

Obtención de una construcción molecular para alterar genéticamente la producción de manitol en la cepa ambiental Ed8 de *Aspergillus tubingensis*

Cindy Nayely Olivares Medina (1), J. Félix Gutiérrez Corona (2)

1 [Licenciatura en químico, División de Ciencias Naturales y Exactas] | Dirección de correo electrónico: [cindy.olivares@live.com]

2 [Departamento de biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [xilefegu@gmail.com]

Resumen

Los compuestos de cromo son contaminantes ambientales debido a su uso en diferentes actividades industriales; el cromo hexavalente [Cr(VI)], en la forma de cromato y dicromato, es altamente tóxico y genotóxico para distintas formas de vida, habiéndose descrito que esto es debido a que produce estrés oxidativo en las células. Dado que se ha propuesto que el manitol funciona como amortiguador de especies reactivas de oxígeno y como fuente de poder reductor en las células y que se ha reportado que en *A. niger* la producción de manitol ocurre por la acción de la enzima manitol 1-fosfato deshidrogenasa, codificada por el gen *m1pd*, en el presente proyecto se realizaron experimentos para obtener una construcción molecular para realizar la interrupción del gen *m1pd* en la cepa ambiental Ed8 de *A. tubingensis*. Para ello, se utilizó la estrategia de "Split Marker" (marcador interrumpido) que se basa en el PCR de fusión, mediante la cual se generaron dos fragmentos de aproximadamente 1.5 kb del gen *m1pd* (fragmentos 5' y 3') fusionados cada uno a un fragmento que corresponde a aproximadamente 3/4 partes del casete de resistencia a higromicina (*Hyg^R*). Los fragmentos generados se denominaron 5MH y 3MH.

Abstract

Chromium compounds are environmental pollutants because of their use in various industrial activities; hexavalent chromium [Cr(VI)], in the form of chromate and dichromate, is highly toxic and genotoxic for different life forms, because it produces oxidative stress in the cells. Since it has been proposed that mannitol works counteracting the effect of reactive oxygen species and as a source of reducing power in the cells and that has been reported that in *A. niger* mannitol production occurs by the action of the enzyme mannitol-1-phosphate dehydrogenase (M1PD), encoded by the gene *m1pd*, in this project experiments were performed to obtain a molecular construct for the disruption of this gene in the environmental strain *A. tubingensis* Ed8. To do this, the "Split Marker" strategy was employed; this is based on fusion PCR, whereby 5' and 3' *m1pd* gene fragments of approximately 1.5 kb were fused to a fragment corresponding to approximately 3/4 of the hygromycin resistance gene (*Hyg^R*). The generated DNA fragments were termed 5MH and 3MH.

Palabras Clave

A. niger var *tubingensis* Ed8; Manitol fosfato deshidrogenasa; Interrupción génica

INTRODUCCIÓN

Entre los metales, el cromo ha atraído amplio interés público y de agencias regulatorias a nivel mundial debido a la toxicidad que ejerce sobre los ecosistemas, incluyendo microorganismos y animales. La toxicidad del Cr(VI) se debe a que es transportado activamente en las células y que dentro de ellas genera intermediarios reducidos como Cr(IV) y Cr(V), cuya producción se acompaña de la formación de especies reactivas de oxígeno, con el consecuente daño a diferentes macromoléculas [1].

Se ha descrito que en sitios contaminados con altas concentraciones de Cr(VI) pueden proliferar especies de microorganismos con mecanismos de resistencia y/o tolerancia al metal [2]. La cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis* es un hongo filamentoso aislado de un sitio contaminado con altas concentraciones de Cr(VI). Entre algunas de las características principales de esta cepa se encuentran su tolerancia a Cr(VI) y su capacidad para transformar a éste en Cr(III) [3]; además, se ha determinado que en presencia de Cr(VI) el hongo produce una mayor cantidad de metabolitos como el manitol [4].

Se ha propuesto que el manitol funciona como amortiguador de especies reactivas de oxígeno y como fuente de poder reductor en las células, estableciéndose que en el hongo *A. niger* la producción del manitol es necesaria para la protección contra el estrés oxidativo [4]. Mediante un enfoque genético se demostró que en *A. niger* la enzima Manitol fosfato deshidrogenasa (M1PD), codificada por el gen *m1pd* participa de manera importante en la producción de manitol por el hongo [5]. En estudios previos del grupo de trabajo, se determinó la secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto de un gen *m1pd* de la cepa Ed8 de *A. tubingensis* [6].

En base a lo mencionado anteriormente, resulta de interés investigar en la cepa Ed8 de *A. tubingensis* el papel de la producción de manitol en la protección contra el estrés oxidativo que causa el Cr(VI). Por ello, se plantea como objetivo en este trabajo

obtener una construcción molecular que permita alterar genéticamente la producción de manitol en la cepa Ed8, mediante la interrupción del gen *m1pd* codificante de la enzima responsable de dicho proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medios de cultivo

Para la obtención de ADN genómico se usó la cepa tolerante a cromo Ed8 de *A. tubingensis* [3]; para la producción de conidias y la obtención de micelio se empleó el medio Papa Dextrosa líquido y sólido, respectivamente. Para la propagación de plásmidos se empleó la cepa DH5 α de la bacteria *E. coli* cultivada en medio Luria Bertani suplementado con Ampicilina 100 μ g/ml.

Extracción de ADN genómico

Empleando micelio de la cepa Ed8 se realizó la extracción de ADN genómico según el protocolo descrito por Aljabani y Martínez (1997) [7]. Para comprobar la integridad del ADNg este se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio; la presencia de una banda de alto peso molecular es indicativa de la integridad del DNA obtenido. Para determinar la calidad del ADNg se realizó una reacción de PCR control, en la que se amplificó un fragmento del gen codificante de actina; para esto, se emplearon los oligonucleótidos ACT-FW y ACT-RV y la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico de colonias transformantes de *E. coli* con el vector pSilent-1 se empleó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, EUA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para comprobar la integridad del ADN plasmídico se emplearon los oligonucleótidos HYG-FW y HYG-RV que amplifican un fragmento del gen de resistencia a higromicina, se usó la enzima

DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, EUA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Construcción para la interrupción del gen *m1pd* mediante Split Marker

Se amplificaron las regiones que flanquean al gen *m1pd* y el casete *HygR*. Para amplificar la región flanqueante 5' se emplearon los oligonucleótidos *m1pdA* y *m1pdB_HF* y para la región 3' se emplearon los oligonucleótidos *m1pdC_HR* y *m1pdD*; se utilizó ADN_g de la cepa *Ed8* como templado. Para amplificar el casete *HygR* se emplearon los oligonucleótidos *HF_m1pdB* y *HR_m1pdC* usando como templado el plásmido *pSilent-1*. Los oligonucleótidos *m1pdB_HF* y *m1pdC_HR* llevan extensiones en sus extremos 5' complementarias a los oligonucleótidos *HF_m1pdB* y *HR_m1pdC*, respectivamente. Del mismo modo, los oligonucleótidos *HF_m1pdB* y *HR_m1pdC* llevan extensiones en sus extremos 5', complementarias a los oligonucleótidos *m1pdB_HF* y *m1pdC_HR*, respectivamente. De esta manera se facilita la fusión entre las regiones flanqueantes de *m1pd* y el casete *HygR*. Los tres productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit comercial *GeneJET Gel Extraction* (Thermo Scientific, EUA) bajo las especificaciones del fabricante. A continuación, cada región flanqueante se fusionó al casete *HygR* mediante una primera PCR de fusión. Para la construcción 5'-*Hyg* se emplearon como moldes la región 5' flanqueante *m1pd* y el casete *HygR*. A su vez, para la construcción 3'-*Hyg* se emplearon como moldes la región 3' flanqueante *m1pd* y el casete *HygR*. En esta ronda de PCR se produjo la extensión de los extremos 3' complementarios entre ambas secuencias, ya que no se añadieron cebadores a la mezcla de reacción. Ambas reacciones de amplificación se llevaron a cabo en condiciones estándar empleando 100 ng de fragmento flanqueante y 300 ng de casete *HygR*. En todos los casos se utilizó la enzima *High Fidelity PCR enzyme mix* (Thermo Scientific, EUA). Por último, se realizó una segunda reacción de PCR de fusión empleando como molde 2 μ l del producto obtenido en la primera PCR de fusión. En este caso la mezcla de reacción contenía los iniciadores

m1pdE e *HygE*, o *HygF* y *m1pd F*, para la amplificación de los fragmentos de fusión 5'- $\frac{3}{4}$ *HygR* y $\frac{3}{4}$ *HygR*-3', respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo empleando la enzima *High Fidelity PCR enzyme mix* (Thermo Scientific, EUA). Los productos obtenidos se purificaron del gel de agarosa, utilizando el kit comercial *GeneJET Gel Extraction* (Thermo Scientific).

Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en cámaras horizontales, a un voltaje constante 1-4 V/cm. Las imágenes fueron tomadas en el fotodocumentador *ChemiDocTMMP* (Bio-Rad, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar la construcción de interrupción del gen *m1pd* se siguió la estrategia denominada "Split Marker" [8], que consiste en la introducción de un fragmento de ADN lineal conteniendo el casete de resistencia a higromicina (*HygR*), flanqueado por fragmentos de 1.5 Kb correspondientes a las regiones 5' y 3' del gen a interrumpir. Para ello se requieren dos construcciones, cada una conteniendo una de las regiones flanqueantes del gen *m1pd* y aproximadamente tres cuartas partes del casete *HygR*. La recombinación homóloga entre las regiones complementarias del casete *HygR* y entre las regiones flanqueantes del gen *m1pd* (5'*m1pd* y 3'*m1pd*) y sus homologas en el genoma de la cepa *Ed8* resultara en el reemplazo del marco de lectura abierto gen *m1pd* por el casete *HygR* intacto, dicho casete servirá para seleccionar mutantes resistentes a higromicina.

Las reacciones que se muestran en la imagen 1 se realizaron para demostrar que los templados utilizados estaban en condiciones adecuadas para su empleo en la amplificación de los fragmentos deseados para realizar la construcción de interrupción del gen *m1pd*.

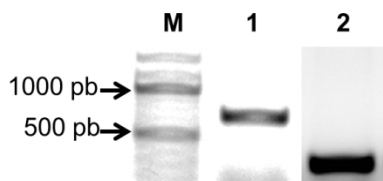


IMAGEN 1: Reacciones de amplificación de fragmento de actina usando como templado ADN_g de Ed8 (1) y un fragmento del gen de resistencia a Hyg usando como templado pSilent-1 (2).

Una vez que se corroboró lo anterior, se realizó la amplificación de cada uno de los fragmentos requeridos para realizar la construcción, por una parte se amplificaron los fragmentos 5'm1pd y 3'm1pd de alrededor de 1474 y 1413 pb y el casete de resistencia a Hyg de 1906 pb aproximadamente (Imagen 2).

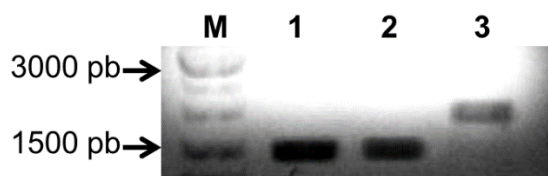


IMAGEN 2: Amplificaciones de los fragmentos 5'm1pd (1), 3'm1pd (2) y el casete de resistencia a higromicina (3).

Una vez que se obtuvieron los fragmentos mencionados anteriormente se purificaron y se llevaron a cabo dos PCRs de fusión, la primera reacción para fusionar el fragmento 5'm1pd al casete de resistencia a higromicina y la segunda para fusionar el casete de resistencia a higromicina con el fragmento 3'm1pd. Ambas fusiones se usaron para amplificar los dos fragmentos 5MH y 3MH; en la imagen 3 se muestra la electroforesis de ambas reamplificaciones, de alrededor de 2,900 pb.

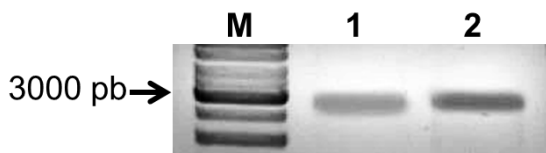


IMAGEN 3: Electroforesis de las PCR's de fusión de 5' m1pd con el casete de resistencia a Hyg' (1) y la de 3' m1pd con el casete de resistencia a Hyg' (2), ambos fragmentos de 2900 pb.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron las construcciones 5HM y 3HM para la interrupción del gen *m1pd* mediante Split Marker, las cuales servirán para emplearse en la transformación de células de la cepa Ed8 de *A. niger* para la obtención de cepas mutantes *m1pd::hyg*.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Arturo y Graciela, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado. A la LAQB Pamela Romo Rodríguez, por todo el apoyo y enseñanzas durante la realización de este proyecto, aprendí mucho de ella. Al Dr. J. Félix Gutiérrez Corona, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar el proyecto en su laboratorio. Al Dr. Adolfo López Torres, por la paciencia, dedicación e interés en la enseñanza teórica que me brindó. Al equipo de trabajo FGC, por el buen ambiente laboral. A veranos UG, por darme la oportunidad de participar en dicha investigación y la beca otorgada.

REFERENCIAS

- [1] Liu, K. y Shi, X. (2001). In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222:41-47.
- [2] Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J.C., Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS microbiology reviews*, 25(3), 335-347.
- [3] Acevedo-Aguilar, F.J., Espino-Saldaña, A.E., Leon-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., Wrobel, K., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M. y Gutierrez-Corona, J.F. (2006). Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous from contaminated wastes. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 809-815
- [4] Acevedo-Aguilar F.J. (2008). Desarrollo y aplicación de diferentes metodologías analíticas para el estudio del proceso de reducción de Cr(VI) por la cepa Ed8 (*Aspergillus niger* sp.) Tesis de Maestría, Posgrado en Química. Universidad de Guanajuato

- [5] Ruijter, G.J.G., Bax, M., Patel, H., Flitter, S.J., Vondervoort, P.J.I. van de, Vries, R.P. de, Kuyk, P.A. van y Visser, J. (2003). Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic Cell*, 2: 690-698.
- [6] Rodríguez Carrillo, P.L., Gutiérrez Corona, J.F., López Torres, A. (2005). Secuenciación y estudio de expresión por RT-PCR del gen M1PD de la cepa resistente a cromato Ed8 de *Aspergillus niger*. 14o Verano de la Investigación Científica.
- [7] Aljabani, S.M., and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.
- [8] Wirsel S., Turgeon B.G., Yoder O.C. (1996). Deletion of the *Cochliobolus heterostrophus* mating-type (MAT) locus promotes the function of MAT transgenes. *Curr. Genet*, 29: 241-249.