización inicial	10 ciclos (bajando 1°C la temperatura de alineamiento cada ciclo)			25 ciclos			Extensión final
95° C 3 min	95° C 30 s	65-58 ° C 40 s	72° C 1:40 m	95° C 30 s	58° C 40s	72° C 1:40 m	72° C 10 min

Para la amplificación de los genes de los factores transcripcionales *farA* y *farB* se utilizaron cebadores previamente reportados por Hynes y colaboradores y el Kit Long PCR EnzymeMix (ThermoScientific Inc., MA, USA) en la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Cantidad
10X Long PCR Buffer	5 μ L
dNTPs	1 μ L
Primer Forward	0.3-1 μ M
Primer Reverse	0.3-1 μ M
cDNA	10 pg-1 μ g
Long PCR Enzyme Mix	1.25-2.5 u
Agua grado biología molecular	c.b.p. 50 μ L

La reacción se llevó a cabo utilizando un protocolo de 3 pasos consistente en:

Desnaturalización inicial	10 ciclos			25 ciclos			Extensión final
95°C 3 min	95°C 20 s	Tm-5 °C 30 s	68 °C 60 s/kb	95°C 20 s	Tm-5°C 30s	68°C 60s/kb +2 s c/ciclo	68°C 10 min

Para este ensayo se utilizó cDNA de la cepa silvestre PW1 y de las cepas mutantes AN Δ FarA y AN Δ FarB crecidas en medio mínimo y en medio optimizado con cutina. Para visualizar los productos de PCR se corrieron geles de agarosa al 1% con EtBr y para conocer el peso de estos productos, se usó como estándar el marcador Gene Ruler 1 kb (Thermo Scientific Inc., MA, USA).

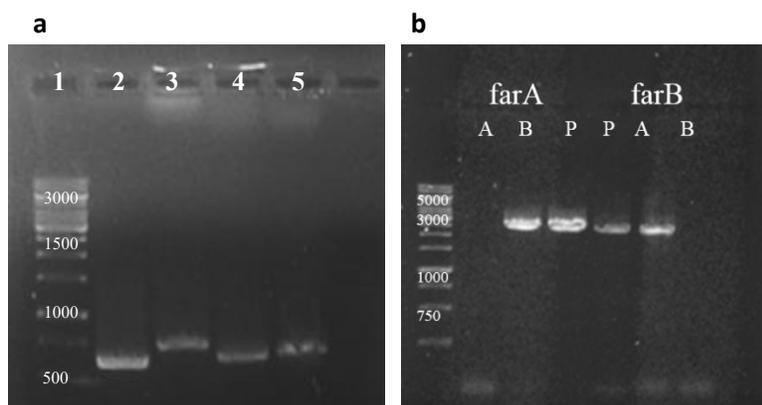


Fig. A.6 Geles de agarosa al 1% con EtBr. a) Productos de amplificación de los 4 genes de cutinasas obtenidos a partir de RNA extraído de micelio crecido en medio con cutina. Carriles 1: Gene Ruler 1kb, 2: producto de PCR con cebadores para ANCTU1, 3: producto de PCR con cebadores para ANCUT2, 4: producto de PCR con cebadores para ANCUT3, 5: producto de PCR con cebadores para ANCUT4. Los productos de amplificación esperados estaban entre los 500 y los 650 pb b) Productos de amplificación de los genes *farA* y *farB* obtenidos a partir de cDNA de las diferentes cepas. A: AN Δ FarA, B: AN Δ FarB y P: PW1. Los productos de amplificación esperados eran de aproximadamente 3000 pb.

Como se observa en la figura A.6a, fue posible amplificar los cuatro genes utilizando los cebadores diseñados con este fin. Como se observa en la figura A.6b en la cepa nativa PW1 se obtuvieron productos de amplificación para los dos factores mientras que en las cepas mutantes únicamente se amplificó uno de genes, el que no fue eliminado. Así se confirmó que no había expresión del gen regulador en las cepas mutantes y por tanto, tampoco se sintetizará la proteína correspondiente.

Diseño de cebadores y sondas para qPCR de los genes *ancut1*, *ancut2*, *ancut3*, *ancut4*, β Tub2, *Ubq1*, *farA* y *farB*.

Se diseñaron cebadores y sondas específicos para la detección en tiempo real de los cuatro genes de las cutinasas de *A. nidulans*, de los dos genes endógenos probados: β -Tubulina (2ª subunidad) y ubiquitina (1ª subunidad) y de los factores que regulan el metabolismo de lípidos *farA* y *farB* utilizando el software PrimerQuest de Integrated DNA Technologies (IDT, IA, USA). Las sondas utilizadas fueron marcadas con distintos fluoróforos para permitir la identificación en reacciones multiplex (Tabla A.2). La especificidad de estos juegos de cebadores y sondas fue analizada mediante un BLASTn (NCBI, USA) y la formación de estructuras secundarias y horquillas mediante el software OligoAnalyzer de Integrated DNA Technologies (IDT, IA, USA).

Tabla A.2: Secuencias de cebadores y sondas utilizadas para la identificación por qRT-PCR Multiplex de los genes de interés en este estudio.

Gen	ID	Secuencia	Longitud	Tm
<i>ancut1</i>	Cut1fwd	5' TCGATCAACGCCAGATCAC 3'	19	62
	Cut1rev	5' GAGCCACGAGCGAAGATAAA 3'	20	62
	Cut1prb	56-FAM-ACGGTTCCT/ZEN/GCCACGATGTCA	21	68
<i>ancut2</i>	Cut2fwd	5' CGAACTGGCTGCCTCTAAG 3'	19	62
	Cut2rev	5' CGCGATCTTGCTTGTATCT 3'	20	62
	Cut2prb	5' FAM/TGGTGGATA/ZEN/CAGTCAAGGAACGGC 3'	24	68
<i>ancut3</i>	Cut3fwd	5' GTA TGA ACT CCA ACG ACC TTG A 3'	22	62
	Cut3rev	5' GAC GAC GAA GCC CAT GTT 3'	18	62
	Cut3prb	5' Cy3/TGA ATG CCA CAG ATT TGC AGT CGC /3' BHQ_2/	24	68
<i>ancut4</i>	Cut4fwd	CTC GTC TTC GCG GTT CAT	18	62
	Cut4rev	GTA CCC ATG TTA CCG ATC TCA G	22	62
	Cut4prb	56-FAM/AGA ACT CAC /ZEN/TTT CAT CTT CGC CCG C/3IABkFQ	25	68
<i>ubq1</i>	Ubqfwd	5' GGGATTAGCTGTGGACTTGTAG 3'	22	62
	Ubqrev	5' AAGAAACCACGCCATATAGTT 3'	22	62

	Ubqprb	5' Cy5/TGTGTTCTGAATGGGAGGTCATGCT 3' BHO_2/	24	68
<i>βtub</i>	bTubfwd	5' TGG TAA CCA GGT TGG TTC TG 3'	20	62
	bTubrev	5' CGG AGT CGC CAG TGT AAA T 3'	19	62
	bTubprb	5' Cy5/ATG TTC GCC GGA GAT GGT CTG C/3'IA	22	68

Condiciones de amplificación por qRT-PCR Uniplex y Multiplex.

Los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems 7500 Fast System (Life Technologies, CA, USA) en placas de 96 pozos con un volumen final de 20 µL por pozo. Se utilizó la 2X TaqMan *Gene Expression Master Mix* (Life Technologies, CA, USA).

En todas las pruebas se utilizó el protocolo estándar del equipo, que consiste en los siguientes pasos:

Etapa	T (°C)	Tiempo	
Activación	95	3 min	
Desnaturalización	95	15 s	40 ciclos
Extensión	60	35 s	
Disociación	95	15 s	

El análisis de los Cts obtenidos se llevó a cabo con el Software *Applied Biosystems 7500 Fast System* (Life Technologies, CA, USA) proporcionado por la misma compañía y a partir de éste se evaluaron los niveles de expresión

Selección del gen endógeno

Para elegir el gen endógeno se consultó la bibliografía disponible y se encontró que entre los genes más utilizados para estudios de expresión génica en hongos se encuentran el gen codifica para la subunidad β de la tubulina, el gen de la Glucosa 3-fosfato deshidrogenasa (*gdp*) y el de la subunidad 1 de la ubiquitina (*ubq1*) (Pyrzak *et al.*, 2008; Leroch *et al.*, 2013). Se decidió probar β tub y ubq1 para lo que se diseñaron cebadores de estos genes para

probar en PCR punto final utilizando el software de DNA Technologies PrimerQuest que se enlistan en las tablas A.3 y A.4

Tabla A.3 Especificaciones de los cebadores para PCR punto final del gen que codifica para la β -tubulina subunidad 1:

gen	sentido	secuencia	longitud	Tm	% CG	Inicio	Tamaño
b-tub	Fwd	TGACAGCTGCCAACTACCAG	20	60	55	899	
b-tub	Rev	GAGACGCGGTTGAAGAGTTC	20	60	55	1145	247

Tabla A.4 Especificaciones de los cebadores para PCR punto final del gen que codifica para la subunidad 1 de la Ubiquitina:

gen	sentido	secuencia	longitud	Tm	% CG	Inicio	Tamaño
ubq1	Fwd	GGGATTAGCTGTGGACTTGTAG	22	62	50	73	
ubq1	Rev	AAGAAACCACCGCCATATAGTT	22	62	40.91	168	97

Se amplificaron los dos genes de referencia elegidos y se analizaron estadísticamente los Cts obtenidos bajo distintas condiciones de cultivo para determinar cuál de los 2 presentaba menores variaciones, seleccionando la condición control (glucosa 0.5%) y el medio con aceite de olivo para la prueba.

Se hicieron cinco extracciones independientes de RNA a partir de micelio crecido en cada uno de los medios y se realizó por triplicado la amplificación de los genes de referencia mediante qRT-PCR.

En el gráfico A.1 se observa el promedio de Cts obtenidos en cada amplificación y en cada condición para los dos genes con los que se realizó el análisis estadístico. Utilizando una ANOVA de dos factores con una significancia del 95% ($\alpha = 0.05\%$) se analizó si había diferencia significativa entre los valores de Ct obtenidos para cada gen.

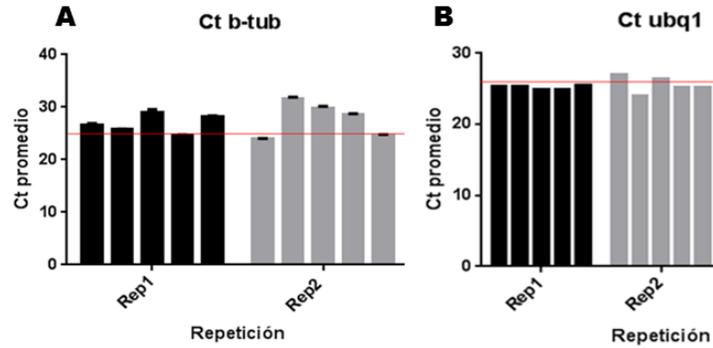


Gráfico A.1 Valores promedio de Cts en las distintas condiciones ensayadas para los genes de referencia A. β -tubulina y B. ubiquitina1. Las barras en negro corresponden al medio control (Glucosa 0.5%) y las barras en gris al medio con aceite de olivo.

Como se muestra en las tablas A.5 y A.6, mediante una ANOVA de 2 factores con 95% de significancia, se encontró diferencia significativa entre condiciones para el gen de la subunidad β de la tubulina mientras que no se detectó diferencia significativa entre condiciones ni entre réplicas para el gen de la subunidad 1 de la ubiquitina por lo que se seleccionó este gen como el gen de normalización en los ensayos de expresión subsecuentes.

Tabla A.5 Análisis estadístico de la variabilidad de amplificación del gen *βtub* bajo distintas condiciones.

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) para el gen <i>βtub</i>							
Origen de las variaciones	Σ de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Decisión
Condiciones	170.836	4	42.709	10.993	1.007E-05	2.668	Rechazar
Réplicas	6.902	8	0.863	0.222	0.984	2.244	Aceptar
Error	124.322	32	3.885				
Total	302.060	44					

Tabla A.6 Análisis estadístico de la variabilidad de amplificación del gen *ubq1* bajo distintas condiciones.

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) para el gen <i>ubq1</i>							
Origen de las variaciones	Σ de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Decisión
Tratamiento	2.334	4	0.583	1.670	0.196	2.866	Aceptar
Repeticiones	36.664	5	7.333	20.995	2.47E-07	2.711	Aceptar
Error	6.985	20	0.349				
Total	45.984	29					

Optimización de la Eficiencia de los ensayos qRT-PCR Uniplex y Multiplex

Para obtener los valores de Eficiencia de amplificación de cada uno de los genes ensayados se construyeron curvas de calibración de diluciones seriadas de cDNA, con concentraciones de 500 a 0.5 ng totales. Para el cálculo, se obtuvo la pendiente de cada curva y se substituyó en la Ecuación 5 ($E = 10^{-1/\text{pendiente}}$).

Para que un ensayo se considere confiable, es necesario que los valores de eficiencia estén en un intervalo del 90 al 110% por lo que fue necesario realizar la optimización de los ensayos, variando las concentraciones de sondas y cebadores hasta alcanzar los valores de E adecuados. Las eficiencias obtenidas para todos los genes en las reacciones uniplex se muestran en el Anexo F y se encuentran todas entre el 90 y el 110%, dentro del intervalo que permite obtener una correcta cuantificación relativa por el método de dobles deltas modificado por Pfaffl (2001).

Una vez comprobado el correcto diseño de los ensayos uniplex, se llevó a cabo la optimización de los ensayos multiplex, buscando que no hubiera diferencia significativa entre la eficiencia de amplificación individual de cada gen y la obtenida al hacer el ensayo múltiple; para esto se ajustaron nuevamente las concentraciones de sondas y cebadores en la mezcla final de reacción hasta que se lograron amplificar correctamente todos los genes. Sin embargo, desde la amplificación en reacciones uniplex, el gen *ancut4*, no se logró detectar a partir del mensajero en ninguna de las condiciones probadas, ni aumentando las concentraciones de sondas y cebadores a más del doble de lo establecido para los otros genes. Para descartar un mal diseño de los cebadores y sondas, se llevó a cabo la amplificación del gen con cebadores específicos mediante PCR punto final y el amplicón obtenido se purificó y se usó como templado en una reacción uniplex de qPCR. La eficiencia obtenida de esta manera fue del 98% con lo que se comprobó que los cebadores y sonda estaban bien diseñados y se concluyó que en la muestra compleja de cDNA la abundancia del transcrito del gen *ancut4* se encuentra por debajo del límite de detección de este ensayo. Con esto podemos proponer que ninguna de las condiciones probadas logró inducir la expresión de este gen.

Los tres genes restantes de cutinasas *ancut1-3*, el gen endógeno de la ubiquitina (*ubq1*) y posteriormente los de los factores de transcripción *farA* y *farB* se pudieron cuantificar mediante reacciones multiplex.

La mezcla de reacción final para los dos ensayos triplex se muestra a continuación en las tablas A.7 y A.8.

Tabla A.7 Concentraciones finales de sondas y cebadores para el primer ensayo Multiplex

Componente	Concentración final <i>ancut1</i>	Concentración final <i>ubq1</i>	Concentración final <i>farA</i>
TaqMan			
Master Mix	1X	1X	1X
Agua		c.b.p. 20 µL*	
Primer F	0.3 µM	0.3 µM	0.5 µM
Primer R	0.3 µM	0.3 µM	0.5 µM
Sonda	0.2 µM	0.25 µM	0.35 µM
ADN	100 ng en volumen de 5µL Vol. total: 20 µL		

Tabla A.8 Concentraciones finales de sondas y cebadores para el segundo ensayo Multiplex

Componente	Concentración final <i>ancut4**</i>	Concentración final <i>ancut3</i>	Concentración final <i>farB</i>
TaqMan			
Master Mix	1X	1X	1X
Agua		c.b.p. 20 µL*	
Primer F	0.3 µM	0.3 µM	0.4 µM
Primer R	0.3 µM	0.3 µM	0.4 µM
Sonda	0.2 µM	0.25 µM	0.35 µM
ADN	100 ng en volumen de 5µL Vol. total: 20 µL		

*Para el ensayo uniplex del gen *ancut2* se utilizaron las mismas proporciones de cebadores y sonda que las optimizadas para el ensayo multiplex, únicamente se ajustó el volumen de agua necesario para completar los 20 µL de la reacción.

** Las concentraciones reportadas para el gen *ancut4* corresponden a las optimizadas para su amplificación a partir de producto de PCR punto final de los genes específicos para este gen.

ANEXO B. FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS MÍNIMO, CEHM Y CON CUTINA DE MANZANA

Medio mínimo (Käffer1985)

Componente	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L
Arginina	5 mL/L
Biotina	500 µL/L
Metionina	11 mg/L
Glucosa	10g/L

Medio MEHM modificado

Componente	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L
Extracto de levadura	0.5%
Arginina	5 mL/L
Biotina	500 µL/L
Metionina	11 mg/L
Sacarosa	500 mg/L
Aceite de olivo	0.5%
Sales 20X:	

Medio optimizado para la expresión de cutinasas

Componente	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L
Extracto de levadura	0.5%
Arginina	5 mL/L
Biotina	500 µL/L
Metionina	11 mg/L
Glicerol	0.1%
Cutina	0.5%

NaNO ₃	120 g
KCl	10.4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	10.4 g
KH ₂ PO ₄	30.4 g

Añadir dd H₂O hasta 1 L, almacenar a TA

Elementos traza:

ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2.2 g
H ₃ BO ₃	1.1 g
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.5 g
CoCl ₂ .5 H ₂ O	0.16 g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O	0.11 g
Na ₄ EDTA	5.0 g

Añadir los sólidos en orden a 80 mL de ddH₂O, disolviendo cada uno completamente antes de añadir el siguiente. Calentar la solución hasta ebullición, enfriar a 60 °C, enfriar a TA temperatura ambiente y ajustar el volumen a 100 mL con ddH₂O.

Stock de Vitaminas para cepas mutantes Δ ANFarA y Δ ANFarB:

Biotin	0.1g
Pyridoxine-HCl	0.1g
Tiamine-HCl	0.1g
Riboflavin	0.1g
p-Aminobenzoic acid	0.1g
Nicotinic acid	0.1g

Añadir dd H₂O hasta 100 mL.

ANEXO C. CONTEO DE ESPORAS

Cámara de Neubauer Hematocitómetro para conteo de esporas.

Para el conteo, se tomaron 990 μL de agua desionizada y 10 μL de la solución de esporas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se homogenizó la dilución y se colocaron 20 μL en cada extremo de la cámara (A), se colocó la cámara en el microscopio y bajo el objetivo de 40X se realizó el conteo de los 5 cuadrantes que se ejemplifican en la figura C.1. Para conocer el volumen necesario para inocular 1×10^6 esporas/mL de medio como concentración inicial, se utilizó la siguiente ecuación:

$$vol_{solución} = \frac{(v_{medio}) \left(\frac{1 \times 10^6 \text{ esporas}}{\text{mL de medio}} \right)}{\Sigma_{esporas} (\text{no. cuadrantes}) (v_{muestra}) (\text{Factor dilución})}$$

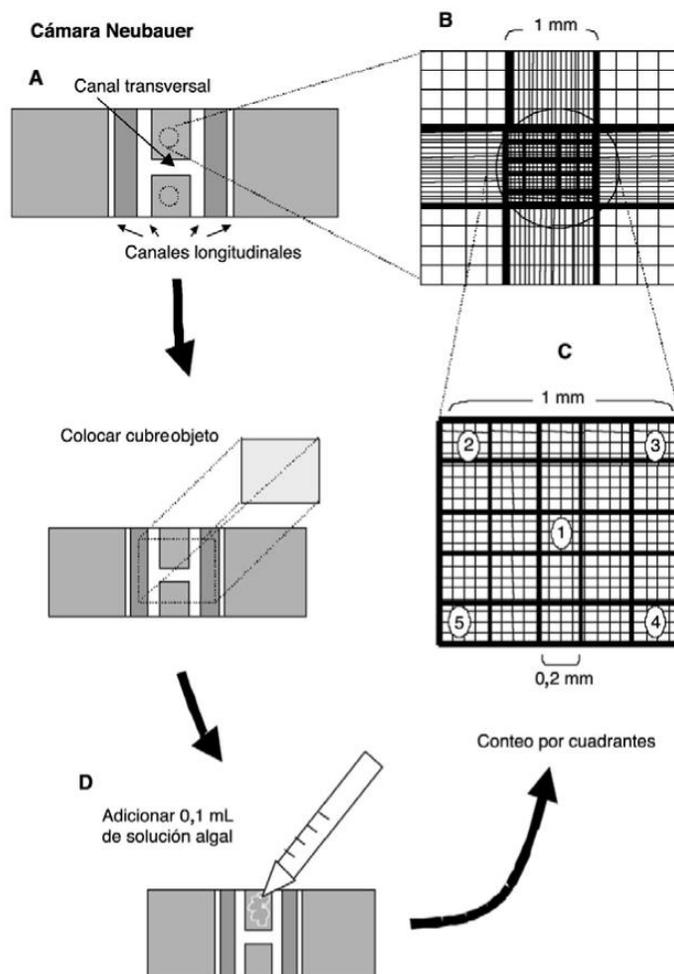


Figura C.1 Uso de la cámara de Neubauer para el conteo de esporas

ANEXO D: CURVA PATRÓN DE ABS UTILIZADA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SEGÚN EL MÉTODO DE BRADFORD.

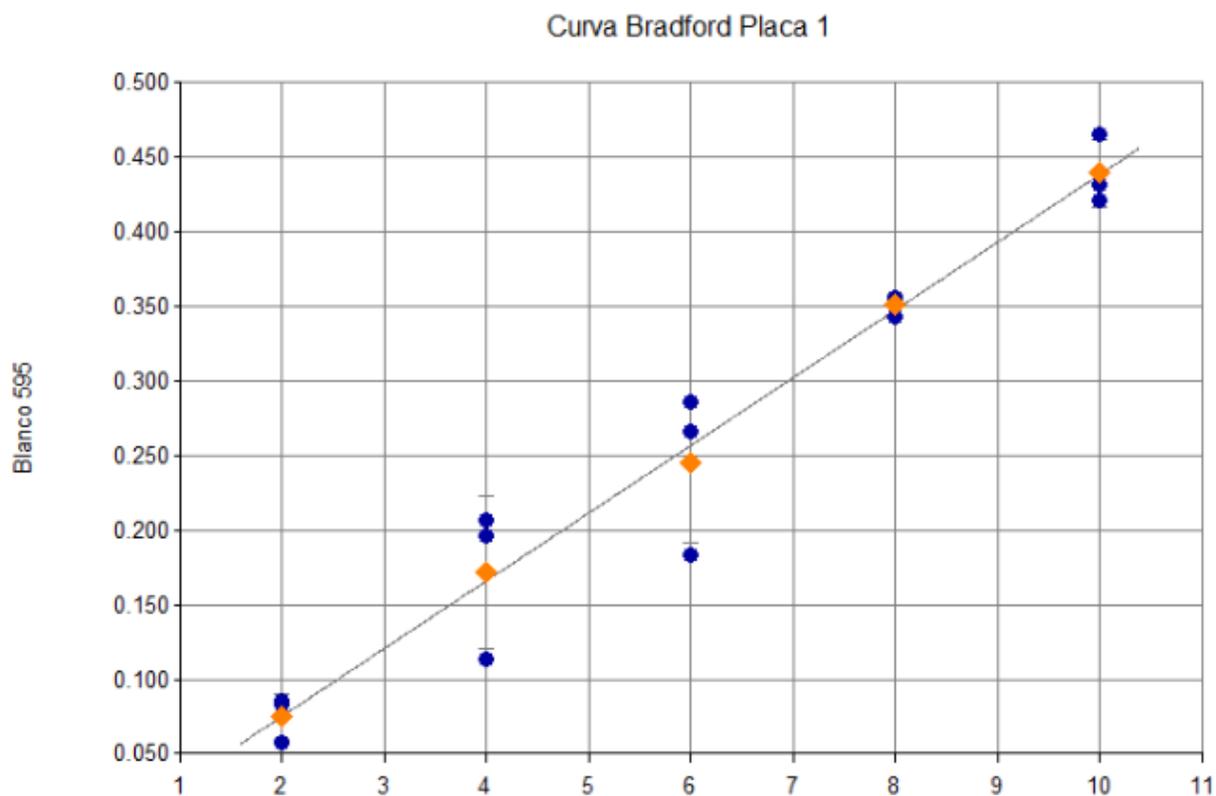


Gráfico D.1 Curva patrón de ABS utilizada para la cuantificación de proteína según el método de Bradford

Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
Bradford (BSA)	$Y=A*X+B$	0.0454	-0.0158	0.998

ANEXO E: CURVA PATRÓN DE *p*-NITROFENOL UTILIZADA PARA LA CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD TIPO CARBOXILESTERASA

Para construir la curva se utilizó como patrón *p*-nitrofenol en concentraciones de 25 a 200 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$. La absorbancia se midió a 420 nm, de igual forma que en los ensayos.

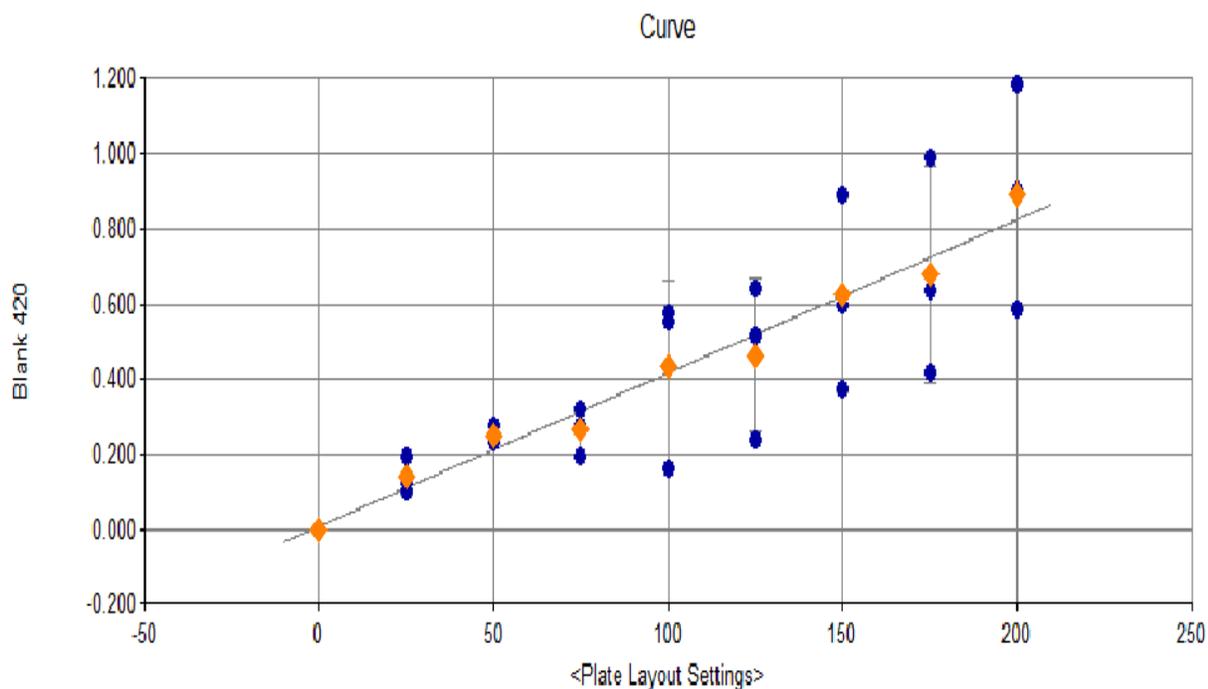


Gráfico E.1 Curva patrón de *p*-Nitrofenol utilizada para la cuantificación espectrofotométrica de la actividad tipo carboxilesterasa (CEH).

Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
pNP	$Y=A*X+B$	0.00409	0.00796	0.978

ANEXO F. EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN POR qRT-PCR DE LOS GENES ESTUDIADOS.

Tabla F1. Valores de eficiencia obtenidos para la amplificación los genes *ancut1*, *ubq1* y *farA* en ensayos uniplex y triplex

Valor	<i>ancut1</i>		<i>ubq1</i>		<i>farA</i>	
	uniplex	triplex	uniplex	triplex	uniplex	triplex
E (%)	107	102	104.4	102.6	113	97
r ²	0.956	0.996	0.993	0.992	0.988	0.994

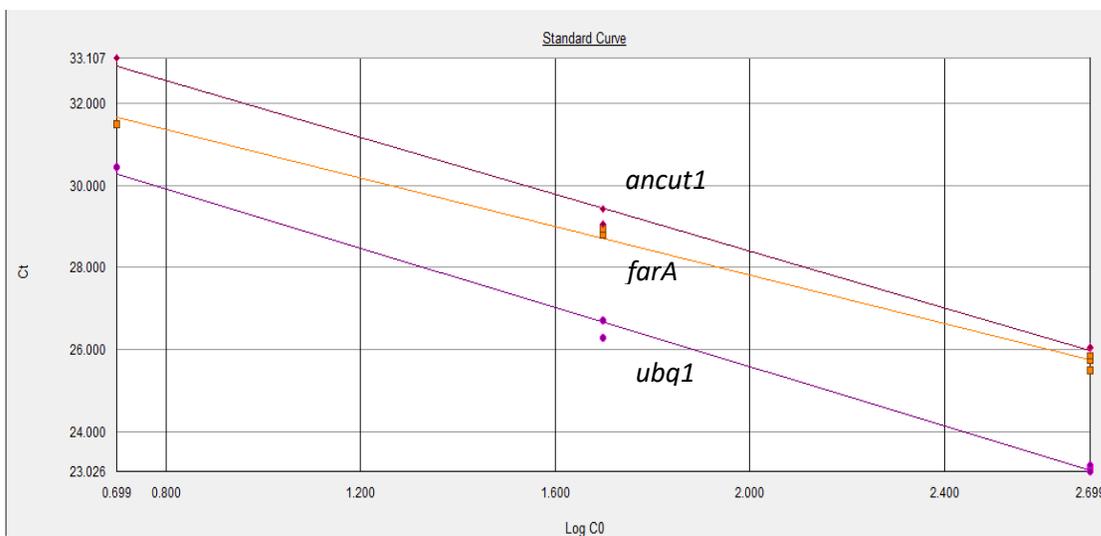


Gráfico F.1 Curva estándar multiplex para la detección de los niveles de expresión de los genes *ancut1*, *farA* y *ubq1* (log C vs Ct) para obtener la eficiencia de amplificación.

Tabla F.2 Valores de eficiencia obtenidos para la amplificación de los genes *ancut3*, *ancut4* y *farB* en el ensayo Triplex

Valor	<i>ancut3</i>	<i>ancut4</i>	<i>farB</i>
E (%)	93	ND	99
r ²	0.992	ND	0.98

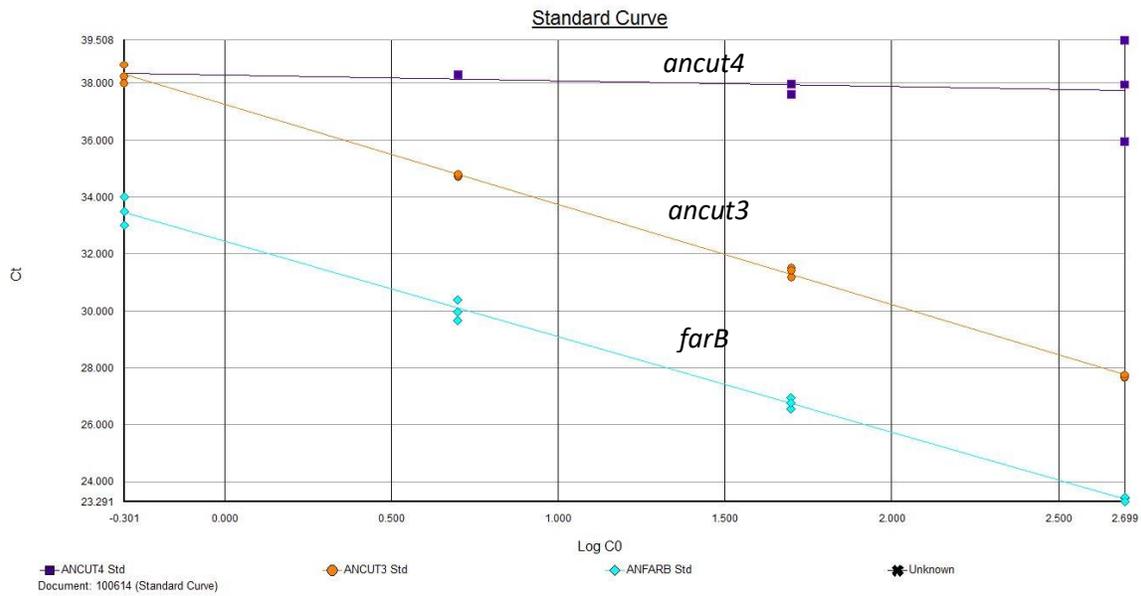


Gráfico F.2 Curva estándar multiplex para la detección de los niveles de expresión de los genes *ancut3*, *ancut4* y *farB* (log C vs Ct) para obtener la eficiencia de amplificación.

Tabla F.3 Valores de eficiencia obtenidos para la amplificación del gen *ancut4* utilizando como templado producto de PCR purificado con cebadores específicos.

Valor	<i>ancut4</i>
E (%)	99
r^2	0.974

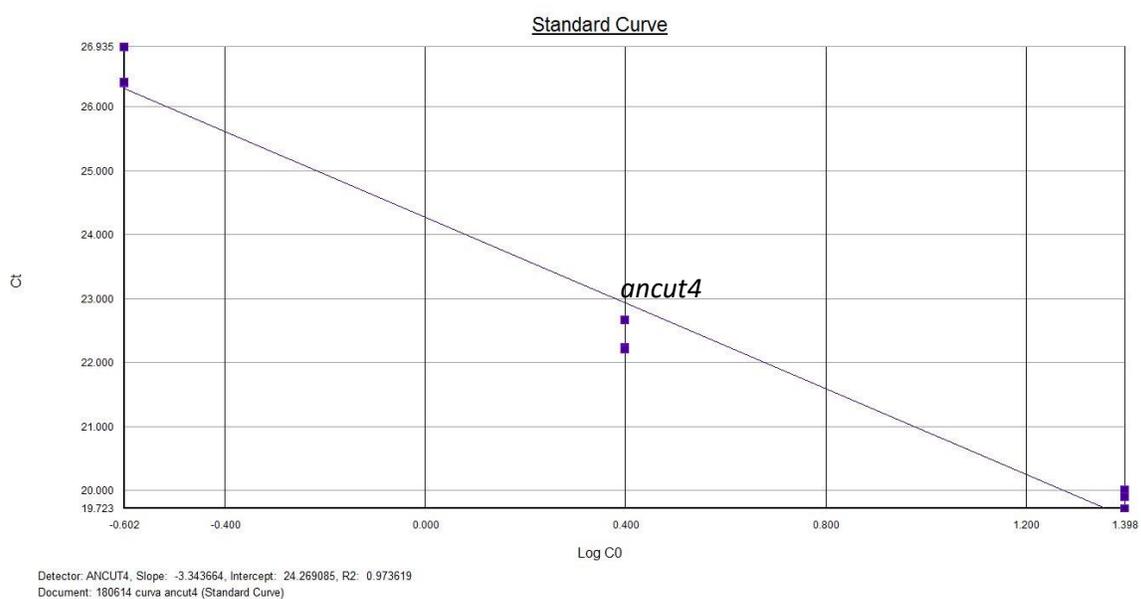


Gráfico F.3 Curva estándar del gen *ancut4* utilizando como templado producto de PCR purificado con cebadores específicos.

ANEXO G: SEÑALES TÍPICAS OBTENIDAS EN ESPECTROS DE ATR-FTIR PARA CUTINA Y PARA *ASPERGILLUS NIDULANS* PW1

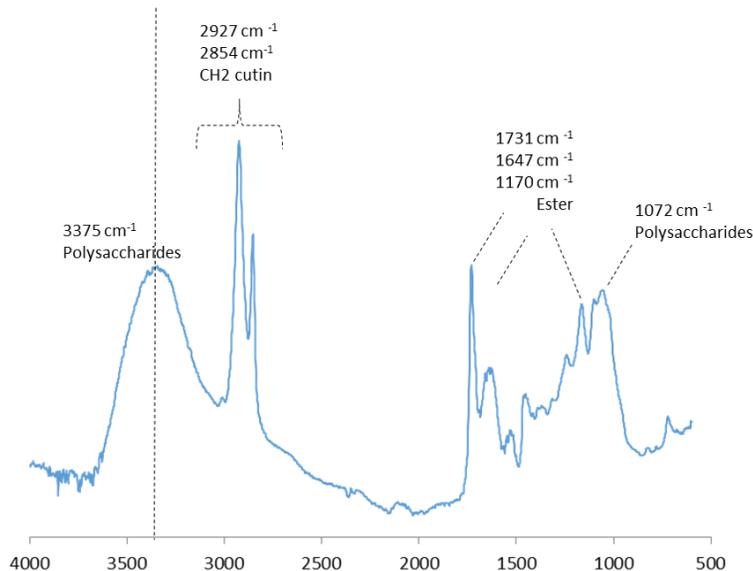
Tabla G.1 Señales típicas de la cutina pura obtenidas por ATR-FTIR

Señal	λ (cm ⁻¹)
H ₂ O	3400
$\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})$	3353
$\nu_a(\text{CH}_2)$	2925
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2854
$\nu(\text{C=O})$ éster	1728
$\nu(\text{C-O-C})$ débil	1641
$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring	1463
$\nu_a(\text{C-O-C})$ éster	1169
$\nu_s(\text{C-O-C})$ éster	1104
$\delta(\text{CH}_2)$ rocking	724

ν = estiramiento, δ = flexión, α = asimétrica, s = simétrico

CARACTERIZACIÓN DE CUTINA DE MANZANA PURA

Cutin



Señal	cm ⁻¹
Polisacáridos	3370-2285 1070-1075
CH ₂	2850-2930
Éster	1170-1180 1640-1655 1725-1735

Gráfico G.1 Espectro de ATR-FTIR de cutina pura

A. nidulans PW1

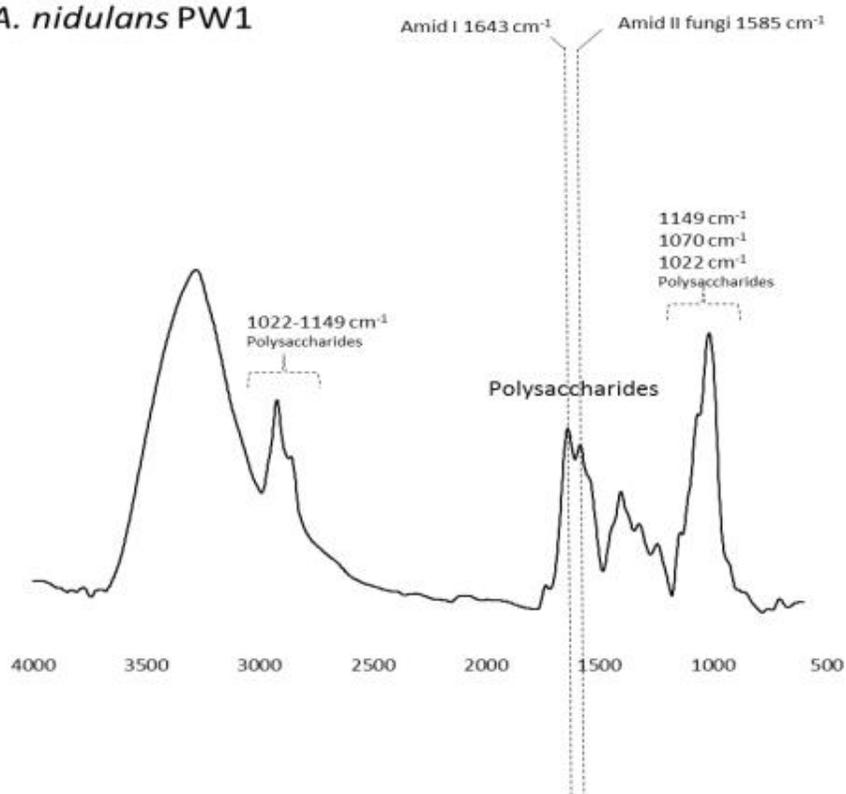


Gráfico G.2 Espectro de ATR-FTIR de *A. nidulans*

Tabla G.2 Señales de *A. nidulans* obtenidas por ATR-FTIR

Señal	cm^{-1}
Éster	1728-1731
	1713
	1700-1707
(strong acid)	1685-1687
	1161-1167
	1101-1104
$-\text{CH}_2$	1457-1463
	1344-1367

Señal	cm^{-1}
Ácidos grasos	3050-2800
Amida I	1600- 1700
Amida II	1600- 1500
Polisacáridos	1200- 900



Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation

Eva Bermúdez-García¹ · Carolina Peña-Montes² · Isabel Martins³ · Joana Pais³ · Cristina Silva Pereira³ · Sergio Sánchez⁴ · Amelia Farrés¹

Received: 10 October 2018 / Revised: 17 February 2019 / Accepted: 23 February 2019 / Published online: 13 March 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Four cutinase genes are encoded in the genome of the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans*, but only two of them have proven to codify for active cutinases. However, their overall roles in cutin degradation are unknown, and there is scarce information on the regulatory effectors of their expression. In this work, the expression of the cutinase genes was assayed by multiplex qRT-PCR in cultures grown in media containing both inducer and repressor carbon sources. The genes *ancut1* and *ancut2* were induced by cutin and its monomers, while *ancut3* was constitutively expressed. Besides, cutin induced *ancut4* only under oxidative stress conditions. An *in silico* analysis of the upstream regulatory sequences suggested binding regions for the lipid metabolism transcription factors (TF) FarA for *ancut1* and *ancut2* while FarB for *ancut3*. For *ancut4*, the analysis suggested binding to NapA (the stress response TF). These binding possibilities were experimentally tested by transcriptional analysis using the *A. nidulans* mutants AN Δ *farA*, AN Δ *farB*, and AN Δ *napA*. Regarding cutin degradation, spectroscopic and chromatographic methods showed similar products from ANCUT1 and ANCUT3. In addition, ANCUT1 produced 9,10-dihydroxy hexadecanoic acid, suggesting an endo-cleavage action of this enzyme. Regarding ANCUT2 and ANCUT4, they produced omega fatty acids. Our results confirmed the cutinolytic activity of the four cutinases, allowed identification of their specific roles in the cutinolytic system and highlighted their differences in the regulatory mechanisms and affinity towards natural substrates. This information is expected to impact the cutinase production processes and broaden their current biotechnological applications.

Keywords Cutinase · Expression · Carbon catabolite repression · Cutin degradation · Transcription factors · Oxidative stress · *Aspergillus nidulans*

Introduction

Cutin is a key component of the cuticle, covering the plant epidermis with a hydrophobic coating, present in nearly all above-ground parts of terrestrial plants. The primary function of this layer is to protect plants against desiccation and biotic stresses, acting as an interface between the plant and its environment (Martínez Rocha et al. 2008; Taiz and Zeiger 2002). The cutin is a polyester formed by long-chain fatty hydroxy acids, mainly derivatives of palmitic acid (16:0) and oleic acid (18:1), gathered by ester bonds forming a three-dimensional network stabilized by cross-linking (Ray and Stark 1998). These fatty acids can be hydroxylated or epoxyated at the middle of the carbon chain or in carbons closer to the double bond. The palmitic acid derivatives consist primarily of 16-hydroxy palmitic acid, and 9,16- or 10,16-dihydroxypalmitic acid, whereas oleic acid derivatives consist primarily of 18-hydroxyoleic acid, 9,10-epoxy-18-hydroxystearic acid, and

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09712-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Amelia Farrés
farres@unam.mx

- ¹ Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico
- ² Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, 91897 Veracruz, Ver., Mexico
- ³ Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA), Oerias, Portugal
- ⁴ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Cd. de México, México

9,10,18-trihydroxystearate (Kolattukudy 1980; Fernández et al. 2016).

Pathogenic microorganisms use enzymes such as lipases and cutinases to facilitate their penetration through the plant cuticle (Hynes et al. 2006; Kolattukudy 1985; Voigt et al. 2005). Both types of enzymes are carboxyl ester hydrolases (CEH), classified in the CAZy database (<http://www.cazy.org>) as part of the carbohydrate esterase families 3 and 5, but their underlying mechanisms remain poorly understood. It has been suggested that secreted cutinases and lipases cleave the plant polyester and the released cutin monomers can induce the expression of cutinase genes, stimulating fungal differentiation, e.g., conidial germination or appressorium formation (Serrano et al. 2014). Cutinase production is observed in many bacterial and fungal genera (pathogenic and non-pathogenic). A variable number of genes encoding these enzymes have been found, ranging from three to seventeen in a single organism (Skamnioti et al. 2008). Furthermore, there is a high heterogeneity in the regulatory mechanisms involved in their expression even in closely related taxonomic groups. For example, *Fusarium solani* sp. *pisi* has three cutinase genes and the expression of *cut1* is highly induced by cutin monomers and is positively regulated by the transcription regulator factor (TF) CTF1 α . Likewise, *cut2* and *cut3* show basal expression levels and are regulated by CTF1 β (Li et al. 2002). In *Fusarium oxysporum*, the transcription factor CTF is dispensable for virulence but regulates expression of a cutinase and other enzymes involved in fatty acid hydrolysis. In *Alternaria brassicicola*, one TF is involved in virulence and affects the expression of one out of its nine cutinase genes (Srivastava et al. 2012), while in *Aspergillus oryzae*, a Zn finger TF involved in lipid metabolism affects the expression levels of cutinase and other lipolytic enzymes (Garrido et al. 2012). In *Aspergillus nidulans*, the transcriptional factors FarA and FarB are homologous to those reported in *F. solani* and are part of the global regulatory system that controls the utilization of lipids as carbon source, depending on the fatty acid chain length (Hynes et al. 2006). Although these TFs are widely distributed and have been identified through sequence homology in various fungal species (Hynes et al. 2006), their precise role in the gene regulation of biotechnologically relevant enzymes has not been investigated. Another aspect largely overlooked is that the use of complex lipidic substrates, such as cutin, or even olive oil (Castro-Ochoa et al. 2012) may be regulated by the carbon catabolite repression (CCR) system. This is a complex regulatory process which depends not only on the presence of the CreA regulatory elements (Sánchez and Demain 2002; Ries et al. 2016), but also on the availability of the carbon source, which may act as a strong, intermediate, or de-repressor of the CCR (Mogensen et al. 2006). Carbon regulation is crucial to the microbial adaptation to the environment by affecting the physiology, virulence, and pathogenicity as well as the cell-cell communication (Adnan et al. 2018).

The *A. nidulans* genome encodes four cutinase genes (Galagan et al. 2005). The phylogenetic relationships among these genes and their relationship to other fungal or bacterial cutinases have been reported elsewhere (Castro-Ochoa et al. 2012; Skamnioti et al. 2008). However, as only one cutinase (ANCUT2) has been fully characterized (Castro-Ochoa et al. 2012; Bermúdez-García et al. 2017), the action of the other three enzymes on cutin degradation has been unveiled. Besides, whether they are expressed simultaneously or sequentially and if they constitute a system required for cutin degradation are all unanswered questions. Furthermore, there is no information currently available concerning the action mechanism of each cutinase or the precise regulatory factors involved in their expression. Induction by some nutritional factors like the plant polyester suberin has been reported (Martins et al. 2014). Also, a thermoalkaline cutinase (ANCUT2), producing methyl esters as biodiesel precursors (encoded by the AN7541 gene), was found in supernatants of cultures grown in media with olive oil (Castro-Ochoa et al. 2012; Bermúdez-García et al. 2017). To the best of our knowledge, the differential expression of the remaining three cutinase genes *ancut1*, *ancut3*, and *ancut4*, encoded by AN5309, AN7180, and AN10346, respectively, has not been reported to date.

In the present work, the cutinase genes regulation was studied with two approaches: the effect of nutrients that could act as inducers or repressors, and the effect of TFs detected by *in silico* analysis of the regulatory regions of each gene. For this purpose, the expression levels of each cutinase gene were assayed in a wild-type strains and mutants deleted in the TF genes *farA*, *farB*, and *napA*. Finally, the role of each cutinase on cutin degradation was studied. In our results, the cutinolytic activity of the enzymes encoded by all four genes was detected, leading to understanding the physiological role of each cutinase on cutin degradation and showing how *A. nidulans* can express cutinases differentially, depending on the nutritional/growth conditions.

Materials and methods

Microorganism and growth conditions

All the strains used in this work were obtained by sexual crosses of strains derived from the original Glasgow strain FGSC A4. *Aspergillus nidulans* PW1 (*biA1*, *argB2*, *methG1*, *veA1*), a non-pathogenic arginine auxotroph (FGSC A1048) (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, MO), was used in this study as the wild-type strain. The *A. nidulans* mutants $\Delta farA$ (CFQ H 217) and $\Delta farB$ (CFQ H 218), affected in lipid transcription factors, and the stress sensitive strain *A. nidulans* $\Delta napA$ (CFQ H 216) were used to study the effect of TF with comparison purposes (Hynes et al. 2006;

Mendoza-Martinez et al. 2017) and are deposited with the Culture Collection of the Chemistry Faculty, UNAM, México (CFQ).

A basal medium was prepared as described by Käfer (1977) with pH adjusted to 6.5. For AN Δ farA, AN Δ farB, and AN Δ napA mutants cultivation, a vitamin stock was spiked as reported by Hynes et al. (2006). The basal medium contained 0.5% (w/v) glucose as carbon source, which in some conditions was replaced either by lipidic sources such as cutin, olive oil, 16-hydroxyhexadecanoate, propyl ricinoleate, triacetin, or tristearate, or non-lipidic ones including 1% glucose, starch and pectin, evaluated as inducers or repressors. All reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A medium lacking an inducer and repressor was formulated with proteose peptone as a carbon source (Difco, Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany). Finally, to achieve oxidative stress conditions, 0.1 mM H₂O₂ was added to the cutin containing medium, according to Lee et al. (2010), who demonstrated that the expression of a cutinase from *Monilinia fructicola* was enhanced using 0.1–0.5 mM H₂O₂.

Fungal spores were produced on minimal nitrate agar plates; then the spores were washed with 0.1% (v/v) Tween 80 (Sigma Aldrich, St Louis MO, USA) solution, collected in sterile water and stored at 4 °C as previously described (Peña-Montes et al. 2008). A conidia stock containing 10⁶ spores per milliliter was used to inoculate the growth media (50 mL); cultures were incubated for 24 h at 37 °C, under orbital agitation (300 rpm). Mycelia were harvested by filtration through Whatman paper no.1 (Sigma Aldrich, St Louis MO, USA), washed with sterile water and disrupted immediately by grinding with a pestle.

RNA isolation and cDNA synthesis

RNA was extracted using TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and precipitated with isopropyl alcohol and ethanol (Merck, México City, México). RNA integrity was verified electrophoretically: 2 μ g was observed in 1.5% agarose gel containing 2.2 M formaldehyde (Merck, México City, México), and its purity was determined by the 260/280 nm ratio. RNA concentration was measured spectrophotometrically using a Take3 plate in an Epoch spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA).

DNA digestion of 1 mg total RNA was carried out with DNase I amplification grade (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 15 min at room temperature. DNase was inactivated by adding 1 mL of 25 mM EDTA to the reaction mixture followed by heating (65 °C, 10 min). Immediately afterwards, reverse transcription was performed with SuperScript II (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and using dT Primers. Each experiment was run using biological triplicates.

Identification of cutinase genes in media with and without inducer by endpoint PCR

Specific primers were used for the amplification of the cutinase genes *ancut1* (AN5309), *ancut2* (AN7541), *ancut3* (AN7180), and *ancut4* (AN10346), and TF genes *farA* (AN7050) and *farB* (AN1425) by endpoint PCR. Primer sequences for cutinase genes are shown in Supplemental Table S1.

Analysis of transcription factors binding sites (TFBS)

The sequences found upstream the structural cutinase genes were analyzed in silico with the PROMO tool using version 8.3 of TRANSFACT (Messeguer et al. 2002; Farré et al. 2003) to detect TFBS.

Design and validation of expression assays (qRT-PCR)

Design of primers and probes

The PrimerQuest (IDT, Coralville, IA, USA) software was used for the design of qRT-PCR primers and probes with the following specifications: i) for primers—product size 75–150 pb, primer size 17–30 pb, GC 35–65%, Tm 59–65 °C; ii) for probes—probe size 20–30 pb, GC 40–60%, Tm 64–72 °C. Complete sequences of endpoint PCR products were used as templates for the design of primers and probes. Primer or probe sequences were selected to be complementary to an exon-exon junction, to ensure amplification from the cDNA template and not from genomic DNA. The efficiency of primers and probes from qPCR was tested for each gene using serial dilution curves (500–0.5 ng). Sequences of all genes used in this work were obtained from *Aspergillus* Genome Database (AspGD); the primers used are shown in Supplemental Table S2.

qPCR conditions and analysis

Real-time PCR was performed in the 7500 Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The qPCR assays were run following the default amplification protocol (50 °C for 2 min, 90 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min). In all experiments, appropriate negative controls containing no cDNA template were amplified to detect potential cross-contamination. Each experiment used three biological replicates, each with three technical replicates. Data were normalized according to the Pfaffl modification of the Double Delta formula (Pfaffl 2001) and using the selected endogenous control. Minimal media (glucose 0.5%) were used as the control condition for all assays. Real-time PCR was performed as 1 uniplex and 2 duplex assays, using each set of primers and

probe for the genes under investigation (refer to Supplemental Table S3 for the final concentrations of primers and probes). For the duplex assays, the fluorophores chosen were FAM, Cy3, and Cy5. Efficiency curves were drawn for each gene in the multiplex and uniplex assays. The results obtained were analyzed using the Applied Biosystems 7300–7500 SDS Software (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and the expression level was calculated using equation 1:

$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_t \text{ target}(\text{control-sample})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta C_t \text{ ref}(\text{control-sample})}} \quad (1)$$

where E_{target} and E_{ref} were the efficiencies obtained for each gene in the study and the endogenous gene, respectively, and ΔC_t was the difference between the C_t achieved in the control condition and the C_t achieved in the different media. The data reported here are the average of three separate experiments run in triplicate. In the “Results” section, data are plotted as $\log(R)$, where zero values mean no change in expression vs. control; positive values indicate an increased expression and negative values point to downregulation.

Reference gene selection

The genes encoding β -tubulin (*tubC*) and ubiquitin (*ubq1*) (AN6838 and AN4872, respectively) were selected as suitable reference genes for the qPCR analyses according to the literature (Semighini et al. 2002; Noventa-Jordao et al. 2000). Efficiency curves were drawn for each gene to optimize amplification and both genes yielded similar amplification efficiencies (ca. 90–95%). qPCR assays were carried out using the cDNA obtained from mycelia grown in different media as a template. The C_t s for both reference genes were analyzed statistically to test for significant differences between conditions using one-way ANOVA with a 95% significance. Statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). The gene *ubq1* was used in subsequent analyses as its C_t showed less variability under different growth conditions.

The next step was the optimization of the conditions to perform two multiplex and one uniplex assays for analyzing the expression levels of genes *ancut1*, *ancut2*, *ancut3*, and *ancut4*. The genes *ancut1* and *ubq1* were detected in the first assay and *ancut3*, and *ancut4* in the second one. For its part, *ancut2* was analyzed in a uniplex assay. To define the appropriate concentrations of each set of primers, amplification curves were constructed using successive dilutions of cDNA ranging from 500 to 0.5 ng as a template. The optimal concentrations of primers and probes (i.e., 90–110% efficiency) are listed in Supplemental Table S3.

Enzymatic assays

Quantification of carboxylesterase activity

Carboxylesterase activity was quantified by measuring, in a microtiter test at 410 nm, the conversion of the substrate *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) to *p*-nitrophenol (*p*-NP): 170 μL of 50 mM phosphate buffer pH 7.2 + 20 μL of 1 mM *p*-NPA in ethanol + 10 μL of enzyme extract. In the negative (abiotic) control, the enzyme extract was replaced by the buffer. Each enzymatic assay was performed in triplicate. The yield of the reaction was measured at 1-min intervals over 10 min. A programmed protocol in the software Gen5 1.10 provided with the Epoch spectrophotometer (BioTeK, Winooski, VT, USA) was used. One activity unit was defined as the amount of enzyme required to convert 1 μmol *p*-NPA to *p*-NP per minute under the specified conditions. A calibration curve correlating optical density with *p*-NP concentration was used to estimate the formation of *p*-NP. The standard curve was prepared in ethanol with *p*-NP concentrations ranging from 25–200 μmol , and a molar extinction coefficient of 4.900 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ was obtained.

SDS-PAGE and zymograms

Proteins were recovered from the supernatant fraction of fungal cultures using Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Protein concentration was determined using the Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions for the microplate format. Bovine serum albumin was used as the protein standard (Bradford 1976), at 595 nm, using the protocol provided with the Gen5 1.10 spectrophotometer software (BioTek, Winooski, VT, USA).

SDS-PAGE was carried out using 14% T acrylamide gels, as previously described (Laemmli 1970). The molecular mass of proteins was determined by comparing their mobility relative to that of a low-range protein marker containing a mixture of six proteins ranging in size from 14 to 97 kDa (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA). Samples (50 μg per lane), diluted in Laemmli 4 \times sample buffer devoid of β -mercaptoethanol, were not heated. As controls, the electrophoretic protein profiles were also visualized with either silver or Coomassie blue, documented using the Gel Doc imaging system and analyzed with the ImageLab 4.0 software (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) (data not shown). After the electrophoretic separation, esterase activity against α -naphthyl acetate was detected using zymography (Castro-Ochoa et al. 2012); activity is evidenced by the formation of dark red bands in the gel.

Cutin isolation and characterization

Golden Delicious apple cutin was prepared as described by Walton and Kolattukudy (1972). The chemical composition of cutin was determined spectrometrically using ATR-FTIR. Spectral measurements were recorded on a Brüker IFS66/S FTIR spectrometer (Brüker Daltonics, Billerica, MA, USA) using a single reflection ATR cell (DuraDisk, fitted with a diamond crystal). Data were recorded at room temperature within the range of 4000–600 cm^{-1} by accumulating 258 scans with a 4 cm^{-1} resolution. Five spectrum replicates of each sample were recorded to evaluate reproducibility (OPUS v6.5, Bruker, Billerica, MA, USA) (Supplemental material Fig. S1).

Analysis of the degradation products generated by each cutinase

Supernatants from media containing only one of the studied cutinases as the main enzyme were incubated with 500 mg cutin as described previously (Castro-Ochoa et al. 2012). The soluble products of the enzymatic hydrolysis of cutin were obtained from filtrates using a hexane:ethyl acetate extraction. Negative controls, i.e., non-inoculated cutin media incubated under the same conditions as the enzymatic reactions, were also tested. All the organic extracts were dried under soft vacuum, resuspended in methanol, and analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray-high resolution mass spectrometry-mass spectrometry (UHPLC-ESI-HRMS/MS) using an Agilent 6560 Ion Mobility Q-TOF LC/MS system (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) fitted with an electrospray ionization source (ESI-II). Chromatographic separation was carried out in an UHPLC Agilent 1260 Infinity II LC system (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) system using an Agilent Technologies column (150 × 2.1 mm, 2.7 μm particle size) from Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA). The mobile phase at 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate, consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B), sets as follows: 10% B for 1 minute, followed by a linear gradient of 10–95% B over 4.7 min, 1.3 min to reach 100% B, 3 min at 100% B, 0.5 min to return to the initial conditions, and 5.5 min to re-equilibrate the column. ESI-II was operated in the positive ionization mode. Nitrogen was used as sheath gas, sweep gas, and auxiliary gas at flow rates of 10 a.u. (arbitrary units) in all cases. Capillary temperature and electrospray voltage were set at 300 °C and –2.5 kV, respectively. An S-Lens RF level of 50 V was used. The HRMS instrument was operated in full MS scan with m/z ranging from 100 to 1700. The mass resolution was tuned to 70,000 full-width half maximum (FWHM) at m/z 200,

with an automatic gain control (AGC) target (the number of ions to fill C-Trap) of 5.0E5 and a maximum injection time (IT) of 200 ms. The full MS scan was followed by a data-dependent scan operated in the All Ion Fragmentation (AIF) mode with a 30-eV fragmentation energy applied to the high-energy collision dissociation (HCD) cell. At this stage, the mass resolution was set at 17,500 FWHM at m/z 200, AGC target at 5.0E5, maximum IT at 200 ms, with a scan range from m/z 100 to 1700. MS data were processed with the MassHunter™ 2.0 software (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) by applying the METLIN Lipids database list. Several parameters, such as retention time, accurate mass errors, and isotopic pattern matches, were used to confirm the identity of compounds. When available, standards were also analyzed by UHPLC-ESI-MS for further confirmation of identity.

Results

Differential expression of the cutinolytic system induced by lipidic substrates

The sequences of the four cutinase genes and their encoded proteins in the *A. nidulans* genome, obtained from the AspGD, were analyzed. A high homology (60%) was found between the protein sequences encoded by genes AN5309 (*ancut1*) and AN4571 (*ancut2*), while AN10346 (*ancut4*) had the lowest.

The effect of lipidic and non-lipidic carbon sources on the expression levels of *ancut1*, *ancut2*, and *ancut3* was measured by qRT-PCR in *A. nidulans* grown in media containing different carbon sources. The expression of *ancut4* was not detected under any of these conditions. As a negative control, cultures were incubated in 0.5% glucose, in the absence of cutin, a condition where no cutinase activity was previously detected (Castro-Ochoa et al. 2012).

The highest expression of the cutinase genes, especially *ancut1* (ca. A 10,000-fold increase), was observed when the fungus was grown in cutin-containing media (Fig. 1a). The presence of lipidic substrates, either carrying long carbon chains ($\geq \text{C}16$) or triglycerides containing short and long aliphatic carbon chains, resulted in 10- to 100-fold increase in the expression of *ancut1*. In contrast, the *ancut2* expression levels underwent upregulation in the presence of either cutin or olive oil (2 to 8-fold increase) but were virtually unaltered by either 16-hydroxyhexadecanoate or propyl ricinolate, considered synthetic cutin monomers nor by any of the triglycerides tested herein. Finally, *ancut3* expression levels were not significantly altered by any of the lipidic carbon sources used in this assay.

Non-lipidic carbon sources, such as 1% glucose, strongly repressed the expression of *ancut1* and *ancut2* (Fig. 1b).

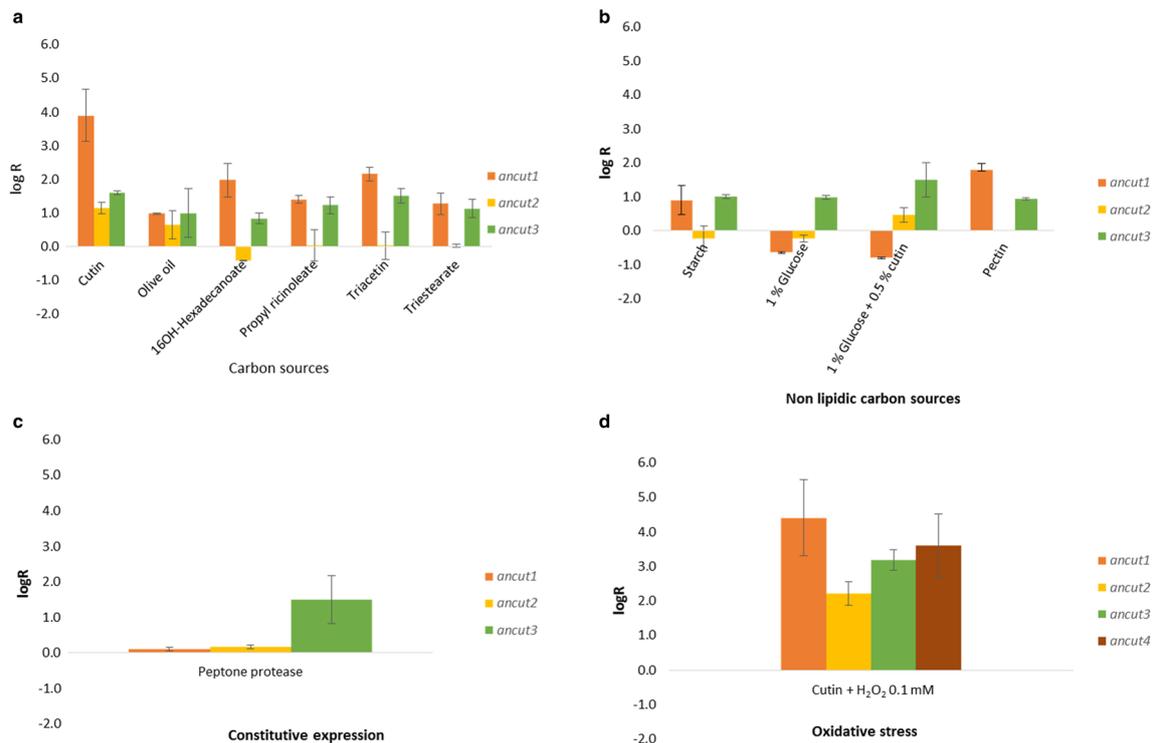


Fig. 1 Expression levels of the cutinase genes *ancut1*, *ancut2*, and *ancut3*, relative to the expression of the reference endogenous gene selected, when *A. nidulans* was grown for 24 h in different conditions: lipidic carbon sources as possible inducers (a), non-lipidic carbon sources

as possible repressors (b), under constitutive expression conditions (c), and under oxidative stress conditions (d). logR is the average expression by qRT-PCR of three biological replicates, each analyzed in three technical replicates

However, this sugar had virtually no effect on the expression levels of *ancut3*. In addition, when cutin was added to the 1% glucose medium, *ancut1* expression levels were extremely repressed (ca. three orders of magnitude), and the repression of this gene was more intense relative to that shown by *ancut2*. Pectin and starch caused a slight repression of *ancut2* (ca. 0.5 times), but no significant response was observed for *ancut1*. A constitutive expression of *ancut3* was suggested as the enzyme levels were affected neither by inducer nor repressors. This assumption was corroborated by measuring *ancut3* in cells grown in a medium lacking both inducers and repressors (Fig. 1c).

Detection of *ancut4* was possible when cutin was used as a carbon source and H₂O₂ was added to generate oxidative stress, as described in the “Materials and methods” section. Under these conditions, the expression of *ancut4* was increased almost 4000-fold (Fig. 1d).

An in silico analysis was performed to identify the putative regulatory sequences present upstream of each gene. The recognized sites by FarA and FarB were identified in all cases, except for *ancut4*. In this last case, sequences responding to transcriptional factors involved in the oxidative stress such as NapA were detected (Mendoza-Martinez et al. 2017). Additionally, recognition sites for CreA were identified to corroborate the CCR effect (Table 1).

Differential expression of cutinases in mutants affected in the transcription factors

To explore whether the constitutive or inducible expression of the cutinase genes was regulated by the transcriptional factors suggested by in silico analysis, FarA or FarB (involved in lipid metabolism), or NapA (which regulates the oxidative stress response), the expression of the four *ancut* genes was analyzed in *A. nidulans* mutants deleted in each one of the TF genes: ANΔ*farA*, ANΔ*farB*, and ANΔ*napA*. As shown in Fig. 2, the expression of *ancut1* and *ancut2* was repressed in the ANΔ*farA* mutant, even when grown in the presence of cutinase inducers. The *ancut1* expression levels in the ANΔ*farA* mutant showed a three orders of magnitude decrease compared to levels obtained in the wild-type strain PW1 in the presence of cutin. The expression of *ancut3* remained unaltered in the presence of cutin but was repressed when olive oil and glucose were used as carbon sources (Fig. 2a).

In media containing cutin, deletion of *farB* led to the partial repression of *ancut1* and *ancut2*, and total repression of *ancut3*, while in olive oil, only *ancut1* underwent upregulation (Fig. 2b). Under oxidative stress conditions, the mutants lacking the NapA TF expressed *ancut1*, *ancut2*, and *ancut3* while *ancut4* was totally repressed. It

Table 1 Analysis of the transcription factors potential binding sites in the 5' region of the cutinase genes

Sequence motif	TF	Gene	Name	5' region position
CCTGCC/GGCAGG	FarA, FarB	AN5309	<i>ancut1</i>	-222, -370, -496
		AN7541	<i>ancut2</i>	-245, -389, -640
		AN7180	<i>ancut3</i>	-212, -629
		AN10451	<i>ancut4</i>	NI
CCGGGG	CreA	AN5309	<i>ancut1</i>	-963, -557, -526
		AN7541	<i>ancut2</i>	-390, -329
		AN7180	<i>ancut3</i>	-970, -750
		AN10451	<i>ancut4</i>	-606
GGAATTGGGGCATTGG	NapA/NF-Y1	AN10451	<i>ancut4</i>	-28, -124, -238, -370

The analysis was conducted with the PROMO tool using version 8.3 of TRANSFACT (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3 / Messeguier et al. 2002)

NI not identified

must be noted that the expression level of *ancut1* was 100-fold lower in the *ANΔnapA* mutant than in the PW1 strain grown under the same conditions. However, no change in the expression pattern of *ancut2* and *ancut3* was observed (Fig. 2c).

CEH activity in crude extracts and zymograms

The effect of lipidic and non-lipidic carbon sources on esterase activity was assayed. As shown in Fig. 3, the highest esterase activity was achieved when cutin was used as carbon source, followed by those obtained in olive oil and pectin and finally, the other complex carbon sources present in plants, like cutin monomers or starch. The culture media which showed less activity were those where glucose 1% was present.

The cutinase enzymes were visualized by zymogram assays. As seen in Fig. 4, when the PW1 strain was grown in cutin or in its monomer, 16-hydroxyhexadecanoate, the molecular mass of the detected bands matched that of ANCUT1, while no activity was detected in extracts from a glucose-containing medium. In addition, when olive oil was used as

inducer, a different activity band was detected, which matched the molecular mass of ANCUT2. These results were consistent with those previously reported, where ANCUT1 and ANCUT2 were identified by mass spectrometry (Castro-Ochoa et al. 2012). The constitutive expression of ANCUT3 was verified in peptone cultures lacking cutin or any other lipidic source. Finally, when H₂O₂ was added to cutin media, ANCUT4 activity was detected (Fig. 4). Both ANCUT3 and ANCUT4 were identified by mass spectrometry as shown in the Supplemental Table S4. In pectin-containing medium, a high molecular weight band with esterase activity was detected, but it does not correspond to any of the four cutinases encoded by *A. nidulans*.

Cutinase activities and identification of the cutin degradation products

The ability of fungal cultures to degrade cutin was assayed by incubating the *A. nidulans* mycelium with cutin. The AT-FTIR spectra shown in Supplemental Fig. S1 indicate that cutin was degraded into several products.

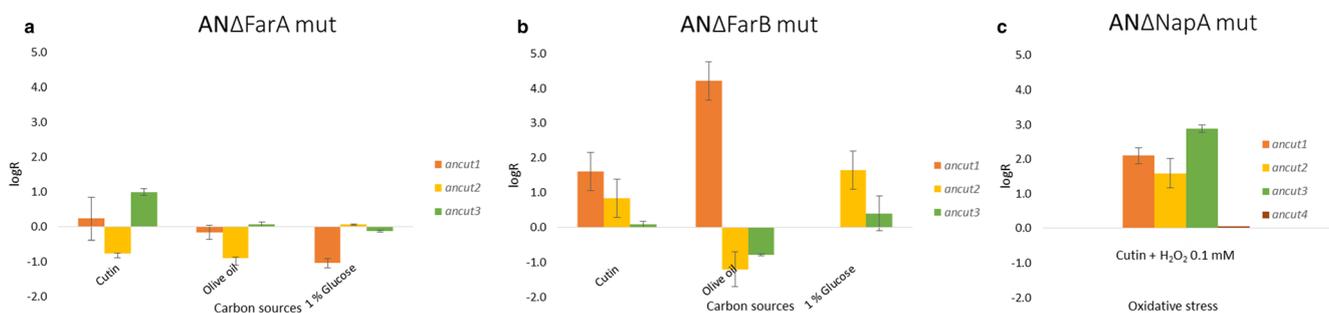


Fig. 2 Expression levels of the *A. nidulans* cutinase genes *ancut1*, *ancut2*, and *ancut3* in the *ANΔfarA* (a), *ANΔfarB* (b), and *ANΔnapA* (c) mutants relative to the expression of the endogenous gene selected. The Far mutants cDNA was obtained from *A. nidulans* strains grown in media supplemented with cutin or olive oil (inducers), or 1% glucose

(repressor). The NapA mutants cDNA was obtained from *A. nidulans* strains grown in media supplemented with cutin and induced with 0.1 mM H₂O₂. logR is the average expression by qRT-PCR of three biological replicates, each analyzed in three technical replicates

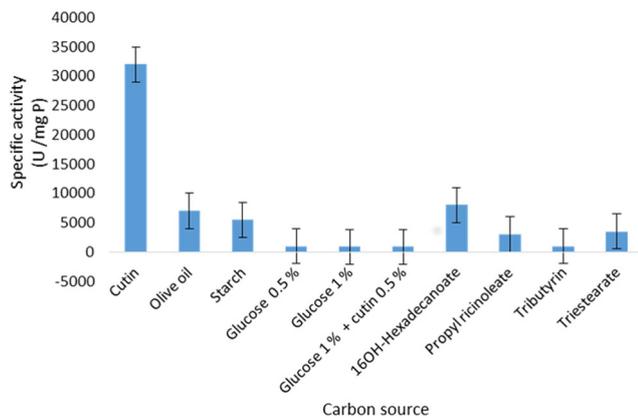
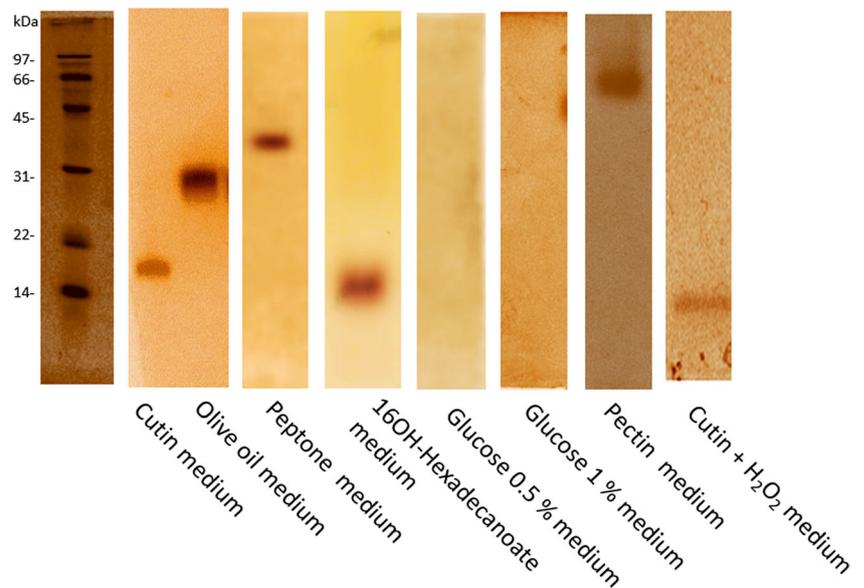


Fig. 3 Specific carboxyl esterase activity of *Aspergillus nidulans* PW1 extracts grown in media supplemented with different carbon sources, either lipidic or non-lipidic. Activity was measured spectrophotometrically using *p*-NPA as substrate. One activity unit is defined as the amount of enzyme (in mg) necessary to obtain 1 mmol *p*-NP per time unit

To gain a deeper insight into the role of each cutinase on cutin degradation, extracts from media allowing production of only one cutinase, or at least a preponderant one, were incubated with cutin. The products released were analyzed by U-HPLC-MS-MS. As shown in Table 2, the products yielded by AN CUT1 and AN CUT3 were similar and corresponded to the main reported cutin constituents (Hernández-Velasco et al. 2017). However, the presence of 9,10-dihydroxyhexadecanoic acid in samples incubated with AN CUT1 suggests that the enzyme cleaves the cross-linking bonds, which are formed by the secondary alcohol esters; therefore, AN CUT1 could be considered as an endo cutinase. The products yielded by AN CUT2 and AN CUT4 were abundant in 18-C chains and corresponded to ω fatty acids. However, the achieved degradation levels of AN CUT 4 were lower compared to the other three cutinases.

Fig. 4 Zymograms from cultures of the wild strain (PW1) grown in different carbon sources. Broad Range Molecular Weight Marker was used as a protein size standard. The protein electrophoretic profiles were also visualized with either silver staining or Coomassie blue (data not shown)



Discussion

The variability in the number of cutinases codified by different fungal species has raised questions about the biological significance of these enzymes. The divergent evolution of the encoding genes could lead to more efficient enzymes and to a better adaptation to different niches. If differences appear in the regulatory regions, the possibility of colonizing different environments is enhanced (Skamnioti et al. 2008; Adnan et al. 2018). Furthermore, the biotechnological applications of enzymes with different physicochemical properties would also be different.

These questions were explored in the four cutinases encoded by *A. nidulans*. The analysis of the coding regions indicated that all of them shared both the cut-1 motif (GYSQG), containing the cutinase active serine, and the cut-2 motif that carries the aspartate and histidine residues of the active site (Ettinger et al. 1987). The homology found among the different cutinase genes was consistent with that reported by other authors (Skamnioti et al. 2008; Castro-Ochoa et al. 2012), suggesting evolutionary differentiation.

On the contrary, important differences were found among the regulatory regions. These included the presence of binding sites for different transcription factors that resulted in their expression under different conditions. As expected, most of the genes required cutin to induce their expression but the upregulation levels were different for each gene: *ancut1* underwent a 10,000-fold increase, while *ancut2* underwent just a 10-fold increase and the expression levels of *ancut2* were similar in both cutin and olive oil-supplemented media. This difference in behavior cannot be explained only by differences in the regulatory sequences, as both responded to the presence of FarA, the main regulator of the metabolism of long-chain fatty acids (Hynes et al. 2006). FarA is

Table 2 Cutin degradation products obtained after enzymatic hydrolysis

Enzyme	Compounds	Formula	MW _{detected}	Error*
ANCUT1	Phloionolic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₅	332.2569	1.9700
	7-Keto palmitic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₃	270.2198	1.1000
	9,10-Dihydroxy-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₄	288.231	3.380
	10-Hydroxy-16-oxo-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286.2138	2.1600
	9-Hydroxy-10E-octadecen-12-ynoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.2199	1.2300
ANCUT2	Phloionolic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₅	332.2565	0.5400
	10-Hydroxy-16-oxo-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286.2149	1.8900
	9-Hydroxy-10E-octadecen-12-ynoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.2194	0.2700
ANCUT3	9-Hydroxy-10E-octadecen-12-ynoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.22	1.72
	Phloionolic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₅	332.256	0.900
	7-Keto palmitic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₃	270.2181	4.9900
	10-Hydroxy-16-oxo-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286.2142	0.5600
ANCUT4	9-Hydroxy-10E-octadecen-12-ynoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.2194	0.2500
	Phloionolic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₅	332.2554	2.5100
	9-Hydroxy-10E-octadecen-12-ynoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.2195	0.0700

*Error, absolute value of the deviation between measured mass and theoretical mass of the selected peak in ppm

homologous to a TF that proved to be key in the regulation of *cut1* from *F. solani* (Li et al. 2002). A different behavior was found for *ancut3* expression, as this was constitutively produced, while *ancut4* was induced by cutin but only under oxidative stress conditions.

The overall behavior in the presence of non-lipidic carbon sources was consistent with the CCR mechanism proposed for cellulases in filamentous fungi (Gutiérrez-Rojas et al. 2015). Our results evidenced that either glucose or starch strongly represses expression of *ancut1* and *ancut2*, while pectin had a stronger repressive effect only on *ancut2*. On the contrary, non-lipidic carbon sources did not affect *ancut3* expression.

An explanation for the different responses to inducers may be found in the experiments performed with the mutants deleted in the TFs. In the mutants AN Δ *farA* and AN Δ *farB*, cutinase gene expression decreased in media supplemented with cutin, while no cutinase activity was observed in the respective zymograms. Similar to previous studies, the AN Δ *farA* mutant failed to grow in media containing the long-chain carbon source 16-hydroxyhexadecanoate (Hynes et al. 2006). The expression of *ancut1* and *ancut2* decreased up to 100-fold in AN Δ *farA* cultures grown in cutin media while the expression levels of *ancut3* were maintained, meaning that FarA did not influence the expression of *ancut3* when cutin was present. However, when olive oil, rich in long-chain fatty acids, was used as a carbon source, the expression of all three cutinase genes was diminished. Even *ancut3* showed a 10-fold decreased expression, which could signify that when the TF FarA is missing, all the lipidic metabolism is affected. When the AN Δ *farA* mutant was grown in 1% glucose medium, the expression levels of *ancut1* and *ancut2* were less

repressed than in the wild-type strain but the expression of *ancut3* was negatively affected perhaps due to other TF involved in CCR regulation. These results reinforce the hypothesis that there is a relationship between the regulation of the cutinolytic system and CCR where FarA plays a key role but the overall mechanism is not yet fully understood (Li et al. 2002) (Fig. 2).

In the case of the AN Δ *farB* mutant, the expression levels of *ancut3* decreased significantly under all tested conditions, suggesting that FarB may regulate the constitutive expression of *ancut3* in *A. nidulans*. Interestingly, in the AN Δ *farB* mutant, the expression levels of *ancut1* and *ancut2* were partially decreased in cutin medium, although *ancut1* levels were increased in olive oil medium. The likely explanation is that in the absence of ANCUT3 in the cutin medium, there were no monomers to induce the expression of *ancut1* or *ancut2*. In the presence of the repressor glucose (1%), the relative expression levels of both cutinase genes were apparently higher in the AN Δ *farB* mutant compared to the wild-type strain (Figs. 1b and 2). This result suggested an attenuation of the CCR mechanisms when the FarB regulator was not expressed.

The in silico analysis of the upstream sequence of *ancut4* (Table 1) revealed binding sites for TF involved in oxidative stress responses, such as AP-1-like elements, transcriptional factors that are activated after the generation of reactive oxygen species, involved in defense and repair in yeast, fungi, and mammals (Toone et al. 2001), as previously reported for other cutinases or cell wall-degrading enzymes (CWDE) (Lee et al. 2010). In previous reports, when the transcriptional factors Yap1/Pap1/NapA were deleted, the fungus lost its ability to resist oxidative stress caused by H₂O₂ leading to downregulation of *ancut4* (Mendoza-Martinez et al. 2017). In the

present study, the expression of *ancut4* was only detected in assays performed under oxidative stress while in the deletion mutant $\Delta napA$, no expression of this cutinase gene was detected. This result confirmed that the expression of this fourth cutinase was related to the response to stress conditions. As mentioned above, *A. nidulans* has a saprophytic way of life. Therefore, the first three cutinase genes would allow the fungus to grow on decayed plant material, while ANCUT4 would be more useful when colonizing living plants, where stress is more likely to occur.

Although the expression of several genes could be detected in different culture media, zymograms from each medium showed only a single activity band; these results were confirmed when proteins were identified by LC-MS (Supplemental Table S4). These results suggested a post-transcriptional or post-translational mechanism that would explain, for example, why ANCUT3 is not observed in the zymograms even if it is expressed constitutively and is not affected by CCR. Probably, this cutinase acts as the trigger of the infection and its activity was only detected before penetration, as previously shown in the oomycete *Phytophthora*

capsica, which expressed constitutive cutinases only upon host contact (Munoz and Bailey 1998). Some of the post-transcriptional/translational modifications that could lead to the protein inactivation could be phosphorylation or ubiquitination, as observed before for *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira and Sauer 2011). However, more experiments should be performed over ANCUT3 to answer this question.

The fact that a culture condition specific for each cutinase was established allowed an analysis of the cutin degradation pattern. The results indicate that the type of monomers released likely depends on the mechanism of action of each cutinase. ANCUT2 and ANCUT3 release fatty acids typically found in the ends of the molecule, which are involved in the formation of primary esters. As already mentioned, 9,10-dihydroxyhexadecanoic acid is a precursor in the formation of cross-linking bonds, which are inaccessible to most enzymes, making cutin more resistant. The fact that ANCUT1 is the only enzyme of the four cutinases produced by *A. nidulans* that has the ability to release this monomer could explain why it exhibits the highest expression levels in the

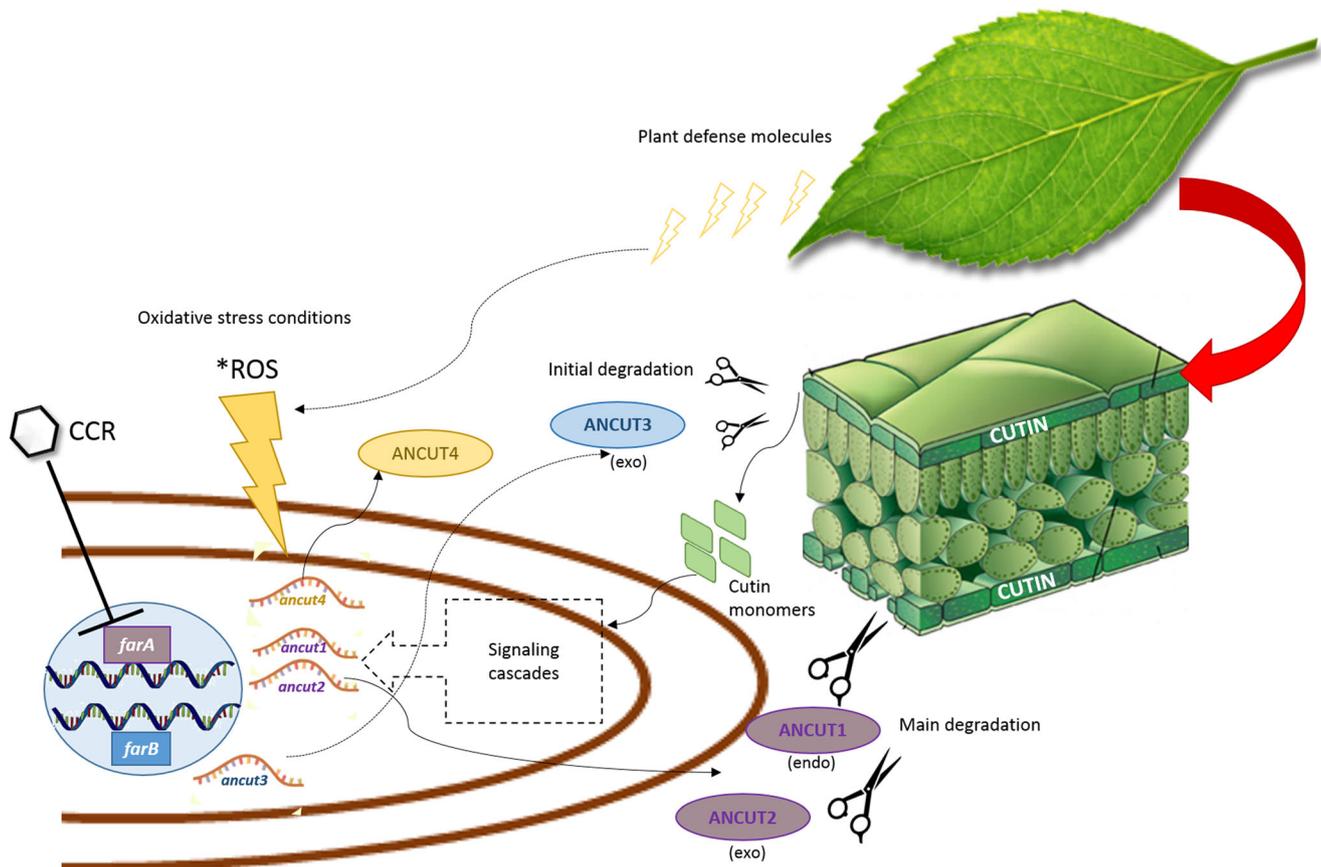


Fig. 5 Proposed regulatory mechanism for the cutinolytic system of *A. nidulans*. Far regulators affect the expression of three cutinase genes. These allow the fungus to detect cutin even in the presence of repressors, hence initiating its degradation, consistent with the increased

expression of *ancut3*. This initial degradation releases cutin monomers that induce *farA* and, consequently, the expression of genes *ancut1* and *ancut2*. The expression of *ancut4* occurs under oxidative stress conditions as a mechanism to avoid plant defenses

presence of cutin. The activity of AN CUT4 was limited to the release of ω fatty acids. It must be stated that even if no pure enzymes were used to obtain these results, the degradation patterns of cutin after treatment with each native cutinase correspond to those obtained with supernatants from recombinant strains expressing each one of the four cutinases independently (data not shown, manuscript in preparation). All the above information led to the proposal of the integrated model of regulation shown in Fig. 5. However, there are no reports explaining the mechanisms of enzymatic cutin degradation, as most of the works have been performed with chemical methods, so it is difficult to compare these results with those obtained from other systems.

The results presented in this work showed that the four cutinase genes encoded by the *A. nidulans* genome are no longer hypothetical cutinases as they were independently expressed and hydrolyzed cutin to yield different products. One of them, AN CUT1, seems to cleave the polymer in an endolytic way, a feature not previously reported. The four genes displayed a different response to global regulators: three of the genes seem to constitute a cutinolytic system which is globally regulated by both CCR and by TF associated with lipid metabolism. The fungus may detect cutin even in the presence of repressors and start its degradation to produce cutin monomers because AN CUT3 has a basal expression, regulated by FarB, and is unaffected by CCR. These monomers induced FarA and later cutin could be degraded either by AN CUT1 or AN CUT2 as illustrated by the mechanistic proposed model shown in Fig. 5. Both genes were induced by different lipidic sources, and their enzymes generated different degradation products. The functional role of *ancut4*, phylogenetically more distant to the other three and whose regulation is performed under stress conditions, requires further analysis. As a final remark, this work offered an initial insight about how structural and regulatory gene divergence led to a comprehensive strategy to colonize cutin-containing niches. This divergence also resulted in cutinases with different biochemical properties that may find various biotechnological uses, such as AN CUT1.

Acknowledgments We want to thank Dr. Xóchitl Pérez Martínez for her valuable comments and the support given to this project, Adriana López Calderón for the production of AN CUT3, Cynthia Bastida for the production and identification of AN CUT4, and Augusto Castro-Rodríguez for his assistance in the synthesis and purification of cutin. Dr. José Correa (IPN) performed the UHPLC MS/MS analysis. We appreciate the contribution of C. Warden and María Elena Sánchez-Salazar in the review of the English manuscript. EBG received a CONACYT scholarship as a student from the Biochemical Sciences graduate program. Funds from CONACYT 153500, PAPIIT IN217414, and PAIP 5000-9095 are also acknowledged. CSP wishes to acknowledge funding from the European Research Council through grant ERC-2014-CoG-647928, and to Fundação para a Ciência e Tecnologia through grant UID/Multi/04551/2013 (Research unit GREEN-it “Bioresources for Sustainability”). I.M. is grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal, for the fellowships SFRH/BPD/110841/2015.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Adnan M, Zheng W, Islam W, Arif M, Akubakar SY, Wang Z, Lu G (2018) Carbon catabolite repression in filamentous fungi. *Int J Mol Sci* 19(1):48–71
- Bermúdez-García EP, Peña-Montes C, Castro-Rodríguez A, González-Canto A, Navarro-Ocaña A, Farrés A (2017) AN CUT2, a thermoalkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and its potential applications. *Appl Biochem Biotechnol* 182(3):1014–1036
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Castro-Ochoa D, Peña-Montes C, González-Canto A, Alva-Gasca A, Esquivel-Bautista R, Navarro-Ocaña A, Farrés A (2012) AN CUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Appl Biochem Biotechnol* 166(5):1275–1290
- Ettinger W, Sk T, Kolattukudy P (1987) Structure of cutinase gene, cDNA and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. *Biochemistry* 26(24):7883–7892
- Farré D, Roset R, Huerta M, Adsuara JE, Ll R, Albà MM, Messeguer X (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31(13):3651–3653
- Fernández V, Guzmán-Delgado P, Graça J, Santos S, Gil L (2016) Cuticle structure in relation to chemical composition: re-assessing the prevailing model. *Front Plant Sci* 7:427
- Galagan J, Calvo SE, Cuomo C, Ma L-J, Wortman JR, Batzoglou S, Lee S-I, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scaccocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D’Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438(7071):1105–1115
- Garrido SM, Kitamoto N, Watanabe A, Shintani T, Gomi K (2012) Functional analysis of FarA transcription factor in the regulation of the genes encoding lipolytic enzymes and hydrophobic surface binding protein for the degradation of biodegradable plastics in *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng* 113(5):549–555
- Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Montoya D (2015) Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: classical cases and new models. *Rev Iberoam Micol* 32:1–12
- Hernández-Velasco BL, Arrieta-Baez D, Cortez-Sotelo PI, Méndez-Méndez JV, Berdeja-Martínez BM (2017) Comparative studies of cutins from lime (*Citrus aurantifolia*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) after TFA hydrolysis. *Phytochemistry* 144:78–86
- Hynes MJ, Murray SL, Duncan A, Khew GS, Davis MA (2006) Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 5(5):794–805

- Käfer E (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and chromosomal aberrations. *Adv Genet* 19:33–131
- Kolattukudy PE (1980) Cutin, suberin, and waxes. In: Stumpf PK (ed) *The biochemistry of plants, 4: Lipids: structure and function*. Academic Press, NY, pp 571–645
- Kolattukudy PE (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 23(1):223–250
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lee MH, Chiu CM, Roubtsova T, Chou CM, Bostock RM (2010) Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, *MfCUT1*, increases virulence of the brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus* spp. *Mol Plant-Microbe Interact* 23(2):176–186
- Li D, Sirakova T, Rogers L, Ettinger WF, Kolattukudy PE (2002) Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*). *J Biol Chem* 277(10):7905–7912
- Martínez Rocha AL, Pietro A, Ruiz-Roldán C, Roncero MIG (2008) Ctf1, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum* is dispensable for virulence. *Mol Plant Pathol* 9(3):293–304
- Martins I, Garcia H, Varela A, Núñez O, Planchon S, Galceran MT, Silva-Pereira C (2014) Investigating *Aspergillus nidulans* secretome during colonization of cork cell walls. *J Proteome* 98:75–88
- Mendoza-Martínez AE, Lara-Rojas F, Sánchez O, Aguirre J (2017) NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* 8:516
- Messeguer X, Escudero R, Farré D, Nuñez O, Martínez J, Albà MM (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18(2):333–334
- Mogensen J, Nielsen HB, Hofmann G, Nielsen J (2006) Transcription analysis using high-density microarrays. *Fungal Genet Biol* 43(8):593–603
- Munoz CI, Bailey AM (1998) A cutinase-encoding gene from *Phytophthora capsici* isolated by differential-display RT-PCR. *Curr Genet* 33:225–230
- Noventa-Jordao MA, do Nascimento AM, Goldman MH, Terenzi HF, Goldman GH (2000) Molecular characterization of ubiquitin genes from *Aspergillus nidulans*: mRNA expression on different stress and growth conditions. *Biochim Biophys Acta* 1490:237–244
- Oliveira AP, Sauer U (2011) The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS Yeast Res* 12:104–117
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa LD, Farrés A (2008) Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(5):603–612
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
- Ray AK, Stark RE (1998) Isolation and molecular structure of an oligomer produced enzymatically from the cuticle of lime fruit. *Phytochemistry* 48(8):1313–1320
- Ries LN, Beattie SR, Espeso EA, Cramer RA, Goldman GH (2016) Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 203(1):335–352
- Sánchez S, Demain AL (2002) Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb Tech* 31(7):895–906
- Semighini CP, Marins M, Goldman MHS, Goldman GH (2002) Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 68(3):1351–1357
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux JP (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. *Front Plant Sci* 5:274
- Skamnioti P, Furlong RF, Gurr SJ (2008) Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. *New Phytol* 180(3):711–721
- Srivastava A, Ohm RA, Oxiles L, Brooks F, Lawrence CB, Grigoriev IV, Cho Y (2012) A zinc-finger-family transcription factor, *AbVf19*, is required for the induction of a gene subset important for virulence in *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* 25(4):443–452
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant physiology*. Freeman, New York, pp 320–332
- Toone WM, Morgan BA, Jones N (2001) Redox control on AP-1 like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 20(19):2336–2346
- Voigt CA, Schäfer W, Salomon S (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J* 42(3):364–375
- Walton TJ, Kolattukudy PE (1972) Determination of the structures of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochem* 11(10):1885–1896

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Supplemental material

Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation

Eva Bermúdez-García^a, Carolina Peña-Montes^b, Isabel Martins^c, Joana Pais^c, Cristina Silva Pereira^c, Sergio Sánchez^d and Amelia Farrés^a#

^aDepartamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cd. de México, 04510, México.

^bTecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Veracruz, Ver. 91897, México

^cInstituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA), Oerias, Portugal.

^dInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cd. de México, 04510, México.

AMELIA FARRÉS

farres@unam.mx

Tel and fax + 52 55 56 22 53 48

Table S1. End –point PCR primers used to amplify cutinase genes

Gene	Name	Sequence	Lenght	Tm
<i>ancut1</i>	Cut1fwd	gaattc-TG-AATCCAATCCGTCTCGATCA	28	60.1
	Cut1rev	tctaga-GC-AAGCTTCCCAACAAGAAAGTCA	32	57.5
<i>ancut2</i>	Cut2fwd	gaattc-TG-AGTCCTTTGAATCTTGACGACG	29	62.9
	Cut2rev	tctaga-GC-GTTACCAAGGCCAGAGAACCA	31	66.6
<i>ancut3</i>	Cut3fwd	gaattc-TT-ACGCCCTCCCCAGC	25	59.8
	Cut3rev	tctaga-GC-AACTGAGACCTGGCTTGCC	29	65.3
<i>ancut4</i>	Cut4fwd	gaattc-TT-ACTGGGGTAGCCTATTCGGC	30	64.2
	Cut4rev	tctaga-GC-CAGTCCAGCAGCGCTAACA	27	65.3

Table S2: Primers and probes sequences used for amplification of cutinases and reference genes by qRT-PCR

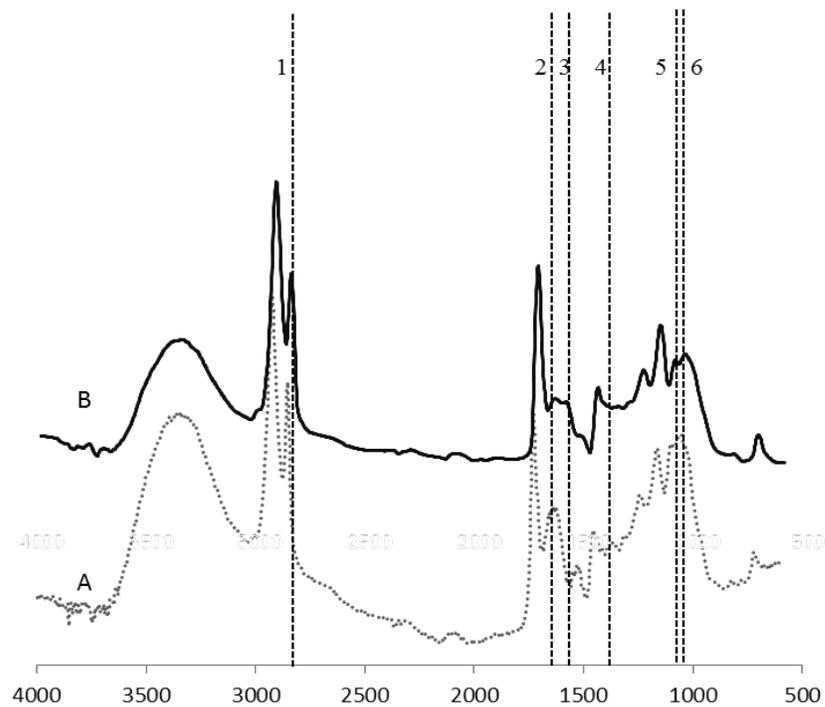
Gene	Name	Sequence	Lenght	Tm
<i>ancut1</i>	Cut1fwd	5' TCGATCAACGCCAGATCAC 3'	19	62
	Cut1rev	5' GAGCCACGAGCGAAGATAAA 3'	20	62
	Cut1prb	56-FAM-ACGGTTCCT/ZEN/GCCACGATGTCA	21	68
<i>ancut2</i>	Cut2fwd	5' CGAACTGGCTGCCTCTAAG 3'	19	62
	Cut2rev	5' CGCGATCTTGCTTGTATCT 3'	20	62
	Cut2prb	5' FAM/TGGTGGATA/ZEN/CAGTCAAGGAACGGC 3'	24	68
<i>ancut3</i>	Cut3fwd	5' GTA TGA ACT CCA ACG ACC TTG A 3'	22	62
	Cut3rev	5' GAC GAC GAA GCC CAT GTT 3'	18	62
	Cut3prb	5' Cy3/TGA ATG CCA CAG ATT TGC AGT CGC /3' BHQ_2/	24	68
<i>ancut4</i>	Cut4fwd	CTC GTC TTC GCG GTT CAT	18	62
	Cut4rev	GTA CCC ATG TTA CCG ATC TCA G	22	62
	Cut4prb	56-FAM/AGA ACT CAC /ZEN/TTT CAT CTT CGC CCG C/3IABkFQ	25	68
<i>ubq1</i>	Ubqfwd	5' GGGATTAGCTGTGGACTTGTAG 3'	22	62
	Ubqrev	5' AAGAAACCACCGCCATATAGTT 3'	22	62
	Ubqprb	5' Cy5/TGTGTTTCAATGGGAGGTCATGCT 3' BHQ_2/	24	68
<i>tubC</i>	bTubfwd	5' TGG TAA CCA GGT TGG TTC TG 3'	20	62
	bTubrev	5' CGG AGT CGC CAG TGT AAA T 3'	19	62
	bTubprb	5' Cy5/ATG TTC GCC GGA GAT GGT CTG C/3'IA	22	68

Table S3: Final concentration of qRT-PCR primers and probes

Gene	Name	Final Concentration (μ M)	Fluorophore
<i>ancut1</i>	Cut1fwd	0.3	FAM
	Cut1rev	0.3	
	Cut1prb	0.2	
<i>ubq1</i>	Ubqfwd	0.3	Cy5
	Ubqrev	0.3	
	Ubqprb	0.25	
<i>ancut3</i>	Cut3fwd	0.3	Cy3
	Cut3rev	0.3	
	Cut3prb	0.25	
<i>ancut4</i>	Cut4fwd	0.3	FAM
	Cut4rev	0.3	
	Cut4prb	0.2	
<i>ancut2</i>	Cut2fwd	0.3	FAM
	Cut2rev	0.3	
	Cut2prb	0.2	

Table S4. Peptide identification by LC/MS-MS from the bands excised from zymograms of crude extracts of *A. nidulans* PW1 grown in differential cutinases media

Peptides sequence	Protein Accession Numbers	% Coverage	Reference
<ul style="list-style-type: none"> ● IRLDQRQITGNELRDGSCHDVTFFIFARGST ● ELGYLGSTVGPATCNVLK ● KPGQVACQGVAPAYIADLAS ● AVMHAAISTL SSTVQDQIKGVVLFGDTR ● IPNFPTDKTK 	CBF82125.1 (ANCUT1)	56	This work
<ul style="list-style-type: none"> ● ADASLGGVACQGVGPKYTAGLAENALPQG ● TSSAAINEAKELFELAASK ● IAGVVLFGDTRNKQDGGQIK 	ANCUT2	26	Bermúdez-García et al., 2017
<ul style="list-style-type: none"> ● CPDTQIVAGGYSQGSVIDNAIQK ● GSTEIGNMGFVVGPVCSNLK ● GVVLFGFTR ● SVAFIFAR ● VACQGVGGAYTAGLIQNALPANTDSGSIK 	CUTI3_EMENI (ANCUT3)	42	This work
<ul style="list-style-type: none"> ● LSSGQVVGAVTFGDPEK ● GTTEIGNMGTVVGPVK ● SQKPDNIDQFK 	CBF83913 (ANCUT4)	19	This work



Peak number	Wavelength h (cm ⁻¹)	Description	Assignment	Spectrum where changes were observed
1	2854	va(CH ₂) aliphatic stretching	Cutin, waxes	B
2	1728	v(C=O) ester	Cutin	B
3	1641	v(C-O-C) strong acid	Cutin	B
4	1463	δ(CH ₂) scissoring aliphatic bending	Cutin, waxes	B
5	1169	va(C-O-C) ester	Cutin	B
6	1104	vs(C-O-C) ester	Cutin	B

Figure S1. AT-FTIR spectra of cutin after (A) and before (B) incubation with *Aspergillus nidulans* PW1. The assignment of the main peaks having alterations is also shown