



UNIVERSIDAD
MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“Análisis de la expresión de los genes glucosa oxidasa de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var. tubingensis*”

TESIS

Para Obtener el Grado de:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

Presenta:

Nancy Yadira Reyes Mares

Asesor:

Víctor Meza Carmen

Doctor en Ciencias en Biología Experimental

Coasesor:

Irvin Eduardo Jácome Galarza

Doctor en Ciencias Quimicobiológicas

Morelia Mich., Agosto 2013

A mis abuelos Luisa y Francisco

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres, Laura y Gerardo que con un gran esfuerzo han sido un pilar fundamental en este logro, que por su ejemplo, sus consejos, su apoyo incondicional, por la motivación constante que me han brindado, pero sobre todo por su amor he cumplido la meta de terminar una carrera universitaria. Gracias por darme las alas para volar, los amo.

Agradezco a mis hermanos Nelly y Gera que siempre estuvieron ahí apoyándome, y que a pesar de las diferencias de caracteres que existen siempre estamos unidos.

Agradezco a todas mis amigas y amigos por las porras y terapias en esos momentos de depresión, sin sus risas y ánimos todo hubiese sido más difícil.

Agradezco al Dr. Víctor Meza por sus consejos y su apoyo, por darme la oportunidad de realizar una tesis, y sobre todo por brindarme una herramienta más para defenderme en el mundo laboral. Al Dr. Irvin Jácome por permitirme trabajar en su laboratorio.

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, que en sus paredes me he forjado y orgullosamente soy nicolaita, al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán por permitirme hacer uso de sus instalaciones y poder realizar este trabajo de investigación.

Agradezco a ese ser intangible que con su extraña forma de trabajar y a veces incomprensible, hace que todo sea posible, que no importa las veces que caigas, siempre te ayuda a levantarte.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	1
CONTENIDO	2
ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Glucosa oxidasa	10
1.2 Importancia de la glucosa oxidasa	11
1.3 Ácido glucónico	14
1.4 Presencia de glucosa oxidasa en diferentes organismos	14
1.5 Regulación de GOX	15
1.6 <i>Aspergillus niger</i>	19
1.7 Antecedentes directos	19
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	25
4.1 Objetivos específicos	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Microorganismos usados	26

5.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	26
5.3 Obtención de conidias	26
5.4 Aislamiento de DNA plasmídico y purificación de fragmentos de PCR	27
5.5 Aislamiento de DNA genómico	27
5.6 Aislamiento de RNA total	27
5.7 Cuantificación y determinación de integridad del RNA	28
5.8 Electroforesis en geles de agarosa	28
5.9 Búsqueda <i>in silico</i> de los genes <i>gox</i> y diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrolisis	29
5.10 RT- PCR en tiempo real	31
5.11 Amplificación y purificación del gen <i>gox2</i>	31
5.12 Curva estándar para el cálculo del número de copias del gen <i>goxC</i>	32
5.13 Cuantificación del número de copias absolutas del gen <i>goxC</i> en las distintas condiciones de crecimiento	33
5.14 Eficiencia de amplificación para los genes <i>goxC</i>, <i>gox2</i>, β-actina y calmodulina	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Búsqueda <i>in silico</i> de homólogos del gen <i>goxC</i> en el genoma de <i>A. niger</i>	34
6.2 Clonación del gen <i>gox2</i> de la cepa Ed8	41
6.3 Especificidad de las sondas de hidrolisis <i>goxC</i> y <i>gox2</i>	41
6.4 Determinación de la integridad del RNA de las cepas Ed8, 593 de <i>A. niger</i> var. <i>tubingensis</i> y A732 de <i>A. niger</i>	44
6.5 Comprobación de la pureza de las muestras de RNA de <i>A. niger</i>	44

6.6 Curva estándar para la determinación del número de copias del gen <i>goxC</i> <i>A. niger</i>	48
6.7 Cuantificación absoluta del número de copias del gen <i>goxC</i> en las diferentes muestras de RNA de las cepas de <i>A. niger</i>	48
6.8 Expresión relativa de <i>gox2</i> con respecto a β-actina en la cepa A732 de <i>A. niger</i>	54
6.9 Clonación de los promotores del gen <i>gox2</i> de las cepas Ed8, 593 y A732 de <i>A. niger</i>	57
7. DISCUSIÓN	64
8. CONCLUSIONES	65
9. BIBLIOGRAFÍA	66

ABREVIATURAS

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ATP.....	Trifosfato de adenosina
FAD.....	Flavín adenín dinucleótido
GOX.....	Glucosa oxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
NADP.....	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NADPH.....	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducida
O ₂	Oxigeno
PCR.....	Reacción de polimerasa en cadena
var.	Variedad
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
(NH ₄) ² SO ₄	Sulfato de amonio
NaCl.....	Cloruro de sodio
Ct.....	Ciclo de amplificación
PDA.....	Agar papa dextrosa

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Estructura de la enzima glucosa oxidasa	12
Figura 2.- Reacción catalizada por la GOX	13
Figura 3.- Flujo de la información genética	17
Figura 4.- Microfotografía de <i>A. niger</i>	20
Figura 5.- Comparación de los niveles de producción de GOX secretable entre la cepa Ed8 y la cepa de colección A732	22
Figura 6.- Árbol filogenético de proteínas relacionadas con GOXC en el genoma de <i>A. niger</i>	36
Figura 7.- Alineamiento de las proteínas GOXC-4 de <i>A. niger</i>	37
Figura 8.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los cuatro genes <i>gox</i> identificados	39
Figura 9.- Secuencias parciales de los genes <i>goxC</i> y <i>gox2</i>, ubicando los oligonucleótidos directo y reverso usados para la amplificación por PCR	40
Figura 10.- Amplificación de gen <i>gox2</i>. Localización de los oligonucleótidos usados para amplificar por PCR el marco de lectura abierto de <i>gox2</i>	42
Figura 11.- Especificidad de los oligonucleótidos y sondas para los genes <i>goxC</i> y <i>gox2</i>	43
Figura 12.- Integridad del RNA aislado de la cepa A732 de <i>A. niger</i>	46

Figura 13.- Determinación de DNA contaminante en las muestras de RA aislado de las cepas de <i>A. niger</i>	47
Figura 14.- Esquema del plásmido pDSBGOX clonado en el gen <i>goxC</i>	49
Figura 15.- Gráfica de eficiencia de amplificación del gen <i>goxC</i>	50
Figura 16.- Cuantificación absoluta del número de copias del gen <i>goxC</i> en la cepa A732 y Ed8	53
Figura 17. Curvas de eficiencia de amplificación de los genes β-actina y <i>gox2</i>	55
Figura 18.- Expresión relativa del gen <i>gox2</i> respecto al gen de β-actina en la cepa de <i>A.niger</i> A732	56
Figura 19.- Representación esquemática de los promotores de los marcos de lectura de <i>goxC</i> y <i>gox2</i>	60
Figura 20.- Amplificación mediante PCR de la región promotora de los genes <i>goxC</i> y <i>gox2</i> en las cepas Ed8, 593 y A732	61
Figura 21.- Amplificación de los promotores de <i>gox2</i> y <i>goxC</i> en la cepa A732, Ed8 y 593	62
Figura 22.- Análisis <i>in silico</i> de las secuencias promotoras de <i>goxC</i>	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Presencia de glucosa oxidasa y su función en diversos organismos	16
Tabla 2.- Factores que afectan la actividad de glucosa oxidasa	18
Tabla 3.- oligonucleótidos y sondas utilizados en este trabajo	30
Tabla 4.- Secuencias del péptido señal identificado en tres de las cuatro proteínas de GOX identificadas en el genoma de <i>A. niger</i>	38
Tabla 5.- Condiciones de crecimiento de las cepas de <i>A. niger</i>	45
Tabla 6.- Cuantificación absoluta del número de copias del gen <i>goxC</i> de <i>A. niger</i>	52
Tabla 7.- Posibles factores de transcripción que participan en la regulación de la expresión de <i>goxC</i>	58
Tabla 8.- Posibles factores de transcripción que participan en la regulación de la expresión de <i>gox2</i>	59

RESUMEN

La glucosa oxidasa (GOX) es una enzima perteneciente a la familia de las oxidorreductasas, la cual es muy utilizada industrialmente, siendo esta importante para la conservación de alimentos, además de ser un reactivo fundamental en la determinación de glucosa en fluidos biológicos.

Se ha descrito la actividad de GOX secretable en ciertas especies de *Aspergillus* sp. y de *Penicillium* sp. Nuestro grupo de trabajo aisló una cepa ambiental de *Aspergillus niger* var. *tubingensis* denominada Ed8, la cual muestra un nivel de actividad de GOX secretable más alta con respecto a cepas de colección, por lo cual, la cepa Ed8 es de gran interés biotecnológico, debido a la posible capacidad como hiperproductora de la enzima GOX. Además, se clonó y secuenció un gen con actividad de GOX secretable de la cepa Ed8, denominado *goxC*. En una búsqueda exhaustiva de homólogos de *goxC* en el genoma de *A. niger*, se ubicaron otros tres genes con alta identidad por *goxC* en un rango de 26 a 54%, siendo *gox2* el que mostro mayor identidad con *goxC*. El objetivo de nuestro trabajo fue conocer niveles de transcrito tanto el gen *goxC* y *gox2* en la cepa Ed8, así como la comparación de dichos niveles de expresión de ambos genes con cepas de referencia, las cuales fueron crecidas en diferentes concentraciones de glucosa a diferentes tiempos de desarrollo. Se cuantificó la cantidad de transcrito en donde la cepa A732 muestra niveles de expresión mayores a la cepa Ed8, y se observó que la cantidad de transcrito estaba relacionado con la concentración de glucosa y el tiempo. Se clonaron los promotores de los genes *goxC* y *gox2* de la cepa Ed8, 593 y A732 para buscar diferencias y buscar una posible explicación en la regulación de GOX.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4), aislada de *Aspergillus niger* es una flavoproteína dependiente de flavín adenín dinucleótido (FAD) que contiene tres residuos de cisteína y ocho sitios potenciales para N-glicosilación, tiene un peso molecular de 160 kDa, la enzima es un dímero constituido de subunidades idénticas (**Fig. 1**), estas subunidades tiene un peso molecular de alrededor de 80 kDa cada una, el dímero contiene dos moléculas de FAD fuertemente enlazadas una por cada subunidad, que actúan como un portador de electrones durante la catálisis (**Wilson y Turner. 1992**). Esta enzima cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a D-gluconolactona y peróxido de hidrogeno, este último compuesto por acción de la catalasa endógena del organismo es convertido espontáneamente en oxígeno y agua, D-gluconolactona por acción de la enzima lactonasa es hidrolizada y finalmente es convertido en ácido glucónico usando el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (**Fig. 2A**) (**Metosh-Dickey y col 1997.**)

Durante el transcurso de la oxidación de la glucosa a ácido glucónico cada grupo FAD es reducido a FADH₂ y la posterior oxidación de FADH₂ por oxígeno molecular genera 4 α -hydroperoxy FAD (**Fig. 2B**) (**Frederick y col., 1990**).

El centro redox de cada molécula de FAD es un anillo de Isoaloxazina que sufre reducciones reversibles, aceptando bien uno o dos electrones; dicha molécula presenta importantes cambios en su estructura electrónica al reducirse (**Mathews y col., 1999**).

El ácido glucónico producido por la GOX puede entrar a la vía de las pentosas-fosfato para formar ribulosa-5-fosfato, precursor de fructuosa-6-fosfato; este último azúcar es metabolizado en el ciclo del ácido cítrico, permitiéndole a la célula obtener energía y otros metabolitos (**Mathews y col., 1999**). Alternativamente, dentro de la vía de las pentosas-fosfato, la oxidación de la β -D-glucosa a glucono- δ -lactona puede ser catalizada directamente por la glucosa deshidrogenasa y NADP⁺ como cofactor, sufriendo este último la reducción a nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), junto con la formación de protones. El

NADPH es utilizado como poder reductor en reacciones de la cadena respiratoria para la formación de ATP **(Mathews y col., 1999)**.

1.2 Importancia de la glucosa oxidasa

La enzima GOX es muy utilizada a nivel industrial, es un aditivo importante para la conservación de alimentos, una de sus aplicaciones más importantes es en la eliminación de la glucosa del huevo antes de su deshidratación, con objeto de evitar las reacciones de oscurecimiento no enzimático. También se emplea para eliminar el oxígeno que pueden contener las bebidas, los aderezos, entre otros productos, ya que este es el que inicia el deterioro en los alimentos oxidando los lípidos y produciendo cambios en el color y en el sabor del producto **(Wong y col., 2008)**. También se utiliza como un conservador temporal de la leche para su almacenamiento y transporte ya que reduce el crecimiento microbiano por acción del peróxido de hidrógeno que se produce en la oxidación de la glucosa por esta enzima, en experimentos se ha demostrado que la vida útil de la leche se duplica con la presencia de esta enzima **(Marks y col., 2001)**.

La GOX forma parte de los reactivos para la determinación de glucosa en sangre y otros fluidos biológicos (reacción de Trinder). De igual forma, se utiliza la GOX para monitorear los niveles de glucosa en procesos de fermentación en biorreactores, y para controlar la glucosa en el material vegetal en bruto y en productos alimenticios. Cabe señalar que GOX por su actividad antimicrobiana no se limita a los alimentos y se ha utilizado en la pasta dental, lociones, champús, cosméticos, procesamiento de carne, etc. **(Wong y col., 2008)**

Además la GOX es usada ampliamente en la industria textil para remplazar el blanqueo químico ya que está realiza un blanqueamiento menos agresivo con el medio ambiente debido a que las condiciones requeridas en el blanqueo químico son a pH de 10.5 - 11 y temperatura próxima a la ebullición, mientras que el bio-blanqueo puede llevarse a una temperatura más baja y a un pH neutro, esto significa que se puede contar con un ahorro significativo de costos en energía y de tratamiento de efluentes. Investigaciones realizadas hasta ahora han mostrado resultados prometedores en el uso de glucosa oxidasa para producir peróxido de

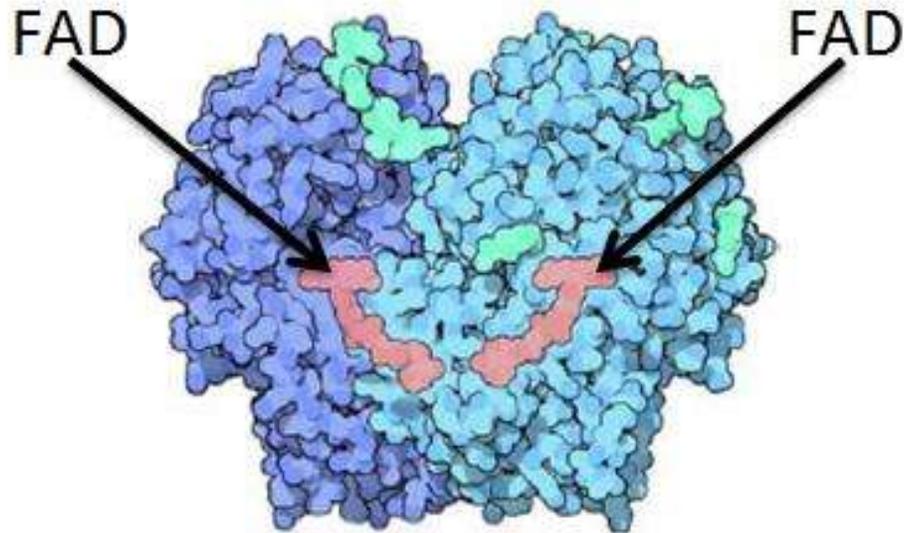


Figura 1. Estructura de la enzima glucosa oxidasa. La GOX mide 1,9 Å, está compuesta de dos subunidades diferenciadas por un color oscuro y otro más claro, y las moléculas de las coenzimas FAD se indican con flechas. Imagen tomada y adaptada de **(Wong y col., 2008)**.

Figura 2.

(A)



(B)

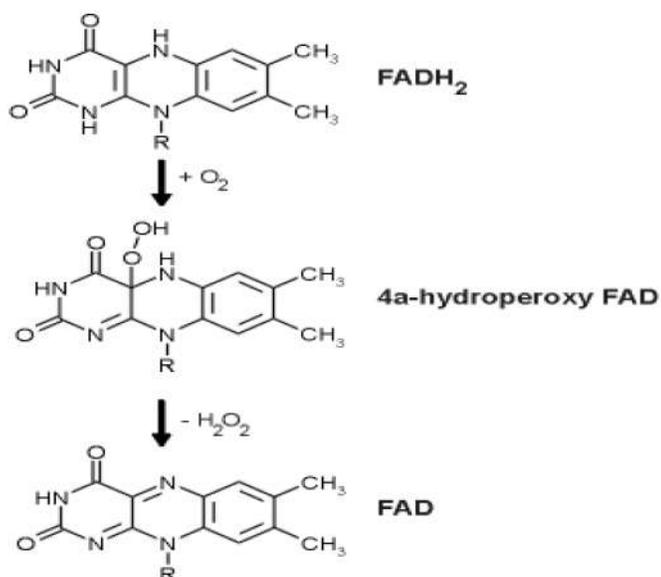


Figura 2. Reaccion catalizada por la GOX. (A) Producción del ácido glucónico a partir de glucosa por la acción de la glucosa oxidasa. **(B)** Mecanismo de oxidación de FADH₂ por el O₂ como aceptor de electrones. El resultado de la reacción es la formación de H₂O₂. (Rodríguez 2011).

hidrógeno en el blanqueo, aunque se observó que el costo de la enzima es demasiado caro para el procesamiento textil (**Hamlyn 2000**). En otras palabras, sería razonable especular que la utilización de la glucosa oxidasa en la industria textil debería ser económicamente viable en el futuro próximo.

1.3 Ácido glucónico

El ácido glucónico que es el producto final de la oxidación de la glucosa también tiene una amplia gama de aplicaciones industriales incluyendo, área textil, en la industria química como blanqueador y limpiador, en la industria alimenticia como acidificante, aditivo, estabilizante de color, antioxidante y agente quelante en pan, alimentos, bebidas, etc. Las sales gluconadas se utilizan en la industria farmacéutica como limpiador de superficies de metal (**Martins y Vitolo, 2007**). La demanda anual de producción de ácido glucónico llega a las 50,000–100,000 toneladas en todo el mundo (**BACAS 2004; EuropaBio and ESAB 2005**).

1.4 Presencia de glucosa oxidasa en diferentes organismos

La GOX no se encuentra en organismos superiores, como los mamíferos, esta es una enzima producida por algunos insectos, bacterias y hongos, en estos últimos, los principales representantes son especies de los géneros *Aspergillus* (**Clarke y col., 2006**) y *Penicillium* sp. (**Mikhailova y col., 2000**). *Penicillium adametzii* es un hongo eficaz para la producción de glucosa oxidasa extracelular, otras especies como *Gliocadium* sp, *Scopulariopsis* sp y *Gonatobotrys* sp también producen glucosa oxidasa y ácido glucónico. Entre las especies de bacterias productoras de GOX se encuentran *Gluconobacter oxydans*, *Zimomonas mobilis*, *Micrococcus* sp, y *Enterobacter* sp, (**Ramachandran y col., 2006**). Aunque la GOX puede ser producida a partir de diversos organismos, los hongos se consideran de mayor interés para la producción de esta enzima a escala industrial, debido a su alta capacidad de producción de GOX (**Pluschkell y col. 1996**).

Se ha descrito la actividad enzimática de la glucosa oxidasa en el medio extracelular. Una explicación a dicha localización es que la función principal de la GOX en los microorganismos que la excretan es actuar como agente

antimicrobiano (**Tabla 1**) a través de la producción de peróxido de hidrógeno lo cual genera ácido glucónico. Otras funciones de la GOX incluyen su participación en la infección de plantas, en la degradación de la lignina, en el descenso de pH del medio extracelular, etc. (**Wong y col., 2008**).

1.5 Regulación de GOX

La información genética reside principalmente en el material nuclear en los eucariontes, sin embargo la expresión de dichos genes están sujetas a múltiples condiciones en su medio ambiente, lo cual finalmente genera una proteína funcional involucrada en un proceso biológico específico. Los microorganismos utilizan su información genética con efectividad para fabricar las cantidades de productos proteicos adecuados bajo una estricta regulación espacio temporal de dicha información. El flujo de la información genética explica los pasos de regulación para tener a una proteína funcional a partir de su gen correspondiente (**Fig. 3**), siendo estos pasos: la regulación transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional, las cuales participan en producir la cantidad y actividad adecuada de una proteína determinada (**Passarge., 2007**).

En el caso específico de la GOX, se han descrito diversos factores en el medio de cultivo en el que se ha desarrollado el organismo, los cuales regulan el nivel de producción de proteína, entre dichos factores se han descrito: la fuente de carbono que puede influir en la velocidad de producción de la biomasa o la producción de metabolitos primarios o secundarios (**Tabla 2**) (**Stanbury y col., 1997**). La presencia de CaCO_3 (**Hatzinikolaou y col., 1996**) es un potente inductor de la actividad de GOX en *A. niger* (**Rogalski y col., 1988**). También se ha descrito que la producción de GOX es favorecida por fuentes de nitrógeno, por ejemplo conduce a un incremento en la actividad de GOX debido al incremento en la producción de biomasa (**Morton and MacMillan, 1954, Rogalski y col., 1988**). Además, la adición de ciertos compuestos orgánicos en el cultivo, como el n-dodecano, el n-hexadecano y el aceite de soja conducen a un aumento de la actividad de GOX intracelular en un 43, 110 y 31%, respectivamente (**Sandip B. y col., 2009**).

Tabla 1. Presencia de glucosa oxidasa y su función en diversos organismos.

Organismo	Ejemplo	Función
Insectos	<p>Miel de abeja (<i>Apis mellifera</i> L.) Secreción salival de la glandula hipofaringea (Ohashi y col. 1999) Santos y col. 2005; Abusara 2006)</p> <p>Larva (<i>Helicoverpa zea</i>) (Eichenseer y col. 1999). <i>Helicoverpa armigera</i>, <i>Helicoverpa assulta</i> (Zong Wang. 2004). Saltamontes (<i>Schistocerca americana</i>) cutícula (Candy 1979) Larva (<i>Spodoptera exigua</i>, <i>Mamestra configurata</i>).</p>	<p>Conservación de la miel.</p> <p>Desinfectar los alimentos ingeridos y la función gastrointestinal, suprimir la defensa de la planta. Antimicrobiano, endurecimiento de la cutícula. Secreción salival de las glándulas vestibulares</p>
Hongos	<p>Talaromyces flavus (Kim y col. 1990; Murray y col. 1997) <i>Pleurotus ostreatus</i> (Shin y col. 1993)</p> <p>Aspergillus niger (Muller 1928; Kriechbaum y col. 1989; Hatzinikolaou y col. 1996) pared celular del micelio (witteveen y col. 1992). Penicillium spp. <i>P. amagasakiense</i>, <i>P. canescens</i>, <i>P. notatum</i>, <i>P. pinophilum</i>, <i>P. funiculosum</i>, <i>P. variable</i>, <i>P. chrysogenum</i>, <i>P. adametzii</i> (Mikhalova y col., 2000) Phanerochaete chrysosporium (Ramasamy y col. 1985) Botrytis cinerea (Liu y col. 1998)</p>	<p>Crecimiento antifúngico, generando H₂O₂ por la degradación de la lignina dependiente de peroxidasa extracelular. Disminuir el pH extracelular.</p> <p>Antibacteriano y antifúngico.</p> <p>Ayuda a la degradación de la lignina. Asistente en las infecciones a las plantas.</p>
Bacterias	<p>Gluconobacter suboxydans. (Guptan y col. 2001)</p>	<p>No se conoce.</p>

Tomada y modificada de (Wong y col., 2008).

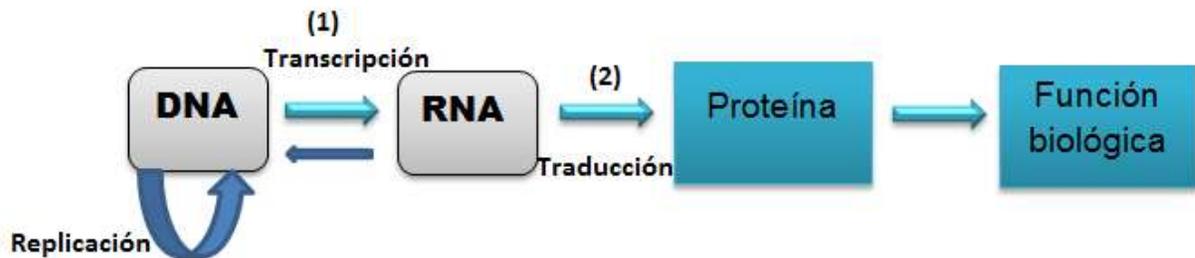


Figura 3. Flujo de la información genética, conocido como el dogma central de la biología molecular, propuesto por Francis Crick en 1958. La regulación de la función de una proteína puede estar dada a diversos niveles: a nivel transcripcional (1); a nivel traduccional (2). Además procesos postranscripcionales y postraduccionales están también implicados en la regulación de la función de una proteína determinada. **(Modificada de Passarge. 2007).**

Tabla 2. Factores que afectan la actividad de glucosa oxidasa

Factor	Efecto sobre la actividad	Causa
Fuente de nitrógeno	Aumenta	No se conoce
CaCO ₃	Aumenta	Posible cambio metabólico de la vía glucolítica
Hidrocarburos	Aumenta	Aumenta la eficiencia de la síntesis de la enzima
pH	Aumenta	No se conoce

(Tomada y modificada de Sandip y col., 2009)

1.6 *Aspergillus niger*

El género *Aspergillus* sp comprende alrededor de 180 especies, son hongos filamentosos, hialinos y ubicuos. Se reproducen asexualmente por conidios. Al igual se reproducen de forma sexual y se ubican dentro de la división Ascomycota. **(López-Martínez y col., 2009).**

A. niger (**Fig. 4**) es un miembro común de las comunidades microbianas encontradas en el suelo el cual se considera no patógeno; sólo se ha implicado en infecciones oportunistas en humanos inmunocomprometidos a su posible impacto en aspectos de salud humana con un papel como patógeno oportunista, **(López-Martínez y col., 2009).**

A. niger es económicamente importante ya que es utilizado en el proceso de fermentación y producción de ácido cítrico, del cual se producen alrededor de un millón de toneladas anualmente. Desde los años sesentas *A. niger* se ha convertido en fuente de una variedad de productos, entre los que destacan enzimas, como la glucosa oxidasa (GOX) y metabolitos como los ácidos cítrico, glucónico y fumárico **(Schuster y col., 2002).**

A. niger tiene un papel importante en el ciclo global del carbono, ya que este organismo contiene una batería de enzimas hidrolíticas y oxidativas involucradas en el rompimiento de la lignocelulosa de plantas. También, es importante como modelo de estudio en la investigación de varias áreas, como la secreción de proteínas eucarióticas en general, el efecto de varios factores ambientales en la supresión o activación de la exportación de las enzimas, mecanismos moleculares críticos en el desarrollo del proceso de fermentación y mecanismos involucrados en el control de la morfología fúngica **(Baker., 2006).**

1.7 Antecedentes directos

Nuestro grupo de trabajo aisló una cepa *Aspergillus niger* var. *tubingensis* denominada Ed8, de suelos contaminados especialmente con Cr VI del estado de Guanajuato, con la cual se ha demostrado en estudios recientes niveles de actividad enzimática de GOX secretable más elevados con respecto a cepas de



- Reino: Fungi
- Phylum: Ascomycota
- Clase: Eurotiomycetes
- Orden :Eurotiales
- Familia :Trichocomaceae
- Género :*Aspergillus*
- Especie: *niger*

Figura 4. Microfotografía de *A. niger*. La especie *A. niger* deriva del color negro por el aspecto macroscópico de las colonias, lo cual se debe a la gran cantidad de conidios en la superficie del cultivo, las hifas son hialinas, la vesícula está rodeada de fiálides. La posición de los conidios en 360° y el color de estos son característicos de esta especie (**López-Martínez., 2009**).

A. niger de referencia como es la cepa NRRL593 de *A. niger var. tubingensis* y la cepa A732 de *A. niger*. **(Sánchez., 2012)**. Además, nuestro grupo clonó y secuenció un gen *gox* de la cepa Ed8 el cual mostró un 95% de identidad con el gen *goxC* de *A. niger* de la cepa ATCC 1015 cuyo genoma está completamente secuenciado **(<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Aspni1>)**, además se identificaron en este organismo al menos cuatro genes codificantes para enzimas con actividad de GOX **(Pel y col., 2002)**.

La comparación de los niveles de producción de GOX secretable de la cepa ambiental Ed8 respecto a la cepa de colección A732, en presencia de 0.25% y 10% de glucosa, durante el cultivo resultó que a bajas concentraciones de glucosa (0.25%), solo la cepa Ed8 presenta actividad GOX, en tanto que la cepa A732 solo presenta actividad si es suplementada con 10% de glucosa **(Fig. 5) (Rodríguez., 2011)** Por lo tanto, la cepa de colección necesita aproximadamente 40 veces más glucosa para que alcance una actividad similar a la cepa Ed8, lo que indica que la cepa Ed8 es hiperproductora de la enzima GOX, y/o que dicha enzima es hiperactiva, respecto a las cepas de referencia.

Sin embargo, falta conocer el mecanismo molecular por el cual la cepa Ed8 muestra mayor actividad de GOX a bajas concentraciones de glucosa en comparación con cepas de referencia que necesitan ser suplementadas con un mayor porcentaje de glucosa para poder alcanzar una actividad de GOX secretable similar a la cepa Ed8.

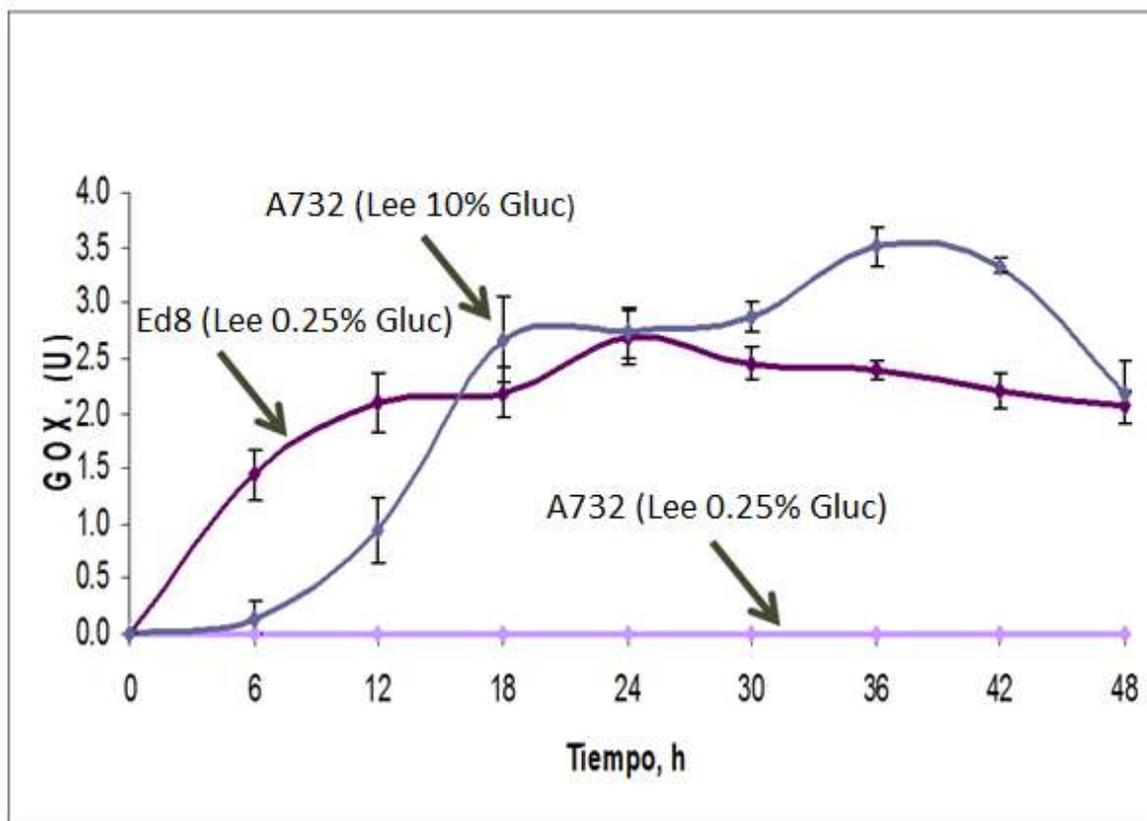


Figura 5. Comparación de los niveles de producción de GOX secretable entre la cepa Ed8 y la cepa de colección A732. Actividad de GOX con respecto al tiempo en medios con diferentes concentraciones de glucosa, la línea que representa a la cepa Ed8 muestra la actividad de GOX a 0.25% de glucosa, mientras que en línea representante de la cepa de referencia A732 con la misma concentración de 0.25% de glucosa no presenta actividad de GOX. La cepa A732 muestra actividad similar a la cepa Ed8 hasta que la glucosa ha sido incrementada al 10% como se indica en la gráfica.

2. JUSTIFICACION

Dado que la cepa ambiental Ed8 presenta niveles elevados de actividad enzimática GOX en medio de crecimiento con baja concentración de glucosa (0.25%), comparada con cepas de colección, las cuales necesitan crecer en medios de cultivo con exceso de glucosa (10%) para tener niveles de actividad de dicha enzima similares a la cepa Ed8. Es de interés investigar el mecanismo por el cual la cepa Ed8 tiene una mayor actividad de GOX. Por lo tanto nos hemos planteado conocer los niveles de expresión del gen *goxC*, u otros genes *gox* en diferentes concentraciones de glucosa que pudieran explicar el aumento de la actividad de GOX de la cepa Ed8.

3. HIPOTESIS

El aumento de la actividad de GOX de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* var. *tubingensis* se debe a un aumento en los niveles de transcrito del gen *goxC* en comparación con cepas de referencia de *A. niger*.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión del gen *goxC* de la cepa Ed8 y del gen *gox2* de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var. tubingensis* con respecto a cepas de colección de *A. niger*.

4.1 Objetivos específicos

1. Buscar homólogos del gen *goxC* en la base de datos del genoma de *A. niger*.
2. Diseñar una sonda de hidrolisis específica para monitorear los niveles de expresión del gen *goxC*, así como una sonda de hidrólisis para aquel gen que muestre la mayor identidad con el producto gen *goxC* de la cepa Ed8 de *A.niger var. tubingensis*.
3. Analizar los niveles de expresión del gen *goxC* y de aquel gen que muestre una mayor identidad con el producto del gen *goxC* en la cepa Ed8 de *A. niger var. tubingensis* a diferentes tiempos de crecimiento y concentraciones de glucosa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 *Microorganismos usados*

Se utilizó la cepa denominada Ed8 aislada previamente de suelos contaminados (con metales pesados) del municipio de San Francisco del Rincón, Gto. (Espino Saldaña, 2002), la cual fue identificada como *A. niger* var. *tubingensis*, además, de la cepa de colección NRRL593 de *A. niger* var. *tubingensis*, obtenida del Fungal Genetics Stock Center (FGSC), de la Universidad de Missouri, Kansas City, E.U.A. y la cepa de colección A732 FGSC de *A. niger* obtenida del Fungal Genetics Stock Center (University of Missouri, Kansas City, E.U.A.),.

Escherichia coli (DH5 α) fue usada para los experimentos de propagación de plásmidos y manipulación molecular.

5.2 *Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.*

Para el crecimiento de las cepas de *A. niger*, se utilizó medio mínimo Lee, cuya composición consta de KH₂PO₄ 0.25g, (NH₄)²SO₄ 0.5g, NaCl 0.5g, dextrosa a las distintas cantidades de: (0.25, 1, 5 y 10 g por 100/mL, el pH del medio se ajustó a 5.3 con hidróxido de sodio 1M y se esterilizó a 15 lb por 15 minutos. Se utilizó medio de cultivo Luria-Bertani (LB) suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina, para el crecimiento de las cepas portadoras de plásmido de *Escherichia coli*.

Se realizó el crecimiento de conidias de la cepa Ed8 de *A. niger* var. *tubingensis* y las cepas de referencia 593 y A732 de *A. niger* var. *tubingensis*, en medio Lee a concentraciones de 0.25 %, 1 % y 10 % de glucosa a tiempos de 24, 36, 48 y 60 horas a 28 °C en agitación constante

5.3 *Obtención de conidias*

Se utilizó una asada de conidias de las cepas Ed8 de *A. niger* var. *tubingensis* y 593 de *A. niger* var. *tubingensis* inoculadas en placas con medio PDA (Agar papa dextrosa) durante 4 días a 28°C. Se recuperaron las conidias raspando la superficie de la biomasa micelial con una espátula de vidrio y agua estéril para eliminar el micelio, la suspensión obtenida se filtró a través de varias capas de

gasa, posteriormente, las conidias se lavaron 3 veces con agua estéril por centrifugación (3000 rpm, 5 min) y finalmente se resuspendieron en 20 mL de agua estéril.

5.4 Aislamiento de DNA plasmídico y purificación de fragmentos de PCR

Se usó el sistema de purificación QIAprep Spin Miniprep para el aislamiento de plásmidos y QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN para la purificación de fragmentos de PCR.

5.5 Aislamiento de DNA genómico

Se recuperó el micelio previamente crecido por filtración, el cual se trituró con nitrógeno líquido, posteriormente se hizo una mezcla de 50-100 mg de micelio con 400 µL de buffer (tris 10 mM, EDTA 2mM, NaCl 0.4M) homogenizando en vortex por 30 s se adicionó 8 µL de proteinasa K y 40 µL de SDS (dodecilsulfato sódico al 20% mezclando en vortex por 30 s. Se Incubó durante una hora a 60 °C. Se adicionó 300 µL de NaCl 6M mezclando en vortex y se centrifugó por 30 min a 10,000 rpm a 4°C. Posteriormente, se trasladó el sobrenadante a un tubo nuevo, el cual se centrifugó 5 min a 12,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le adicionó 300 µL de isopropanol y se mantuvo a -20°C toda la noche. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm a 4°C 20 minutos, la pastilla se resuspendió en etanol al 70%, se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µL de agua a 60°C.

5.6 Aislamiento de RNA total

El RNA fue aislado siguiendo el protocolo de extracción por el (Método Trizol linvitrogen).

Brevemente, se trituró el micelio con nitrógeno líquido y la muestra se trasladó a un tubo de 1.5 mL al cual se le agrego 1 mL de trizol para posteriormente agitar mediante un Vortex por 5 min a temperatura ambiente. Se realizó la adición de 200 µL de cloroformo agitando por 15 s, se incubo por 3 min a temperatura

ambiente, posteriormente el tubo se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Se transfirió 500 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, se adicionó 500 µL de isopropanol (Mezclar por inversión), se incubó por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) para centrifugar nuevamente la pastilla. Se eliminó el etanol, la pastilla se resuspendió en 30 µL de agua con DEPC a 60 °C y se congeló la muestra para su almacenamiento a -80°C.

5.7 Cuantificación y determinación de integridad del RNA

La cuantificación del RNA se realizó espectrofotométricamente en el aparato SmartSpec Plus (Bio-Rad), para lo cual se hizo una lectura a 260 nm que es el máximo de absorción para ácidos nucleicos y 280 nm que es el máximo de absorción para las proteínas, se aplicó la fórmula $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ para comprobar su pureza.

Una muestra de buena calidad debe tener un rango de $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1.80 \leq 2.00$. Para demostrar la integridad de las muestras de RNA se sometieron a corrimiento electroforético en geles de agarosa, observando las bandas correspondientes para los RNAr eucarióticos 5s, 18s y 28s respectivamente.

5.8 Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA y RNA se sometieron a corrimiento electroforético en geles de agarosa (1-2%) disuelta en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA). Para poder visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio, la electroforesis se realizó en cámaras horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 110 V por 30 min. Las imágenes fueron tomadas en el transiluminador Gel Doc XR+ Imager (Bio-Rad).

5.9 Búsqueda *in silico* de los genes *gox* y diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis.

Se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de *A. niger* ATCC 1015 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Aspni1>) para identificar todos los homólogos del gen *goxC*, para lo cual se utilizó *goxC* de la cepa Ed8 como molde a comparar. Se usó el sitio <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (para determinar posibles péptidos señal para secreción y los dominios conservados en las proteínas GOX homologas a *goxC* de *A. niger* fueron identificados mediante el empleo del sitio (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>).

Se diseñaron sondas de hidrólisis específicas para cada uno de los genes de interés, basándose en una región interna del gen correspondiente. Con la finalidad de identificar las regiones disimilares en los genes *gox* para el posterior diseño de oligonucleótidos, se realizó una búsqueda en el genoma de *A. niger* (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Aspni1>), de homólogos al gen *goxC*, el análisis *in silico* incluyó el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes homólogos al gen *goxC* identificados, dichas secuencias fueron analizadas con el programa MegAlign de DNASTAR.

Una vez identificadas las regiones disimilares se realizó el diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para los genes *goxC* y *gox2*. Además se diseñaron las sondas de hidrólisis correspondientes para los genes constitutivos calmodulina y β -actina, (**Tabla. 3**).

Tabla 3. Oligonucleótidos y sondas utilizados en este trabajo

Gen	Sonda (FAM 5'-3' BHQ1)	Primer directo 5'-3'	Primer reverso 5'-3'
goxC	TGGACTCACTACTGCTGCCCGT	TCGCTGGTGGAGGTCTGA	GGAGCCACTTTTCGATGACAA
gox2	CAACCACTTCGGTAGTGACGAAGCC	GTGGGATATAACCTCCAGGATCA	GGCCATTCGCTTCTGGTTTC
Calmodulina	TTTGCCGCCAGAATTCCTTACCA	GGAATGCCGTATGGATTGTGATTG	GGAGTCGGTGTCTTCATCTTAC
B-actina	TCAACGCTCCCGCCTTCTACGT	ACCCAGATCGTCTTCGAGACTT	GAGGCGTACAGGGACAGAAC
gox2-ORF	-----	ATGAGTTCCAATCCTTGCTTCAGC	CTAAGCATTACCAGCATCCTTAATAA
Prom – goxC	-----	AGTCTGGACACGGCGGGATTGGT	CAGCGCGGTTTGATTGTTGGTAGC
Prom – gox2	-----	CGGGGACGCCTAATGTAAGTT	GATGCCGTGGGGGATGGAGT

5.10 RT-PCR en tiempo real

El RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 480 II System (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA). Las muestras de RNA fueron incluidas en una placa de 96 pozos junto con un control negativo y por duplicado fueron sometidas a un RT-PCR tiempo real, cada reacción de RT-PCR se realizó con un volumen final de 25 μ L y estaba compuesta con 5 μ L de muestra, 5.5 μ L de H₂O, 12.5 μ L de 2x PCR Master Mix, 0.5 μ L de primer directo, 0.5 μ L de primer reverso, 0.5 μ L de sonda y 0.5 μ L de enzima proveniente del Kit SuperScript III Platinum one-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Usando las condiciones recomendadas por el proveedor donde se inicia con una transcripción reversa (50°C, 30 min) y una desnaturalización inicial (95 °C, 5 min), seguida por 45 ciclos de amplificación, consistentes en desnaturalización a 95 °C por 30 s e hibridación a 60 °C por 30 s, acción de la Taq polimerasa a 72 °C las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada etapa de 60 °C, las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm (FAM).

La sonda de hidrolisis está constituida por un reportero fluorescente tipo FAM (Carboxifluoresceína) (R) unido en el extremo 5' y un captador de fluorescencia (quencher QR) en el extremo 3'. El reportero fluorescente FAM, tiene una longitud de onda máxima excitación de 494 nm y una longitud de onda máxima de emisión de 518 nm. El termociclador emite radiación que excita al fluoroforo que en respuesta disipa la energía a una longitud de onda diferente. Cuando la sonda de hidrolisis está intacta, la fluorescencia emitida por el reportero es captada por el quencher. El equipo capta la energía fluorescente procedente del reportero solamente cuando la sonda ha sido desintegrada por la actividad de 5' - 3' de exonucleasa de la enzima Taq DNA-polimerasa usada en los ensayos de amplificación

5.11 Amplificación y purificación del gen *gox2*

Con el uso de la secuencia conocida del gen *gox2* del genoma de *A. niger* (<http://genome.igi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Aspni1>) Se diseñaron un par de oligonucleótidos directo *gox2*-ORF-D y reverso *gox2*-ORF-R (**Tabla 3**). Para

amplificar la totalidad del marco de lectura abierto de *gox2* de la cepa de *A. niger* se utilizó DNA genómico de la cepa 593 que contiene el gen *gox2*. Inicialmente se aisló el DNA genómico de la cepa 593 el cual fue empleado como molde para realizar un ensayo de PCR de punto final con el empleo de la enzima Taq DNA polimerasa (suplementada con el buffer de reacción pH-8.5), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Una vez amplificado el gen *gox2*, este fue purificado, mediante el Kit de purificación de gel QIAGEN y se determinó su concentración y pureza mediante lecturas espectrofotométricas y corrimiento en geles de agarosa.

5.12 Curva estándar para el cálculo del número de copias del gen *goxC*

La curva estándar para conocer el número de copias del gen *goxC* de la cepa Ed8, se realizó mediante diluciones seriadas a partir de una solución de una concentración conocida en ng/μL de plásmido conocido, y tomando en cuenta el tamaño en pares de bases (pb) del plásmido (8615 pb) en donde está clonado el gen *goxC* (proporcionado por el D.C Félix Gutiérrez Corona) se estimó el número de copias del gen *goxC*. La concentración del plásmido se obtuvo por espectrofotometría en (ng/μL) y el número de copias correspondiente al plásmido se calculó usando la formula $DNA(copias) = \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ mol} \times DNA \text{ concentración ng}/\mu L}{DNA \text{ pb} \times 660 \text{ g/mol}}$, en donde $6.02214199 \times 10^{23}$ corresponde al número de Avogadro, (DNA pb) es el tamaño del plásmido que contiene el gen de interés y (660 g/mol) corresponde al promedio del peso molecular de los nucleótidos. Mediante una serie de diluciones de concentraciones conocidas del número de copias del plásmido de interés se realizó PCR en tiempo real para precisar el número exacto de Ct (Ciclo de amplificación) registrados en las diluciones seriadas, generando una curva estándar de Ct's contra el número de copias de plásmido calculadas previamente (Lee. y col., 2005).

5.13 Cuantificación del número de copias absolutas del gen *goxC* en las distintas condiciones de crecimiento

Se aisló RNA a partir de la cepa Ed8 y de la cepa de referencia NRRL593 de *A. niger var. tubingensis*, y A732 de *A. niger*, proveniente de las diferentes condiciones de crecimiento. Las distintas muestras de RNA se utilizaron como templado para llevar a cabo RT-PCR en tiempo real con la sonda TAQMAN correspondiente al gen *goxC*. Usando la curva estándar los Ct's registrados de los distintos RNAs, fueron interpolados en la curva, mediante la ecuación lineal $x = \frac{(y-y_a)(x_b-x_a)+x_a}{(y_b-y_a)}$ con la finalidad de obtener la cantidad del número de copias del gen *goxC* presente en las diferentes muestras de RNA.

5.14 Eficiencia de amplificación para los genes *goxC*, *gox2*, β -actina y calmodulina

La eficiencia de amplificación se calculó a partir de la pendiente (slope) de una curva estándar, por medio de la formula $E = ([10^{-1/\text{slope}}] - 1) \times 100$. La eficiencia de PCR deberá ser de 80-100% para una pendiente ideal de 3.32. La pendiente se calculó por los Ct's registrados en el análisis de PCR en tiempo real en el eje de las "Y" y el logaritmo de concentración en el eje de las "X". El Ct se determinó en la fase exponencial de la reacción, el cual es inversamente proporcional al número de copias de templado, es decir a mayor concentración de templado menor Ct registrado.

6. RESULTADOS

6.1 Búsqueda *in silico* de homólogos del gen *goxC* en el genoma de *A. niger*

Con la finalidad de analizar la expresión del gen *goxC*, se procedió a diseñar oligonucleótidos y la sonda de hidrólisis secuencia específica al gen *goxC*. Para evaluar la especificidad de dichos oligonucleótidos, se realizó en primer lugar la búsqueda en el genoma de *A. niger* (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Aspni1>), de homólogos al gen *goxC*, en donde se encontraron un total de 28 genes, dichas secuencias nucleotídicas fueron traducidas a proteína para comparar el grado de identidad y homología entre dichos productos y el producto del gen *goxC*. El resultado de la comparación fue evaluada en un árbol filogenético generado a partir de un alineamiento clustal W (**Fig. 6A**), se observó que el producto del gen *goxC* se agrupa con otras tres proteínas (GOX2-4), las cuales se agrupan en la misma rama en el árbol. La **Figura 6B** muestra el grado de identidad/similitud existente entre las tres proteínas *gox2*, *gox3* y *gox4*, respecto a GOXC, siendo de 58, 34, 26% de identidad para *gox2*, *gox3* y *gox4*, respectivamente. Mientras que la similitud de los genes *gox2*, *gox3* y *gox4* respecto a *goxC* está en 68, 53 y 39%, respectivamente. Por lo tanto, el gen como la proteína codificada por *gox2* muestra mayor identidad y similitud con el gen y la proteína codificada por *goxC*. El análisis de la secuencia de las proteínas GOXC-4 demostró la presencia de dominios característicos de este tipo de oxidasas, dichos dominios son GMC_OXRED_1 (GMC oxidoreductases asigature, RCC1_2 (Regulator of chromosome condensation (RCC1) signature y GMC_OXRED_2 (GMC oxidoreductases signature (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>). Además, el análisis en la secuencia aminoacídica de las proteínas GOX2, GOX3, GOX4 revela la presencia de alguno de dichos dominios: dominio 1.GMC1; dominio 2. RCC1 y dominio 3.GMC2, estos tres dominios se encuentran únicamente en GOXC, mientras que GOX3 tiene los dominios 1 y 3 y GOX2 solo cuenta con el dominio 1 (**Fig. 7**). Mediante el empleo de la herramienta bioinformática <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (**Tabla 4**) se detectó un péptido señal de secreción en las proteínas GOXC, GOX2 y GOX3. Debido al

hecho que el producto de *gox2* muestra la más alta identidad respecto a *goxC* y además presenta un péptido de secreción, puede ser posible que la actividad extracelular este mediado por ambos productos génicos. Debido a esto se planteó diseñar una estrategia para cuantificar la expresión tanto de *goxC* como para *gox2*. Por lo tanto, los ORF (marcos de lectura abiertos) correspondientes para estos cuatro genes (*goxC*, *gox2*, *gox3*, *gox4*) se alinearon para realizar la búsqueda de regiones distintas entre los genes que permitieran el diseño de los oligonucleótidos y sondas para llevar a cabo RT-PCR en tiempo real, para lo cual se realizó un alineamiento clustal V de las secuencias nucleotídicas de los genes *goxC*-4 (ver tabla 3), (**Fig. 8**). Como se puede apreciar en la figura 8 no existen regiones con diferencias notables entre las secuencias de los distintos genes, sin embargo se diseñaron los oligonucleótidos y las sondas tanto para el gen *goxC*, como para el gen *gox2* (**Fig. 9 A y B**). La secuencia nucleotídica del oligonucleótido directo del gen *goxC*, tienen un 77, 81 y 81% de similitud, el oligonucleótido reverso tiene un 35, 55, y 20% de identidad con *gox2*, *gox3* y *gox4* respectivamente, y la sonda de hidrolisis cuenta con 44, 44 y 36% de similitud con respecto a *gox2*, *gox3* y *gox4*. Mientras que el oligonucleótido directo del gen *gox2* tiene un 72, 72, 66%, la sonda de hidrolisis con 63, 36, 40.9%, y el oligonucleótido reverso cuenta con 80, 55, 55% de similitud con *gox2*, *gox3* y *gox4* respectivamente.

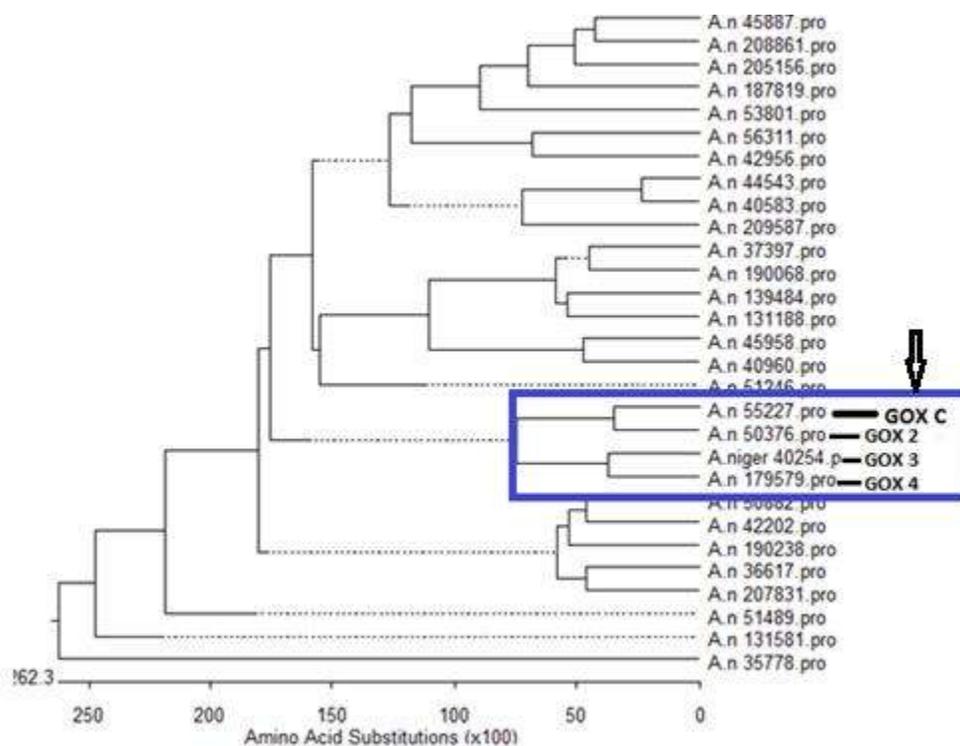


Figura 6. Árbol filogenético de proteínas relacionadas con GOXC en el genoma de *A. niger*. Se muestra la relación que existe entre los productos de los 28 genes con homología con el gen *goxC* encontrados en el genoma de *A. niger* secuenciado. En el rectángulo señalado con una flecha, se muestra que GOXC se agrupa en una rama con otras tres proteínas que resultaron con la mayor identidad a GOXC.

Tabla 4. Secuencias del péptido señal identificado en tres de las cuatro proteínas de GOX identificadas en el genoma de *A. niger*.

Proteína	Secuencia de péptido señal
GoxC	MQTLLVSSLVVSLAAALPHYIR
Gox2	MMSPILASALLLSGVLA
Gox3	MATKMLRSLTVFGALSTALAAPS
Gox4	No se encontró

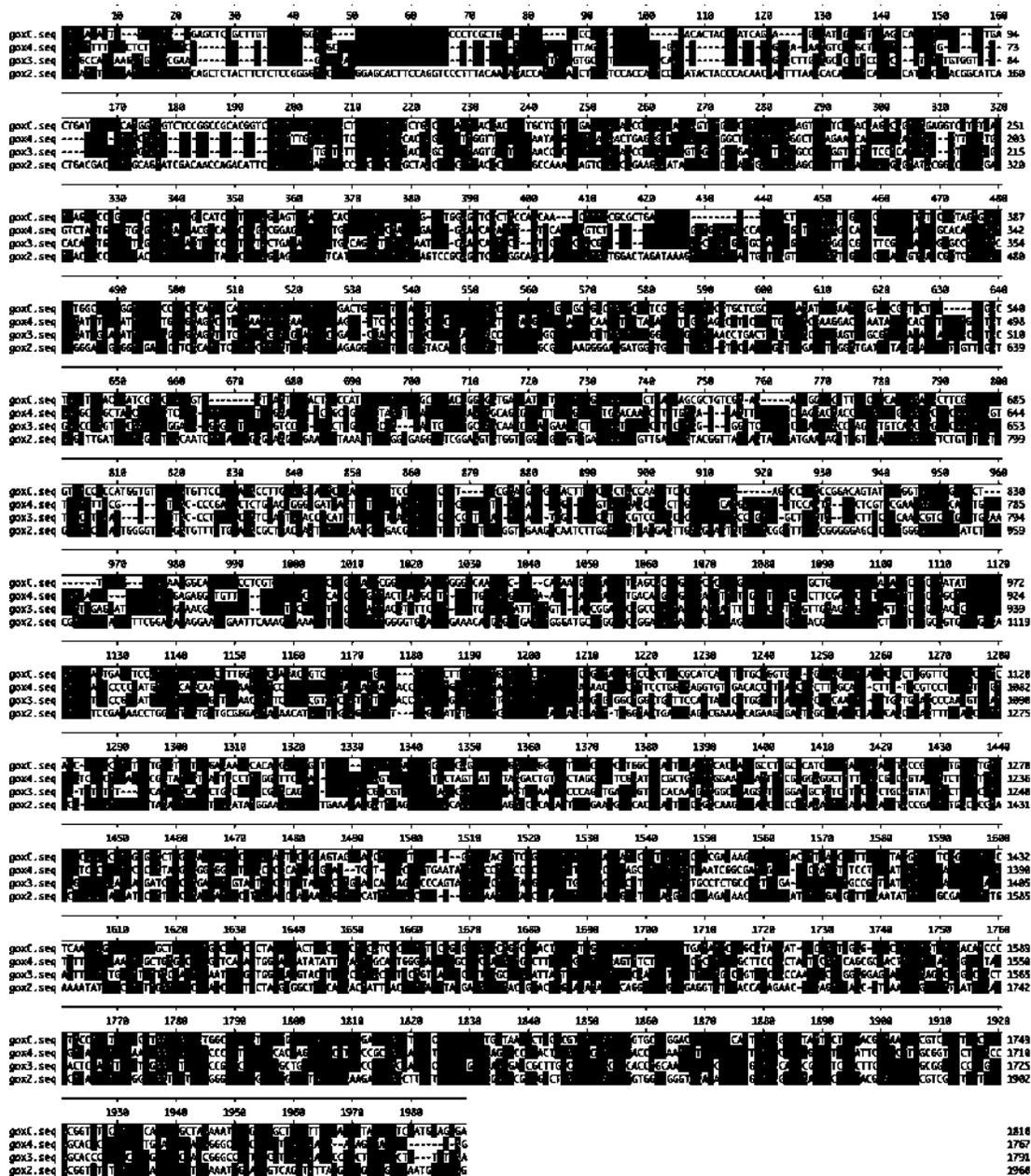


Figura 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los cuatro genes *gox* identificados. En recuadros negros se muestran las regiones idénticas entre las secuencias nucleotídicas de *goxC*, *gox2*, *gox3* y *gox4*.

6.2 Clonación del gen *gox2* de la cepa Ed8

Con la finalidad de contar con un control positivo de expresión de *gox2*, se clonó el gen *gox2*, para lo cual basado en la información del genoma de *A. niger* se diseñó un par de oligonucleótidos (ver tabla 2) para la amplificación por PCR de todo el marco de lectura abierto del gen *gox2* (**Fig. 10A**). La amplificación del ORF (marco de lectura abierto) de *gox2* se realizó mediante PCR en punto final, usando como templado DNA genómico de la cepa NRRL593, el tamaño predicho para el gen *gox2*, es de 1968 pb y que el fragmento correspondiente a *gox2* fue identificado mediante la observación de una única banda en un gel de agarosa al 1%, cuyo tamaño esperado de aproximadamente 2000 pb purificado (**Fig. 10B**).

6.3 Especificidad de las sondas de hidrolisis *goxC* y *gox2*

Con la finalidad de demostrar la especificidad de los oligonucleótidos y las sondas de hidrolisis para los genes *goxC* y *gox2*, se realizó un análisis mediante PCR en tiempo real. En el caso de la sonda de *goxC* se usó como templado un vector de expresión donde esta clonado *goxC* (pDSBGOX). Mientras que para la sonda de *gox2* se usó el amplicón de *gox2*, previamente purificado. Los resultados de los ensayos de PCR en tiempo real con ambas sondas, demostró que dichas sondas son específicas hacia sus templados correspondientes, ya que la presencia del otro gen no generó señal alguna y únicamente se detectó señal de fluorescencia solo cuando la sonda estaba con su gen correspondiente en la reacción de amplificación (**Fig 11**).

(A)

★

```

ATGATGTCGCCAATCCTTGCTTCAGCCTACTTCTCTCCGGGGTCTGGCGGAGCACTTCCAGGTCCTTTACAACATACCATCTCACCT 90
TGCTCCACCAGTCCACATACTACCCACAACGACTTTAACCACAACATCAACTCCATCCCCACGGCATCACTGACGACCTCGCAGTATC 180
GACACCAGACATTCGACTACATAATCGCCGGCGGGGGTAACTGGCCCTCACCTCGCCGCCAACTAGTCGAGCAGAAGAAATACACC 270
GTCTAGTGTATCGAAAGCGGCTTCTATGCATGGGAATACGGCCCCAAGATTGACGACCTCAACACCTACGGCCAAGTATTCCGCAGCAGC 360
GTCGATCATGCCTACGAGACCAGTCCCGCAGCTCGTCGGCAACGACGGTGAACCTGGACTAGATAAAGACATCAGAATTGTCGGTCCGGA 450
AATGGTCTCGGAGGGTCAACGCTCATCAATGGGGGAACGTGGACGAGGGCTCACAAGTCGAGCTTATTCTGGGGAAGAGGCTTTGGG 540
AATACAGGGTGGAAATGGGACGCGCTGAAGGGGAAGATGGATGAGATTGAGGTTCCAAGGGATCCGACGTCGGATGATATTACGGAGGGG 630
TCGTTCCATAAGTTTGTATGCTAAGTGTCAACATCAACAGCCGGTAAGGGGAAGTTAAAGTCGGGGCAGGGATCGGAAGTATGGTTGG 720
TCGCGGTTGATCAAGGCGTTGATGCATACGGTTAACAGTACGTATGAAGAGGTGGTGAATCAGAAGGATCTGTGTTGTGGGGATCCAACT 810
GGGGTGTTCGATCTTTTGAACACGCTTACCAATGAGCAAAATCCGGACGGATGCTGCTAGGTCGTGGTTGAAGCCAATCTTGGATGATGAT 900
GAGTTGAAGCAGTATATTACGGTTTTCACGGGGGAGCTCGTTGGGAAGGTTTCATCTGGCCGACGCCAACCTTCGGAGACAGGAACAGAA 990
TTCAAAGCCGAAGGTTGGAGTTTGGGGTGCACAAGAAACAGGAGTGGAAAGTGGGATGCTTGGGCCAGGAAGAATCCTTCTAGCCCGG 1080
GGGTCCACGATCTCTCCCTCATTCTGCAGTGGTCGGGAATCGGTCCGAAAACCTGGCTTGTGCTGCGGGAATAGAACATAAGTTGGAG 1170
CTCCCTGTGGGATATAACTCCAGGATCAAAACACCACTTCGGTAGTGACGAAGCCGAAACAGAAAGCGAATGGCCAAGGCCAGGCAGCC 1260
TACTTTGCAACCTTTGACAGAGATCTTCGGTAAAGATGCCTCAGATATGGAAAAGCTCCTGAAAGACGATACAGAGCTCGACAAATGGGCA 1350
GAACACACAGTGAACGGCCACGGATTCGCCGACAAGGCCAACCTCCTAAAACAGTACAAGAACTACCGAGACTGGCTCCTAACCGACAAA 1440
GTATCCTATGCGGAATCTTCTTGCACCGACAACAGCACCCATTTGCACCTCTGGAATCTGATCCCATTCACCCGAGGGTATGTCAG 1530
ATCCTAGACAACGACCCCTATCTGCGAAGCTTCGAATATAACCCGCGATACTTTGAAAATATCCTCGACTTGAACGGCCAAGCTGCTGCT 1620
ACGCGGCTGGCAGACAATTGACCAACACGATGACATGAAACAGTACGTGGACAAAGAGCAGGTCGCCGGGAGGTTATGACAGAGAAC 1710
GCGAGTCTAACTGAATGGCCGATATGTGAAGCAAACTACCGGGCCAATTATCACGGGGTGGGACTTGGCTATGATGAAGAGGAG 1800
CTTGGTGGTGTGTCGACCCGAGGCTAAGGTGTATGGTGTGGAGGGTTGAGAGTGGTGGATGGTTCATCCCGCTACCGCAGGTGTGCG 1890
TCGATGTTATGACGGTGTTTTATGCGATGGCTGTGAAAATTGCAGAGTCATTTATTAGGATGCTGGTAATGCTTAG 1968
    
```

○

(B)

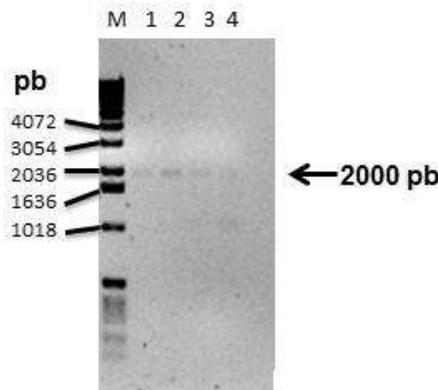
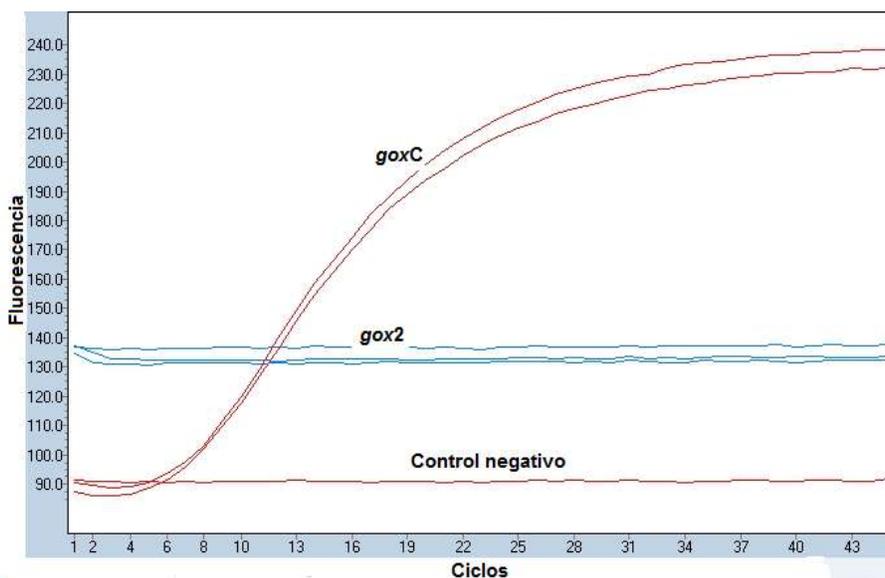


Figura 10; Amplificación del gen *gox2*. (A) Localización de los oligonucleótidos usados para amplificar por PCR el marco de lectura abierto de *gox2*. Secuencia nucleotídica del gen de *gox2*, en el recuadro indicado con una estrella se ilustra el oligonucleótido directo y en recuadro indicado con un círculo se indica la secuencia del oligonucleótido reverso. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% que indica la amplificación de un fragmento de aproximadamente 2000 pb que corresponde al gen *gox2*. M: Marcador molecular carriles 1-4 corresponden al amplicón del gen *gox2* de *A. niger* de la cepa 593.

(A)



(B)

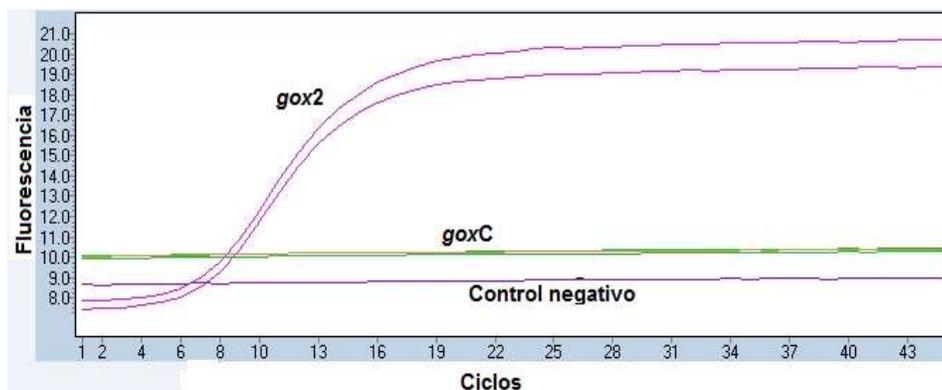


Figura 11. Especificidad de los oligonucleótidos y sondas para los genes *goxC* y *gox2*. Graficas de la fluorescencia generadas a partir de las sondas para los genes *goxC* y *gox2*. **(A)** Amplificación con la sonda *goxC* usando como templado el plasmido que contiene *goxC*. **(B)** Amplificación con la sonda *gox2* usando como templado el amplicon de *gox2*. En ambos casos, se usaron como templado el plasmido pDSBGOX y al amplicon *gox2*. El control negativo fue realizado mediante la amplificación de agua, estos ensayos fueron realizado por duplicado.

6.4 Determinación de la integridad del RNA de las cepas Ed8, 593 de *A. niger* var. *tubingensis* y A732 de *A. niger*

Con el propósito de encontrar diferencias en la expresión de los genes *goxC* y *gox2* de la cepa Ed8 respecto a la cepa de colección A732, las cepas se cultivaron con diferentes condiciones de crecimiento que se describen en la **Tabla 5**, posteriormente se aisló el RNA mediante el método del trizol, la confirmación de la integridad del RNA se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y su tinción con bromuro de etidio (**Fig 12**) como se describe en materiales y métodos. Además se determinó espectrofotométricamente la concentración.

6.5 Comprobación de la pureza de las muestras de RNA de *A. niger*

Para comprobar que las muestras de RNA tratadas con DNAsa no estaban contaminadas con DNA residual, se realizó un PCR tiempo real con las sondas de *goxC* y *gox2* a las muestras de RNA previamente aislados de *A. niger*, se usó como control positivo DNA genómico de la cepa Ed8. Los resultados nos muestran que las muestras de RNA estaban libres de DNA, debido a que no hubo amplificación en ninguna de las muestras de RNA. Se usó como control positivo el DNA genómico de la cepa Ed8, el cual mostro amplificación con ambas sondas (Fig. 13), indicando que el ensayo se realizó en forma adecuada. Todas las muestras de RNA fueron tratadas en las mismas condiciones de digestión con DNAsa I, como las muestras de RNA mostradas en la **figura 12**.

Tabla 5. Condiciones de crecimiento de las cepas de *A. niger*.

Condiciones	Tiempo en horas	% de Glucosa
1	24	0.25%
2	24	1%
3	24	10%
4	36	0.25%
5	36	1%
6	36	10
7	48	0.25%
8	48	1%
9	48	10%
10	60	0.25%
11	60	1%
12	60	10%

Las cepas fueron crecidas en medio mínimo Lee y suplementadas con 0.25, 1 y 10% de glucosa a los tiempos indicados.

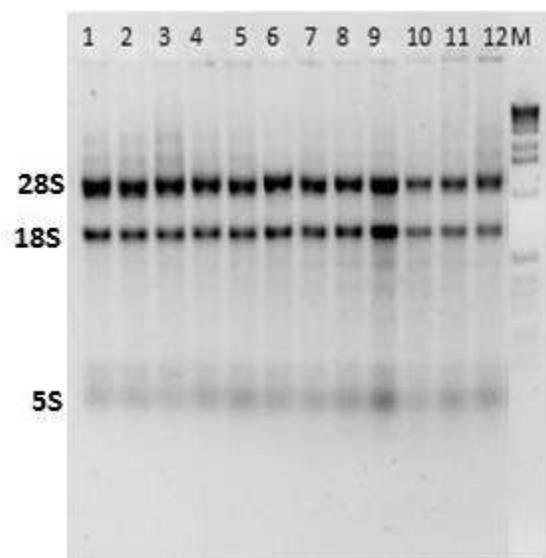


Figura 12. Integridad del RNA aislado de la cepa A732 de *A. niger*. Gel de agarosa al 2% posterior a la electroforesis de la muestras de RNA total (Tabla 5) de *A. niger*. Se cargó 1 μ g de RNA total en cada carril, se observan las bandas correspondientes a los distintos RNAr 28s, 18s y 5s.

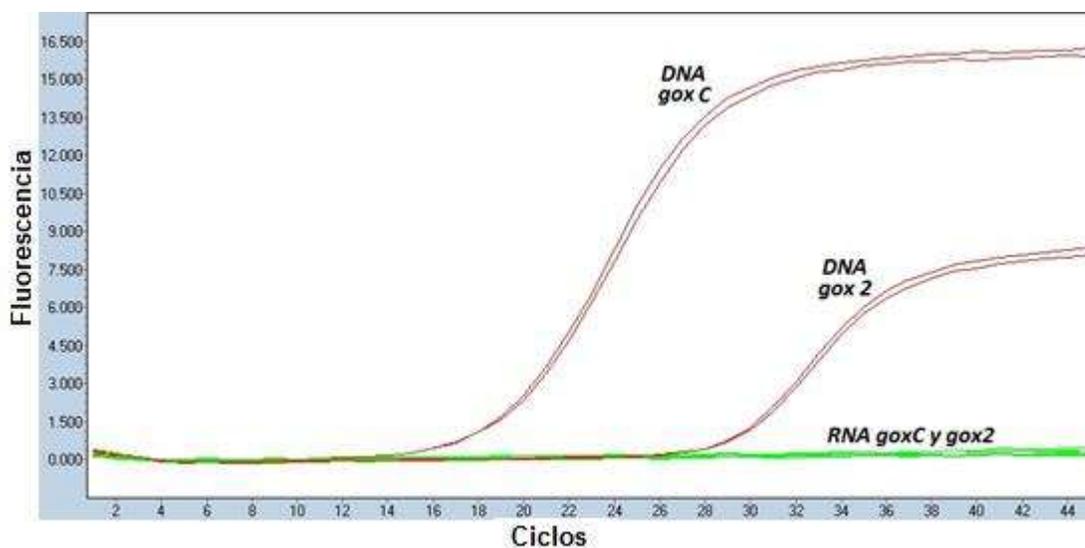


Figura 13. Determinación de DNA contaminante en las muestras de RNA aislado de las cepas de *A. niger*. El RNA total de las cepas de interés se sometió a PCR en tiempo real, posteriormente a su tratamiento con DNAsa I, las sondas para los genes *goxC* y *gox2* fueron usadas en un ensayo de PCR en tiempo real, en donde fue usado DNA genómico (DNAg) de la cepa Ed8 de *A. niger* como control positivo. Se usó RNA total de la cepa Ed8 (100ng) a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Curva de la gráfica señalada como DNA *goxC* y el DNA *gox2* indica la amplificación por ambas sondas en presencia del DNA genómico.

6.6 Curva estándar para la determinación del número de copias del gen *goxC*

A. niger

El plásmido pDSBGOX que contiene el gen *goxC* de la cepa Ed8 de *A. niger* donado por El DC. Félix Gutiérrez Corona, tiene un tamaño de 8615 pb de los cuales 1865 pb corresponden al gen *goxC* el cual fue usado para transformar una cepa de *E.coli* (**Fig. 14**), se procedió a su purificación y cuantificación del plásmido. Se emplearon una serie de diluciones de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01/ng de plásmido y posteriormente se realizó un ensayo de PCR tiempo real con las diluciones del plásmido. Con los datos generados se realizó una curva estándar mediante el modelo descrito en materiales y métodos, el resultado de la curva estándar demostró una eficiencia del 100% (**Fig. 15**), además se pudo conocer el número de copias del gen *goxC* por cada 1 μ L de plásmido (1.482×10^{11}).

6.7 Cuantificación absoluta de número de copias del gen *goxC* en las diferentes muestras de RNA de las cepas de *A. niger*

Las distintas muestras de RNA previamente tratadas con DNAsa de la cepa Ed8, 593 de *A. niger* var. *tubingensis* y A732 de *A.niger* obtenidas a partir de las diferentes condiciones de crecimiento (ver tabla 4), se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real y se registró su ciclo de amplificación, denominado como Ct. Posteriormente, la cuantificación absoluta del transcrito de *goxC* de las distintas muestras de RNA, fue obtenida mediante la interpolación de su Ct en la ecuación en la recta patrón previamente obtenida (**Fig. 15**).

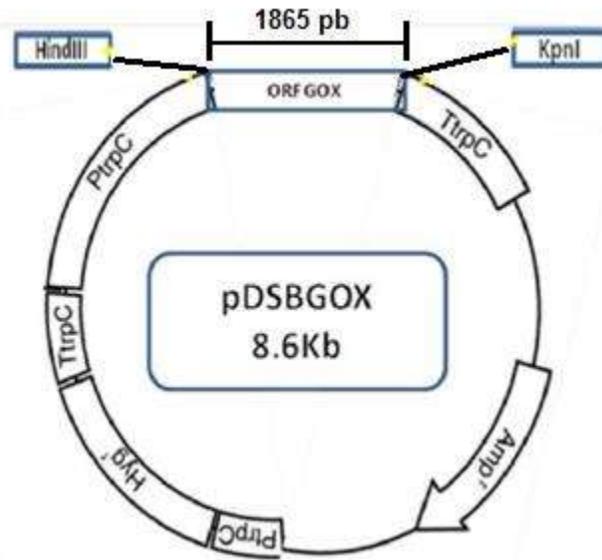


Figura 14. Esquema del plásmido pDSBGOX en donde está clonado el gen *goxC*. Se ilustra el gen *goxC* que está clonado en el vector pDSBGOX cuyo tamaño es de 8615 pb, también se indica las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI* que liberan el fragmento de 1865 pb correspondiente al gen *goxC* de *A. niger*.

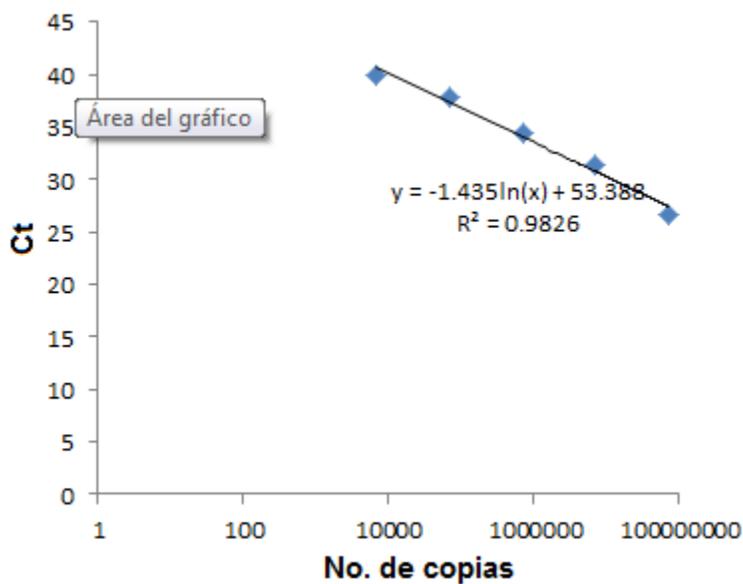


Figura 15. Gráfica de eficiencia de amplificación del gen *goxC*. Construcción de la curva estándar obtenida a partir de diluciones seriadas 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng totales de concentraciones conocidas del plásmido pDSBGOX que contiene el gen *goxC*.

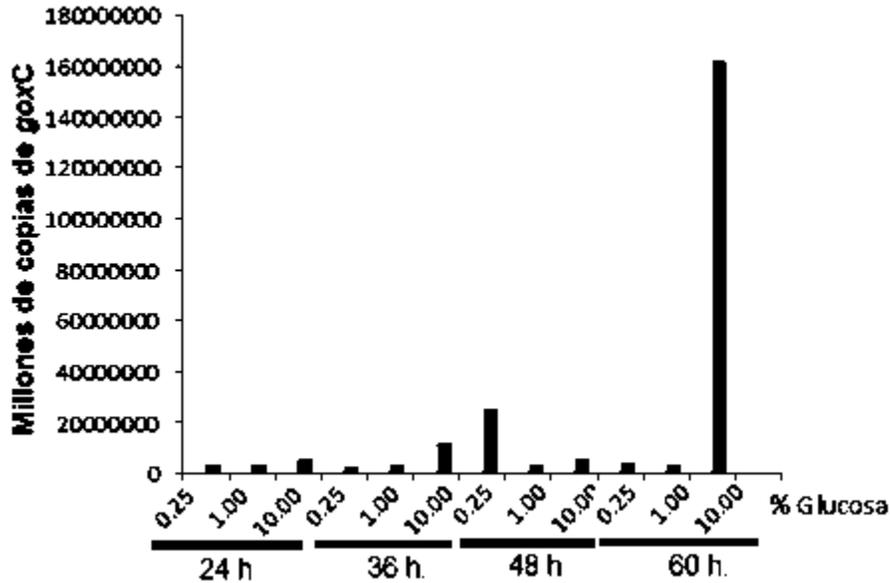
Se obtuvo el número de copias del transcrito de *goxC*, obteniendo el valor de “x” que es la interpolación de nuestro Ct de interés en la curva estándar (Interpolación= $Ct - 53.388 / -1.435$ (**Figura 15**), los resultados de la interpolación se muestran en la **Tabla 6**, posteriormente se realizó la ecuación No de copias = e^{x_i} donde e= Numero de Euler (≈ 2.718), esto para calcular el número de copias del gen *goxC* en cada una de las muestras de RNA para las cepas analizadas, se grafica con los datos para la cepa Ed8 de *A. niger var tubingensis* (**Fig. 16A**). En las primeras 36 h de crecimiento en todas las condiciones se registraron los valores por debajo de los 20 millones de copias, mientras que a las 48 h de crecimiento a la concentración de 0.25% de glucosa se registra un incremento superando los 20 millones de copias, después de esto hay un decremento de copias en todas las condiciones, hasta que al 10% de glucosa en 36 h de crecimiento, se registra el máximo nivel de expresión (**Fig. 16A**). Para la cepa A732 de *A. niger*, se aplicó el mismo criterio de cálculo para todas las muestras, a diferencia de la cepa Ed8, la cepa A732 registró un número de copias más elevado con respecto a la cepa Ed8 siguiendo un patrón de aumento de número de copias del gen *goxC* en la condición en donde la cepa A732 fue crecida en 1% de glucosa en todos los tiempos, además es esta misma condición, pero a las 48 h de desarrollo, se muestra incremento mucho mayor de expresión respecto a los otros tiempos ensayados por lo cual a las 48 h a 1% de glucosa es el tiempo en el que se registra el máximo de número de copias del gen *goxC* en la cepa A732. (**Fig. 16B**).

Tabla 6. Cuantificación absoluta del número de copias del gen *goxC* de *A. niger*.

% de Glucosa	Tiempo en hrs	Ct	Interpolación	Log natural	No. De copias <i>goxC</i>
0.25%	24	31.8	15.0439024	2.718	3410408.45
1%	24	31.66	15.1414634	..	3759864.52
10%	24	31.145	15.5003484	..	5382918.68
0.25%	36	32.01	14.897561	..	2946169.27
1%	36	31.765	15.0682927	..	3494603.01
10	36	30.075	16.245993	..	11345237.1
0.25%	48	28.945	17.0334495	..	24932516.1
1%	48	31.74	15.0857143	..	3556011.59
10%	48	31.12	15.51777	..	5477509.51
0.25%	60	31.425	15.3052265	..	4428801.53
1%	60	31.785	15.0543554	..	3446240.56
10%	60	26.26	18.9045296	..	161912968

Se usó RNA total tratado previamente con DNAsa I en un ensayo de RT-PCR en tiempo real los datos de Ct obtenidos fueron interpolados en la ecuación (**Fig. 16**).

(A)



(B)

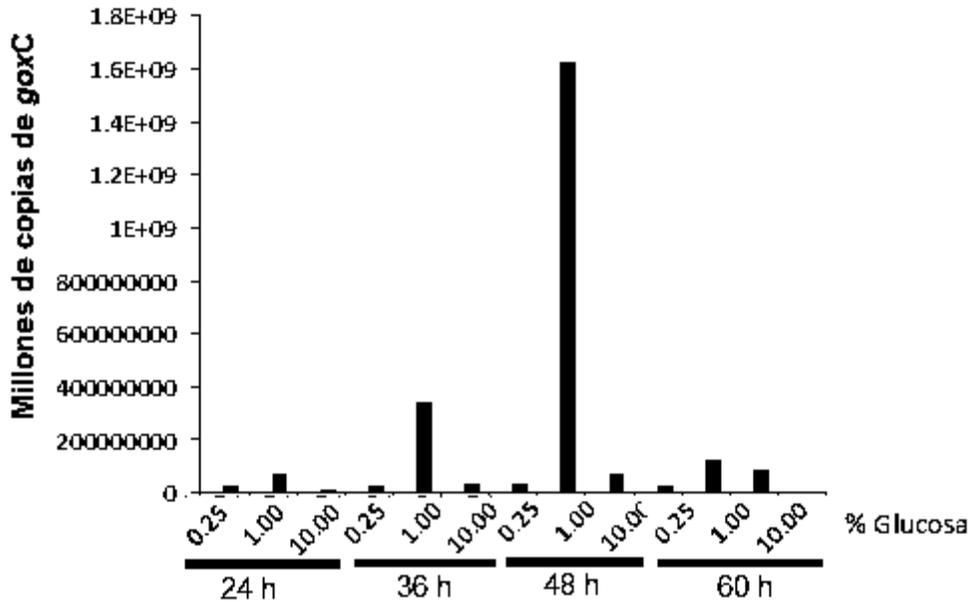
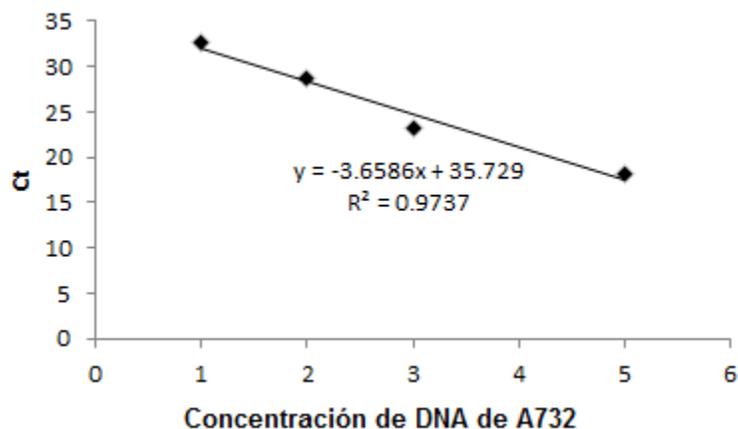


Figura 16. Cuantificación absoluta del número de copias del gen *goxC* en la cepa A732 y Ed8. El RNA tratado previamente con DNAsa I fue sometido a RT-PCR en tiempo real, los valores obtenidos Ct fueron interpolados en la ecuación (Fig 16). (A) Cepa Ed8 (B) Cepa A732. Se probaron concentraciones de glucosa de 0.25, 1 y 10% de glucosa a tiempos de desarrollo por 24, 36, 48 y 60 h incubadas a 28°C.

6.8 Expresión relativa de *gox2* con respecto a β -actina en la cepa A732 de *A. niger*

Para estudiar los cambios en los niveles de expresión del gen *gox2* en la cepa A732 y Ed8 de *A. niger* se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real con RNA total de la cepas Ed8 y de referencia A732. Para lo cual, se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real con el gen de referencia β -Actina y el gen de interés *gox2*. Se usaron diluciones seriadas de 50, 5, 0.5 y 0.05 ng de RNA total de la cepa A732 por reacción, para determinar la eficiencia de amplificación de ambas sondas, obteniendo eficiencias del 87 y 78% para β -actina, y *gox2*, respectivamente (**Fig.17 A y B**). Los valores de fluorescencia correspondientes a los Ct's registrados en el termociclador, el cálculo de la expresión relativa se realizó mediante el método matemático ΔCt (**Pfaffl, 2001**), el cual emplea la siguiente fórmula de $\Delta Ct = 2^{(E^{n1} \cdot Ct^{n1})} \times 2^{(E^{n2} - Ct^{n2})}$ donde E representa las eficiencias respectivas de los genes constitutivo= n1 y el gen de interés= n2. El Ct representa el ciclo de amplificación del gen en la muestra ensayada. Con los datos obtenidos se procedió a calcular los niveles de RNAm de *gox2* respecto al gen de referencia β -actina en las distintas condiciones de crecimiento (**ver tabla 5**). La expresión del gen *gox2* en la cepa A732 depende del tiempo de incubación como de la concentración de glucosa (**Fig. 18A**). Se registró una expresión más baja de *gox2* a las 24 h de crecimiento respecto a los tiempos de 36, 48 y 60 h. Además a las 36 y 48 h de desarrollo en presencia de una concentración a 0.25% de glucosa se registró una mayor expresión con respecto a una concentración de 1 y 10% de glucosa, finalmente a la condición de crecimiento de 60 h con presencia de 10% de glucosa se observó una mayor expresión respecto a todas las condiciones probadas. En la cepa de *A. niger* Ed8 todas las muestras de RNA probadas fueron negativas en los ensayos de RT-PCR en tiempo real, (dato no mostrado). En la Fig. 18B se muestra una gráfica que demuestra que el gen constitutivo de β -actina no muestra una gran variación de expresión en todas las condiciones de crecimiento, lo que indica que es un buen gen de referencia para este estudio.

(A)



(B)

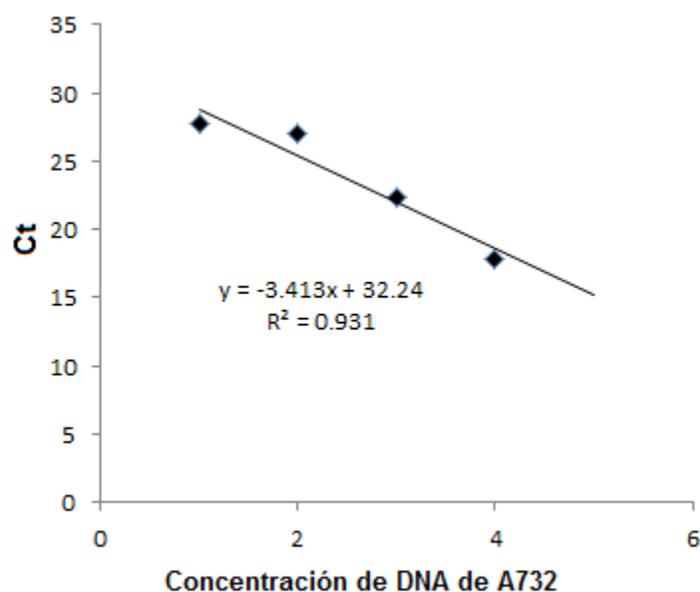
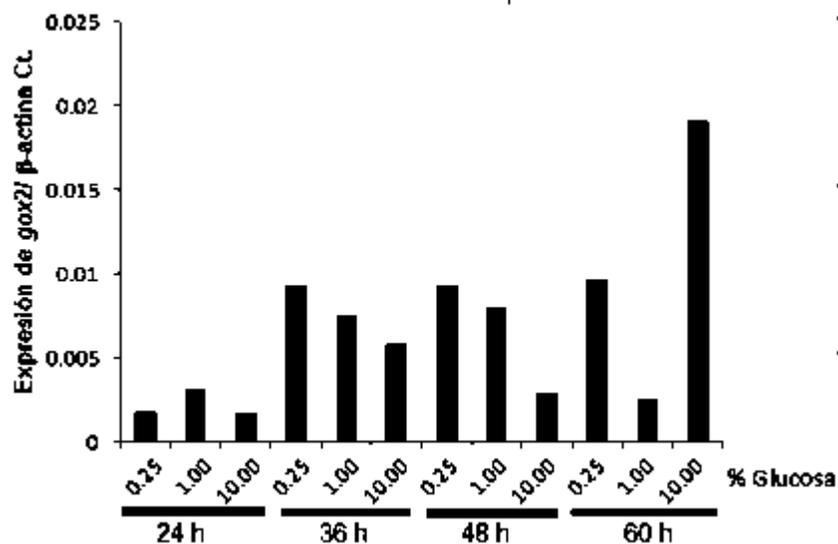


Figura 17. Curvas de eficiencia de amplificación de los genes β -actina y *gox2*. (A) Curva de eficiencia del gen constitutivo de β -actina. (B) Curva de eficiencia de *gox2*. Se usó una serie de diluciones de RNA total de la cepa A732 a partir de 50-0.05 ng. Se muestra la ecuación de la regresión lineal en cada uno de las gráficas.

(A)



(B)

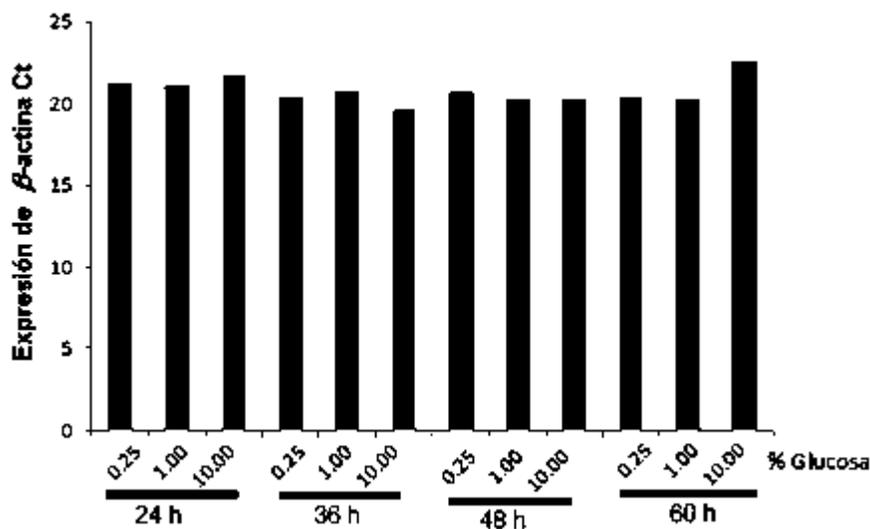


Figura 18. Expresión relativa del gen *gox2* respecto al gen de β -actina en la cepa de *A. niger* A732 . El RNA total fue aislado a partir de la cepa A732 crecida en diferentes concentraciones de glucosa (0.25, 1.0 y 10.0 %) a los tiempos de 24, 36, 48 y 60 h. El RNA fue sometido a ensayos de RT-PCR en tiempo real usando las sondas de hidrolisis para *gox2* y β -actina. Los resultados obtenidos fueron graficados usando el metodo matemático Δ Ct. **(A)** valores de Ct obtenidos en las distintas condiciones de crecimiento (**Tabla 5**) para el gen de β -actina. **(B)** Niveles de expresión del gen *gox2* relativos a la expresión del gen β -actina.

6.9 Clonación de los promotores del gen *gox2* de las cepas Ed8, 593 y A732, de *A. niger*

Con la finalidad de explicar las diferencias de expresión en los genes *goxC* y *gox2*, se realizó un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los genes *goxC* y *gox2* obtenidas a partir del genoma de *A. niger* (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl). Se ubicaron cajas consenso de reconocimiento por factores de transcripción en dichas secuencias de los promotores. Los resultados muestran diferencias en la presencia y organización de cajas consenso en ambos genes **Tabla 7 y 8 (Fig. 22)**, lo cual sugiere que ambos genes son regulados de manera distinta, lo cual es confirmado en nuestros experimentos.

Con el propósito de ver los cambios en la regulación de los genes *goxC* y *gox2* en las distintas cepas de *A. niger* se debe a diferencias en la secuencia nucleotídica en los promotores para *goxC* y de *gox2* (**Fig. 19 A y B**), se diseñaron oligonucleótidos en base a la secuencia reportadas de los promotores de estos genes en el genoma de *A. niger* para amplificar la región promotora de los genes *goxC* y de *gox2* (**Fig. 20**). Se empleó DNA genómico de las cepas Ed8, 593 y A732 se realizó ensayos de PCR punto final para determinar la temperatura de alineamiento más adecuada para la amplificación del producto específico para cada pareja de oligonucleótidos. La figura 20 muestra las temperaturas 45, 50 y 55 °C utilizadas en el ensayo de PCR punto final la amplificación de los promotores del gen *goxC* de la cepa 593 y A732. La temperatura más adecuada para *gox2* de la cepa A732 fue de 45 °C, el DNA de la cepa Ed8 no amplifica a ninguna de estas temperaturas ensayadas. Por lo tanto se probaron otras temperaturas de amplificación donde se determinó que la temperatura para *goxC* de la cepa 593 fue de 65 °C al igual que para el gen *goxC* y *gox2* de la cepa Ed8 (**Fig. 21**), donde se muestran todos los promotores amplificados y purificados, se procederá en un futuro próximo a realizar la secuenciación de cada uno de dichos fragmentos para ubicar posibles diferencias.

Tabla 7. Posibles factores de transcripción que participan en la regulación de la expresión de *goxC*

Nombre	Familia	Función
HAP2	NFY CCAAT-binding	Activador de la transcripción y regulador de la expresión génica respiratoria.
GLN3	GATA	Activador transcripcional de genes regulados por nitrógeno.
MSN2	BetaBetaAlpha-zinc finger	Activador transcripcional, se activa en condiciones de estrés.
MSN4	BetaBetaAlpha-zinc finger	Activador transcripcional, se activa en condiciones de estrés.
RGM1	BetaBetaAlpha-zinc finger	Factor de transcripción putativo de unión a Zinc, induce la expresión de genes involucrados en el catabolismo de monosacáridos y el metabolismo de aldehído.
RIM101	BetaBetaAlpha-zinc finger	Represor transcripcional, responsable de reprimir genes que participan en la adaptación de un medio alcalino. Participan en la estructura de la pared celular.
FHL1	Forkhead	Regulador de la transcripción de la proteína ribosomal.
UPC2	Fungal Zn cluster	Inductor de la transcripción de genes de biosíntesis de esterol.
SKN7	E2F	Regulador de respuesta nuclear y factor de transcripción, necesario para la inducción de genes que responden al estrés oxidativo.
ARG80	MADS	Factor de transcripción involucrado en la regulación de los genes que responden a la arginina.

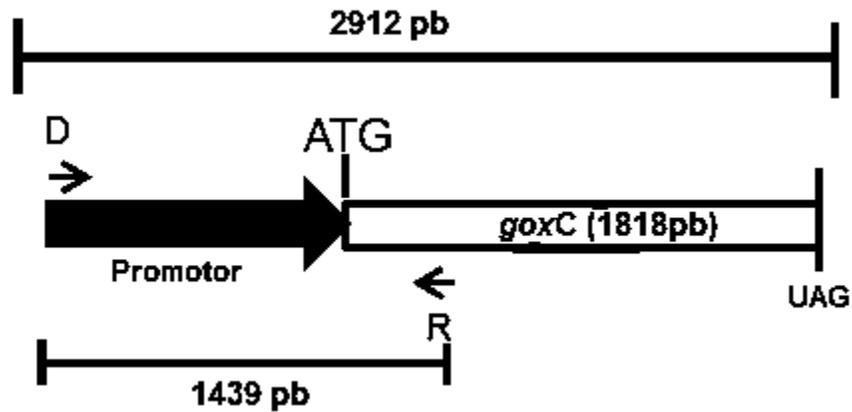
Se usó el programa <http://jaspar.genereg.net>

Tabla 8. Posibles factores de transcripción que participan en la regulación de la expresión de *gox2*

Nombre	Familia	Función
HAP2	NFY CCAAT-binding	Activador de la transcripción y regulador de la expresión génica respiratoria.
ASG1	Fungal Zn cluster	Proteína con un grupo de zinc propuesto para funcionar como regulador que participa en la respuesta al estrés.
CAT8	Fungal Zn cluster	Activador transcripcional de grupos de Zinc.
SUT1	Fungal Zn cluster	Proteína de función desconocida, miembro de la familia multigénica seripauperin.
GLN3	Zinc-coordinating	Activador transcripcional de genes regulados por nitrógeno.
YLL054C	Fungal Zn cluster	Proteína de función desconocida.

Se usó el programa <http://jaspar.genereg.net>

(A)



(B)

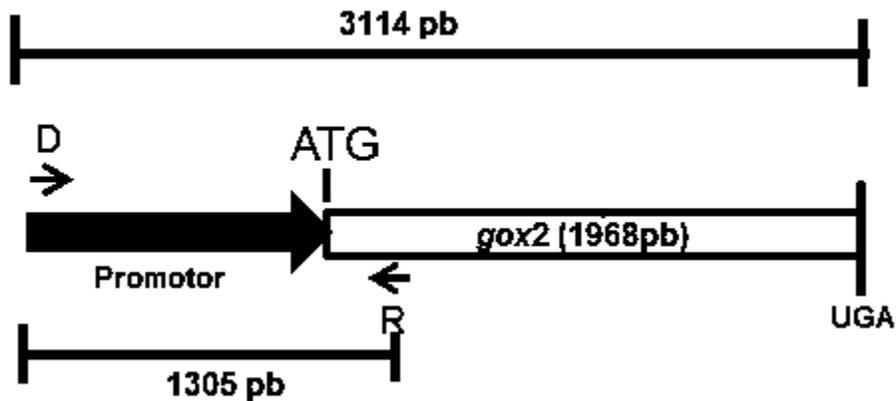


Figura 19. Representación esquemática de los promotores de los marcos de lectura de *goxC* y *gox2*. Esquemas que representan el acomodo de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR de los promotores de los genes *goxC* (A) y *gox2* (B). Las líneas comprendidas entre D (oligonucleótido directo) y R (oligonucleótido reverso) indican los productos de PCR predichos para cada gen. Los números entre paréntesis muestran los tamaños de los ORFs de los genes *goxC* y *gox2*. El tamaño de los promotores y sus ORFs, se muestra con una línea en la parte superior de cada una de las figuras. ATG representa el codón de inicio de la traducción, UGA y UAG representan los codones de paro.

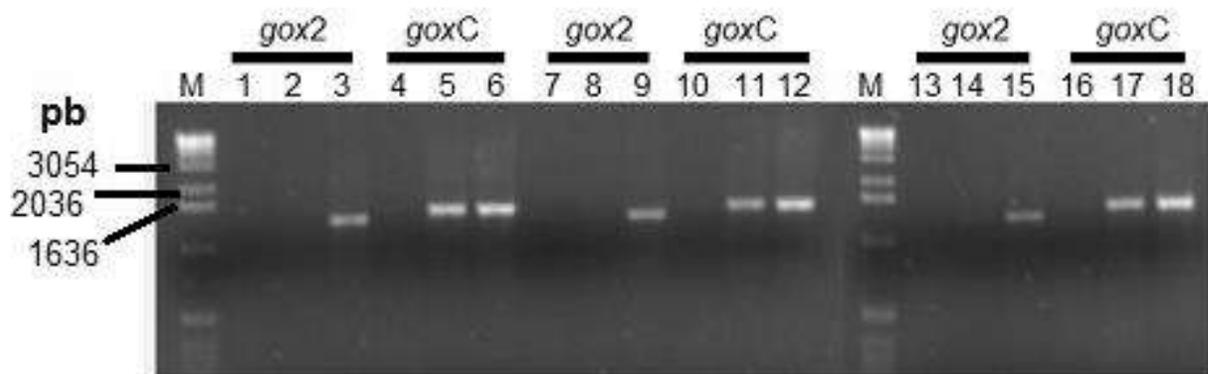


Figura 20. Amplificación mediante PCR de la región promotora de los genes *goxC* y *gox2* en las cepas Ed8, 593 y A732. Se utilizó diferentes temperaturas (45, 50, y 55 °C), Carril 1-6 corresponde a la temperatura de amplificación de 45°C; Carril 7-12 corresponde a la temperatura de 50°C y el carril 13-18 son correspondientes a la temperatura de 55°C. Las muestras de la cepa Ed8 se encuentran en los carriles 1,4, 7, 10 y 13 con el gen representado. Los carriles 2, 5, 8, 11, 14, 17 corresponden a la cepa 593. Y los carriles 3, 6, 9, 12, 15 y 18 corresponden a la cepa A732.

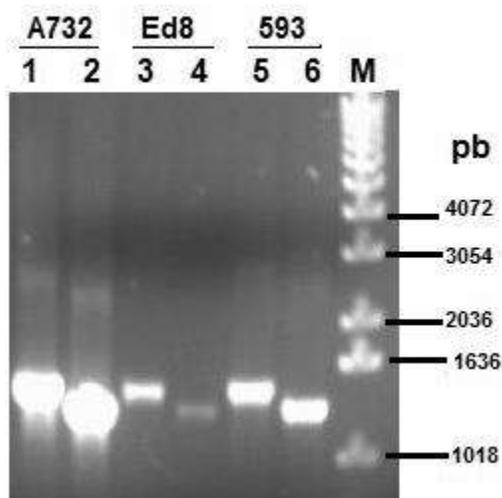


Figura 21. Amplificación de los promotores *gox2* y *goxC* en la cepa A732, Ed8 y 593. Los productos generados por PCR de los genes *goxC* y *gox2* de las cepas A732, Ed8 y 593, fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden al gen *goxC* y los carriles 2, 4 y 6 corresponden al gen *gox2*. Se observa la banda esperada de los 6 promotores que es de aproximadamente 1500 pb.

(A)



(B)

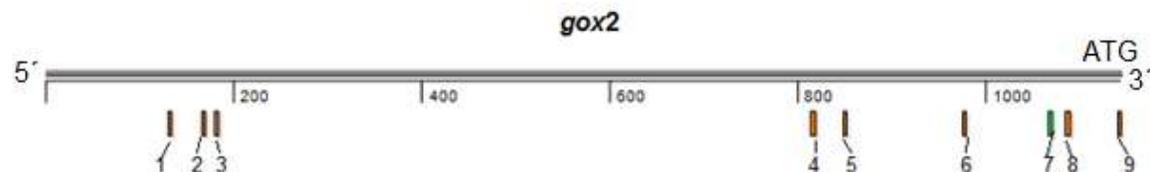


Figura 22. Análisis *in silico* de las secuencias promotoras de *goxC* (A) y *gox2* (B). Se localizaron las secuencias consenso para unión a diversos factores de transcripción para *goxC*: 1) HAP2 (TTGGT), 2) GLN3 (GATAA), 3) MSN2 (AGGGG), 4) RIM101 (CGCCAAG), 5) RIM101 (CGCCAAG), 6) FHL1 (GACGCAA), 7) UPC2 (TATACGA), 8) SKN7 (GGCCAT), 9) ARG80 (AGACGC), 10) CAAT, 11) MSN2 (AGGGG), 12) GNL3 (GATAA), 13) HAP2 (TTGGT), 14) TATAA. Para *gox2*: 1) HAP2 (TTGGT), 2) TATAA, 3) CAT8 (CCGGAA), 4) SUT1 (CGCGGGG), 5) HAP2 (TTGGT), 6) GLN3 (GATAA), 7) CAAT, 8) YLL054C (CGGCCGA), 9) HAP2 (TTGGT). Se usó el programa <http://jaspar.genereg.net>

7. DISCUSIÓN

Se encontraron 3 genes homólogos a *goxC* en el genoma de *A. niger* (*gox2-4*), lo cual concuerda con lo reportado anteriormente, de los cuales tres de los genes son extracelulares y un intracelular **(Pel y col., 2007)**. Por otra parte cabe ser mención que los dominios que definen a este tipo de oxidorreductasa son los siguientes: dominio 1.GMC_OXRED_1; dominio 2.GMC, RCC1_2 y dominio 3.GMC_OXRED_2 GMC, estos tres dominios se encuentran únicamente en *goxC*, mientras que *gox3* tiene los dominios 1 y 3 y *gox2* solo cuenta con el dominio 1.

De estos genes *goxC*, *gox2* y *gox3* tienen un péptido señal de secreción lo cual hace suponer la existencia potencial de más de una enzima responsable de la actividad de GOX extracelular, sin embargo, lo reportado por **(Zetelaky y Vas 1968)** en la cepa de *A. niger* demostró que únicamente el producto del gen *goxC* es el responsable de la actividad extracelular de *gox*. Nuestros estudios demuestran que en la cepa Ed8 se expresa *goxC*, sin embargo, no registramos expresión para *gox2* en ninguna de las condiciones empleadas, mientras que en la cepa A732 se expresan ambos genes. Lo que indica que al menos en la cepa Ed8 la actividad extracelular de GOX es atribuida principalmente al producto del gen *goxC*.

El análisis *in silico* de la secuencia de los promotores (se consideraron 1000 pb antes del ATG como región promotora) de los genes *goxC* y *gox2*, muestran una baja identidad entre ellos (19.4%), lo que indica la existencia de distintas cajas consenso para factores de transcripción.

Se ha descrito que altos niveles de glucosa es un inductor de la expresión del gen *goxC* **(Zetelaki y Vas., 1968)**, los estudios realizados de **(Rodriguez., 2013 datos no publicados)** muestran una dependencia de la concentración de glucosa en el medio en 5 y 10% para una mayor actividad de GOX, sin embargo como se puede observar en la figura 5 que la cepa A732 necesita una concentración de glucosa

40 veces mayor, para que alcance una actividad similar a la cepa Ed8 lo que sugiere la posibilidad de distintos mecanismos de regulación.

8. CONCLUSIONES

Se diseñaron sondas para los genes *goxC* y *gox2*, para lo cual usando como sonda el gen *gox* de la cepa de *A. niger var. tubingensis* se hizo una búsqueda de homólogos en el genoma de *A. niger* y se encontraron 28 genes con cierta similitud a *goxC*, siendo tres (*gox2-4*) cuyos productos fueron los que mostraron mayor identidad con GOXC (superior al 26%). A pesar del alto grado de identidad entre las secuencias de los genes *gox* y mediante herramientas bioinformáticas se diseñaron las sondas de hidrolisis secuencias específicas para *goxC* y *gox2*, las cuales fueron confirmadas en los experimentos llevados a cabo.

Se cuantificó la cantidad exacta de número de copias del gen *goxC* presentes en las muestras de RNA analizadas. El análisis del número de copias de transcrito del gen *goxC* de la cepa Ed8 en las diferentes condiciones de crecimiento, demostró:

1. El factor principal que determina la expresión del gen *goxC* es el tiempo de crecimiento debido a que se registró la mayor cantidad de número de copias de *goxC* a las 60 h de crecimiento con 10% de glucosa.

El análisis del número de copias de transcrito del gen *goxC* de la cepa A732 en las diferentes condiciones de crecimiento, demostró:

1. Al 1% de glucosa en todos los tiempos se registró la mayor cantidad de número de copias del gen *goxC*, sin embargo a las 48 h se registró la mayor expresión.

La cepa A732 muestra niveles de expresión de *goxC* mayores a la cepa Ed8, esto contrasta con la actividad de GOX, ya que en ensayos realizados la cepa Ed8 muestra mayor actividad enzimática, lo que podría indicar que la actividad de GOX no está regulada por el número transcrito del gen *goxC*.

β -actina presenta niveles de expresión similares (Ct) en todas las condiciones probadas, además tiene una eficiencia de 87% por lo tanto β -actina fue el mejor gen constitutivo para este trabajo.

La clonación de los promotores de las distintas cepas se amplificaron a diferentes temperaturas, la cepa Ed8 necesito una temperatura más alta con respecto a la cepa 593 y A732, esto puede ser debido a una diferencia en el contenido de G y C.

En conclusión no hay correlación entre la alta actividad de la cepa Ed8 con los niveles de transcrito, ya que la cepa Ed8 tiene niveles inferiores de transcrito *goxC* en algunas condiciones a la cepa A732. Además este estudio vuelve a confirmar que al producto del gen *goxC* como el principal responsable de la actividad de GOX, ya que los niveles de RNAm de *gox2* son muy bajos o nulos en la cepa Ed8.

9. BIBLIOGRAFÍA

- AbuSara NF (2006) Honey as antimicrobial agent. Waikato Honey Research Unit, The University of Waikato, New Zealand
- BACAS (2004) Industrial biotechnology and sustainable chemistry. Royal Belgian Academy Council of Applied Science, Belgium
- Baker S.(2006). *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the Future. *Medical Mycology*. 44: S17-S21.
- Brookes GC, Neville, Kniel B (2005) And analysis of labeling requirements, market dynamics and cost implications. *The Global GM Market—implications for the European food chain*. UK: PG Economics Limited.
- Clarke, K.G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., y Harrison, S.T. (2006). Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger* *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:72-77

- Eichenseer H, Mathews MC, Bi JL, Murphy JB, Felton GW (1999) Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for Helicoverpa zea? Arch Insect Biochem 42:99–109
- Espino Saldaña, A.E. (2002). Aislamiento y caracterización de hongos resistentes a cromatos nativos de desechos industriales. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato.
- Frederick K.R., Tung J., Emerick R.S., Masiarz F.R., Chamberlain S.H., Vasavada A., Rosenberg S., Charkrabaty S., Schopfer L.M y Massey V. (1990). Glucose oxidase from Aspergillus niger. Cloning, gene sequence, secretion from Saccharomyces cerevisiae and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. J. Biol Chem. 265:3793-3802.
- Hamlyn P (2000) Bringing the benefits of biotechnology to textiles and clothing. Symposium on Biotechnology in the Textile Industry. Available: http://fungus.org.uk/cv/biotexnet_8.htm. Accessed 2007 Dec
- Hatzinikolaou DG, Hansen OC, Macris BJ, Tingey A, Kekos D, Goodenough P, et al. A new glucose oxidase from Aspergillus niger characterization and regulation studies of enzyme and gene. Appl Microbiol Biotechnol 1996;46:371–81.
- Kim KK, Fravel DR, GC P (1990) Glucose oxidase as the antifungal principle of talaron from Talaromyces flavus. Can J Microbiol 36:760–764
- Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. (2006). Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. J Biotechnol. 123(3):273-80. Epub 2006 Jan 18.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, (Eds. y Comp.). Principios de Micología Médica. Clínica, Diagnóstico y Terapéutica. México: Méndez Editores. ISBN: 978-607-7659-07-5. 2009; 296 pp.
- Martins- Das L.C., Vitolo M. y Vitolo N. (2007). Use of Glucose Oxidase in a Membrane Reactor for Gluconic Acid Production. Applied Biochemistry and Biotechnology. 136: 161- 170.

- Marks NE, Grandison AS, Lewis MJ (2001) Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized milk. *J Appl Microbiol* 91:735–741
- Mathews C.K., van Holde K.E. y Ahern K.G.(1999). *Biochemistry*, 3th ed. San Francisco: Addison Wesley Longman. pp:291, 551-552.
- Metosh-Dickey C.A., Mason R.P., Winston G.W. (1998). Single electron reduction of xenobiotic compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Free Radical Biology and Medicine*. 24(1): 155-160.
- Meulenber R., Menke H., Mortimer M.A., Nielsen J., G Oliver S., Olsthoorn M., Pal K., Noe I N M E van Peij, Ram A. J., Rinas U., Roubos J.A., Cees M
- Mikhailova, R.V., Logbanok, A.G., Shishko, Zh.F. y Iasenok, M.I. (2000). Effect of conditions of culturing *Penicillium funiculosum* G-15 on production of extracellular glucose oxidase. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya* 36:199-203.
- Morton A, MacMillan A. The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J Exp Bot* 1954;5:232–52.
- Musser RO, Cipollini DF, Hum-Musser SM, Williams SA, Brown JK, Felton GW (2005) Evidence that the caterpillar salivary enzyme glucose oxidase provides herbivore offense in solanaceous plants. *Arch Insect Biochem* 58:128–137
- Ohashi K, Natori S, Kubo T (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an agedependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur J Biochem* 265:127–133.
- Passarge Eberhard. *GENETICA, texto y atlas 3rd Edición*. España. Editorial medica panamericana 2007. 52 y 53. ISBN: 978-84-9835-192-7.
- Pel J.H., H de Winde J., Archer B. D., Dyer S. P., Hofmann G., Schaap J P., Turner G., P de Vries R., Albang R., Albermann K., Andersen R. M, D Bendtsen J., Benen AE. J., van den Berg M., Breestraat S., Caddick M. X., Contreras R., Cornell M., Coutinho P. M., Danchin G E., Debets J.M., Dekker P., W M van Dijck, Alard van Dijk, Dijkhuizen L., Driessen JM C., d’Enfert C., Geysens S., Goosen C., Groot G. S.P., W J de Groot, Guillemette T., Henrissat B., Herweijer M., Johannes P T W van den

Hombergh, Cees A M J J van den Hondel, Rene T J M van der Heijden, Rachel M van der Kaaij, Frans M Klis, Harrie J Kools, Christian P Kubicek, Patricia A van Kuyk, Juergen Lauber, Xin Lu, Marc J E C van der Maarel, J Sagt, Schmoll M., Sun J., Ussey D., Varga J., Vervecken W., Peter J J van de Vondervoort, Wedler H., Han A B Woosten, An-Ping Zeng, Albert J J van Ooyen, Jaap Visser & Hein Stam, (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature*, 25(2):222-231.

- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 1: 29-45.
- Pluschkell S, Hellmuth K, Rinas U. Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng* 1996;51:215–20.
- Rodríguez Preciado S. Y. 2011. Secuenciación y clonación de un gen *gox* en la cepa ambiental Ed8 de *Aspergillus niger* var. *tubingensis*. Tesis de licenciatura.
- Rodríguez Reyes C. 2011. Estudio comparativo de la producción de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en cepas de *Aspergillus* sp. Tesis de licenciatura. División de Ciencias naturales y exactas, Universidad de Guanajuato, campus Guanajuato.
- Rodríguez Reyes C. 2013. Regulación de la producción de actividad *Gox* secretable en cepas de *Aspergillus niger*. Tesis de maestría en proceso. División de Ciencias naturales y exactas, Universidad de Guanajuato, campus Guanajuato.
- Rogalski J, Fiedurek J, Szczordrak J, Kapusta K, Leonowicz A. Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant. *Enzyme Microb Technol* 1988;10:508–11.
- S Ramachandran, P Fontanille, A Pandey and C Larroche. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food technol. biotechnol.* 2006; 44, 185-95.
- Sánchez Becerra D. 2012. Sobreexpresión de un gen codificante para una enzima *gox* secretable en la cepa ed8 de *Aspergillus niger* var. *tubingensis*.

Tesis de maestría. División de Ciencias naturales y exactas, Universidad de Guanajuato, campus Guanajuato.

- Sandip B. Bankar, Mahesh V. Bule, Rekha S. Singhal, Laxmi Ananthanarayan. Glucose oxidase- An overview (2009) *Biotechnology Advances* 27:489-501
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., van Dijck P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:426–435.
- Shin K-S, Youn H-D, Han Y-H, Kang S-O, Hah YC (1993) Purification and characterisation of d-glucose oxidase from whiterot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem* 215:747–752
- Stanbury P, Whitaker A, Hall S. *Principles of Fermentation Technology*. Second edition. New Delhi, India: Aditya books Private Limited; 1997. p. 93–105.
- Wilson, R. y Turner, A.P. F. (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics* 7:165-185
- Wong, Ch. M., Wong, K. H. y Xiao Dong Chen, X.D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:927–938
- Zetelaki K, Vas K. The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture. *Biotechnol Bioeng* 1968;10:45–59.