



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Establecimiento del hongo modelo *Ustilago maydis*
como plataforma de expresión de una proteína
heteróloga quimérica de *Babesia bigemina*.

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta

Biólogo: Daniel Alain Gallegos Almanza

Dirigido por

Doctor: José Antonio Cervantes Chávez

Querétaro, Qro 27/05/2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Establecimiento del hongo modelo *Ustilago maydis* como
plataforma de expresión de una proteína heteróloga
quimérica de *Babesia bigemina*.

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta

Biólogo Daniel Alain Gallegos Almanza

Dirigido por

José Antonio Cervantes Chávez

Presidente

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Secretario

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Vocal

Dr. Fidel Landeros Jaime

Suplente

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro. Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (mes y año)
México

Índice.....	iii
-Índice de figuras.....	v
-Índice de tablas.....	v
-Abreviaturas	vi
-Resumen.....	1
-Abstract.....	2
I. Introducción.....	3
II. Antecedentes.....	6
II.1.- Uso e importancia de las proteínas heterólogas.....	6
II.2.- Modelos de expresión de proteínas heterólogas.....	7
II.3.- Nuevos modelos de expresión de proteínas heterólogas.....	8
II.4.- Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	9
II.5.- Importancia de <i>U. maydis</i> a la ciencia.....	10
II.6.- Expresión de proteínas heterólogas en <i>U. maydis</i>	11
II.7.- <i>Babesia bigemina</i>	12
II.8.- Ciclo de vida de <i>B. bigemina</i>	13
II.9.- Signos clínicos de la babesiosis bovina.....	13
II.10.- Métodos actuales de detección de la babesiosis bovina.....	14
II.11.- Estudios inmunológicos de <i>B. bigemina</i>	15
II.12.- Implementación del uso de epítomos recombinantes.....	17
II.13.- Justificación.....	19
III. Hipótesis.....	20
IV. Objetivo general.....	21
IV. Objetivos específicos.....	21
V. Materiales y Métodos.....	22
V.1.- Reactivos y medios de cultivo.....	22
V.1.2.- Microorganismos utilizados.....	22
V.2.- Métodos generales.....	22
V.2.1- Extracción de ADN genómico.....	22
V.2.2.- Extracción de ADN plasmídico.....	23

V.2.3.- Extracción de ARN.....	24
V.2.4.- Síntesis de ADN complementario.....	25
V.2.5.- Transformación genética de <i>E. coli</i>	26
V.2.6.- Diseño del arreglo de la secuencia óptima de péptidos quiméricos Mic-1(A) y Gp45-1.....	27
V.2.7.- Plásmido pUMA2480.....	28
V.2.8.- Construcción del plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2).....	28
V.2.9.- Linearización de los plásmidos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1x2 para transformación genética de <i>U. maydis</i>	29
V.3.- Modificación genética de <i>U. maydis</i> para generar cepas transgénicas que expresen los epítomos Mic1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2):.....	30
V.3.1.- Identificación por PCR de cepas que portan el gen quimérico.....	31
V.3.2.- Obtención de péptidos recombinantes.....	31
V.3.3.- Determinación de proteína por el método de Bradford.....	32
V.3.4.- SDS-PAGE.....	33
V.3.5.- Detección del epítomo recombinante por Western blot.....	33
V.4.- Protocolo de Western blot.....	34
VI. Resultados.....	35
VI.1.- Plásmido pUMA2480:	35
VI.2.1.- Arreglo de epítomos Mic1 y Gp45.....	36
VI.2.2.- Optimización del uso de codones.....	37
VI.3.- Diseño de plásmido de expresión de los epítomos quiméricos.....	39
VI.4.- Plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2).....	40
VI.5.- Linearización del plásmido e integración del plásmido modificado.....	41
VI.6.- Transformación genética de <i>U. maydis</i>	42
VI.7.- Expresión de los genes quiméricos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1(x2).....	46

VI.8.- Identificación de la proteína Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2)....	49
VI.9.- Identificación de la proteína Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2) por Western blot.....	51
VII. Discusión.....	54
VIII. Conclusiones.....	62
IX. Perspectivas.....	63
X. Bibliografía.....	64
-Anexo 1.....	74

-Índice de figuras.

Figura 1.- Ejemplo de prueba diagnóstica	17
Figura 2.- Resultados plásmido pUMA2480	35
Figura 3.- Arreglo gen quimérico Mic-1(A) Gp45-1.....	36
Figura 4.- Arreglo gen quimérico Mic-1(A) Gp45-1(x2).....	37
Figura 5.- Codones optimizados tablas	37
Figura 6.- Codones optimizados con programa bioinformático.....	38
Figura 7.- Resultados Obtenidos por BLAST.....	39
Figura 8.- Digestión plásmidos modificados	40
Figura 9.- Mapas de plásmidos modificados.....	41
Figura 10.- Diagrama de integración del plásmido.....	42
Figura 11.- Cepas transformantes obtenidas.....	43
Figura 12.- Diagrama de oligonucleótidos usados en este trabajo.....	44
Figura 13.- Identificación de transformantes por PCR (2 kb).....	45
Figura 14.- Identificación de transformantes por PCR (1 kb).....	46
Figura 15.- Resultados de PCR de ADNc de 20 h y 44 h.....	47
Figura 16.- Resultados de PCR de ADNc.....	48
Figura 17.- Resultados de PCR de ADNc en medio mínimo	49
Figura 18.- Resultados de SDS-PAGE.....	51
Figura 19.- Resultados de Western blot.....	52

-Índice de tablas.

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..- Epítomos de <i>B. bigemina</i> derivados de las proteínas Mic1 y GP45.....	16
Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	26
Tabla 3.- Cepas transformantes obtenidas	49

-Abreviaturas:

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
AA	Ácido acético
AB33	cepa AB33
AcNa	Acetato de sodio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Cbx	Carboxina
D. O.	Densidad óptica
DCM-S	Medio doble completo con sorbitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
g, mg, µg	Gramo, miligramo, microgramo
HCl	Ácido clorhídrico
km	Kanamicina
LB	Medio Luria Bertani
M, mM	Molar, milimolar
MC	Medio completo
ml, µl	Mililitro, microlitro
MM	Medio mínimo
mm, µm	Milimetro, micra

MOPS	3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
RPM	Revolución por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
sp.	Especie (del latín Specie)
TA	Temperatura ambiente
β	Beta

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Resumen

La ciencia es impulsada por el desarrollo tecnológico, como el uso de organismos modificados genéticamente para la producción de compuestos de interés. Con este fin, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, plantas y cultivos celulares se han implementado. Aunque estos modelos son adecuados, también presentan limitantes como las reacciones inmunes cruzadas en bacterias o alteraciones en las modificaciones postraduccionales en levaduras.

Por esto, la búsqueda de nuevos modelos es imperativa, y actualmente *Ustilago maydis*, comúnmente conocido como huitlacoche, es un modelo novedoso, pues presenta ventajas como: su genoma secuenciado, modificación genética, rápido crecimiento y secreción no convencional de proteínas. Por ello puede ser una plataforma para la expresión de proteínas heterólogas. Por ejemplo, se le modificó exitosamente para producir la subunidad β de la toxina del cólera en el huitlacoche, y al alimentar ratones con éste, los ratones mostraron inmunidad contra la toxina del cólera. El sistema no convencional de secreción de proteínas, corresponde a la endoquitinasa Cts1, lo cual permite evitar las modificaciones postraduccionales de la ruta retículo endoplásmico rugoso-aparato de Golgi. Se expresó la enzima bacteriana β glucuronidasa "Gus", que posee una señal de glicosilación, la cual al ser glicosilada pierde su función; usando el sistema no convencional Gus no se glicosiló y mantuvo su actividad enzimática. Determinando que los péptidos unidos a Cts 1 son transportados y secretados al medio extracelular, y de esta forma se facilita su purificación. Por lo anterior, en este trabajo se planteó usar a *U. maydis* como plataforma para expresar dos epítomos inmunogénicos de las proteínas Mic-1(A) y Gp45-1, provenientes de *Babesia bigemina*, el parásito causante de la babesiosis bovina, una enfermedad que genera grandes pérdidas económicas y es de difícil diagnóstico. El objetivo de esta propuesta fue generar un gen quimérico compuesto de dichos epítomos y usar a cepas modificadas de *U. maydis* con este gen como plataforma de expresión.

Palabras clave: *Ustilago maydis*, Proteínas heterólogas, *Babesia bigemina*, secreción no convencional.

Abstract

Science is driven by technological development, such as the use of genetically modified organisms for the production of compounds of interest. With this end, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, plants and cell cultures have been used. Although these models are adequate, they also present limitations such as cross-reactions in bacteria or alterations in post-translational modifications in yeast.

For this reason, the search for new models is imperative, and *Ustilago maydis*, commonly known as huitlacoche, is a novel model. It has advantages such as: its sequenced genome, genetic modification, rapid growth and non-conventional protein secretion. Therefore, it can be a platform for the expression of heterologous proteins. For example, it was successfully modified to produce the β subunit of cholera toxin in huitlacoche, when feeding mice with it, the mice showed immunity against the cholera toxin. The non-conventional protein secretion system corresponds to the endochitinase Cts1, which allows to avoid post-translational modifications in the Golgi apparatus. The bacterial enzyme β glucuronidase "Gus" was expressed, which has a glycosylation signal, which loses its function when glycosylated; using the unconventional system, Gus did not glycosylate and maintained its enzymatic activity. Determining that the peptides bound to Cts 1 are transported and secreted to the extracellular medium, thus facilitating their purification.

Therefore, in this work it was proposed to use *U. maydis* as a platform to express two immunogenic epitopes of the Mic-1 (A) and Gp45-1 proteins, from *Babesia bigemina*, the parasite that causes bovine babesiosis, a disease that generates great economic losses and is difficult to diagnose. The objective of this proposal was to generate a chimeric gene composed of said epitopes and to use modified strains of *U. maydis* with this gene as an expression platform.

Key words: *Ustilago maydis*, heterologous proteins, *Babesia bigemina*, unconventional secretion.

I.- Introducción:

La producción de proteínas heterólogas que inició en el siglo pasado se ha convertido en uno de los mayores avances para el mundo actual, ya que gracias a esta tecnología es posible la producción de compuestos útiles y el avance para varias áreas cruciales para el desarrollo humano, tales como la industria alimenticia, farmacéutica, diagnóstica e investigación, (Demain & Vaishnav, 2009, Liponska et al., 2018).

Las proteínas heterólogas son expresadas en organismos modelo que son modificados genéticamente con dicho fin (Berlec & Strukelj, 2013, Kaur et al., 2017 Cai et al., 2018). Existen varios modelos de expresión, tales como las bacterias, los hongos, las plantas y los cultivos celulares (Demain & Vaishnav, 2009, Burdette et al., 2018, Rebello et al., 2018 Baghban et al., 2019).

La búsqueda de nuevos organismos para aplicar estas técnicas de modificación genética y mejorar la producción de proteínas llevaron al reciente uso de *Ustilago maydis* a ser empleado como un nuevo modelo, puesto que demostró la capacidad de producir y secretar al medio de cultivo proteínas heterólogas funcionales (Terfrüchte et al., 2017). *U. maydis* es un hongo patógeno exclusivo del maíz y del teocintle, en el maíz causa la enfermedad conocida como carbón o huitlacoche (Ruiz-Herrera, 2008). Además de ser un hongo que se cultiva fácilmente en condiciones de laboratorio, cuenta con diversas herramientas para su manipulación tanto genéticas, moleculares y de biología celular (Ruiz-Herrera, 2008), entre ellas su genoma secuenciado y de libre acceso desde el 2006, vectores de expresión, sistema de transformación, y lo más importante para este trabajo su sistema de secreción de proteínas no convencional descrito recientemente. Éste está dado por la proteína Cts1, que es una endoquitinasa que participa durante la gemación (Stock et al., 2012; Terfrüchte et al., 2017). Esta proteína al ser secretada por la vía no convencional, evita las modificaciones postraduccionales que se llevan a cabo en la ruta retículo endoplásmico rugoso-aparato de Golgi. De tal manera, que los péptidos fusionados a un fragmento de la proteína Cts1, serán secretados al medio de cultivo sin modificaciones postraduccionales, facilitando así su protocolo de purificación (Stock et al., 2012).

Por estas cualidades se puede emplear a *U. maydis* para la producción de proteínas heterólogas para diversos usos o funciones (Sarkari et al., 2014, Monreal-Escalante et al., 2016), una de ellas puede ser la expresión de péptidos de organismos causantes de enfermedades infecciosas que funcionan como epítomos. En este contexto, consideremos al parásito de bovinos *Babesia bigemina*, este patógeno produce la enfermedad no zoonótica llamada babesiosis en bovinos. Esta enfermedad produce grandes pérdidas económicas anualmente en el sector ganadero, debido a que produce variados signos clínicos tales como: debilidad general, fiebre, postración, anemia hemolítica, falta de apetito y en algunos casos la muerte del bovino o el aborto por parte de una vaca preñada (Almazán et al., 2018). Esta problemática genera pérdidas económicas por: 568 millones de dólares (Almazán et al., 2018). Es de particular importancia el hecho de que para la babesiosis no se cuenta a la fecha con métodos de diagnóstico eficientes, ya que presenta problemas de detección confiables, debido a que los métodos actuales producen reacciones cruzadas (Mosqueda et al., 2012, Almazán et al., 2018).

Es por ello que en este trabajo se modificó genéticamente a *U. maydis*, para llevar a cabo la expresión de péptidos de *B. bigemina*, a los cuales previamente se les determinó que tienen la capacidad de inducir respuesta inmune en conejos (Valdez 2015). Estos péptidos derivan de las proteínas Mic1 y Gp45, Mic1 es una proteína que se expresa en la micronemas de *B. bigemina* y es necesaria para que éste invada al eritrocito, mientras que Gp45 es una glicoproteína importante para la unión del parásito con el eritrocito ya que cuenta con un dominio de anclaje al ácido siálico. El análisis bioinformático de Mic1 y Gp45 predijo varios epítomos para cada una de estas proteínas, utilizamos los epítomos Mic1-1 (16 aminoácidos) y GP45-1 (19 aminoácidos) por ser específicos de *B. bigemina*, puesto que no cruzan con otras especies del género *Babesia*, esto determinado por análisis bioinformáticos (Mercado 2017). Para la expresión en *U. maydis*, se construyeron dos genes quiméricos utilizando repeticiones de dichos epítomos generando dos arreglos estructurales: Mic1-Gp45 repetido 10 veces, el cual produce un péptido de 36.8 KDa. Así como Mic1-Gp45-x2 repetido 6 veces, que produjo un péptido de

33 KDa. Con estos genes sintéticos que codifican epítomos quiméricos se obtuvieron cepas transgénicas de *U. maydis* a partir de las cuales se purificaron los epítomos quiméricos y que servirá como alternativa más barata para la producción de estos epítomos en comparación con otros métodos de síntesis.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

II.- Antecedentes:

II.1.- Uso e importancia de las proteínas heterólogas:

El uso de organismos para la producción de sustancias de interés para el ser humano ha tenido una larga historia. Inició desde los 1900 con las fermentaciones industriales, en los años subsecuentes se desarrollaron técnicas para sintetizar compuestos como acetonas y butanol, pero no fue hasta la década de los 70, con el descubrimiento de las técnicas de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) recombinante que se dio el auge para la producción de proteínas heterólogas siendo la primera la insulina humana (Liponska et al., 2018). Este avance tecnológico permitió así su producción en masa en condiciones de laboratorio (Demain & Vaishnav, 2009). Con el paso del tiempo y el avance de la tecnología, varios organismos fueron modificados para la producción de proteínas para aplicación en humanos. Por mencionar algunos, tenemos a la hormona de crecimiento, el factor de coagulación VIII, entre otros (Demain & Vaishnav, 2009; Unzueta et al., 2014).

En la actualidad, la gran mayoría del uso de los organismos modificados genéticamente para la producción de proteínas heterólogas entra en dos grandes áreas, el sector industrial como la producción de materias primas y solventes, así como el área farmacológica incluyendo el diagnóstico. Los organismos más usados de manera general son las levaduras, los hongos filamentosos y las bacterias, estos manipulados para la producción de compuestos o enzimas que puedan ser usados en la elaboración de: detergentes, polímeros, textiles, pulpas, papel, plásticos y combustibles (Jaeger et al., 2001, Demain & Vaishnav, 2009, Sasaki et al., 2019). Los organismos usados en el área farmacológica son más variados, además de los ya mencionados es común el uso de plantas y líneas de cultivos celulares, tanto de insectos como de mamíferos (Berlec & Strukelj, 2013). El enfoque de la producción son las moléculas o enzimas con un uso terapéutico, como las hormonas por ejemplo: la hormona humana del crecimiento, la insulina, actualmente se están empleado para producir una vasta variedad de moléculas inmunológicas como epítomos o anticuerpos, vacunas o bien sistemas de

detección (Demain & Vaishnav, 2009, Cui et al., 2018, Margolin et al., 2018, Nosrati et al., 2019).

II.2.- Modelos de expresión de proteínas heterólogas

Con este fin varios organismos han sido implementados, más notablemente la bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus spp* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, y hongos filamentosos como *Aspergillus sp*, también se han empleado algunas especies de plantas y últimamente cultivos de líneas celulares (Berlec & Strukelj, 2013). Los dos primeros son muy bien conocidos en el ámbito de la manipulación genética, y el desarrollo de métodos que aumentan la producción de estos compuestos (Kaur et al., 2017, Liponska et al., 2018, Teijaro et al., 2018) hoy en día existen cepas bien descritas que han sido modificadas para la producción de compuestos, que de otra manera su producción sería muy costosa y complicada de obtener, por ejemplo, la hormona de crecimiento (Berlec & Strukelj, 2013, Cai et al., 2018, Liponska et al., 2018, Baghban et al., 2019, Sun X., Su X. 2019).

Aunque estos modelos son adecuados, dependiendo del uso que se deseé dar al producto generado, también presentan inconvenientes. En el caso de la producción de una proteína con carácter antigénico en *E. coli*, dicha proteína puede co-purificar con otras proteínas que conducen a producir reacciones inmunológicas cruzadas lo cual puede complicar el proceso de purificación (Berlec & Strukelj, 2013). O bien alteraciones en los patrones de las modificaciones postraduccionales; por ejemplo, la glicosilación de proteínas que llevan a cabo las levaduras es diferente a la que realizan las plantas o animales, lo que al final puede causar una función reducida, pérdida de función, o bien cambio de la función (Berlec & Strukelj, 2013).

En las plantas, la expresión de proteínas heterólogas ha sido enfocada en trabajos de inmunología principalmente, esto con el fin de expresar proteínas de patógenos tales como glicoproteínas (Margolin et al., 2018), o bien el epítipo 16E del virus del papiloma humano con el objetivo de desarrollar vacunas (Massa et al., 2019). Aunque las plantas también representan ciertos retos, tales como

toxicidad producida por la acumulación de proteínas mal plegadas (Margolin et al., 2018), así como cambios en los patrones de glicosilación (Berlec & Strukelj, 2013). Finalmente, los modelos de líneas celulares, se dividen en líneas de insectos y de mamíferos, ambas son usadas para la producción de proteínas heterólogas con fines de estudios inmunológicos, por ejemplo, la producción de un sistema de detección para infecciones de varicela en el sistema nervioso central en humanos usando células de insectos (Al-Sulaiman et al., 2017).

De igual manera los cultivos de células de mamíferos también son usados mayoritariamente para estudios en inmunología. Por ejemplo, la expresión de BG505 SOSIP.664 Gp140, una glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana que se usó para generar epítomos (Sanders et al., 2013). Aunque de igual manera, la transformación de las líneas celulares es un proceso difícil, además de que los medios de cultivo y equipos para su crecimiento son costosos (Berlec & Strukelj, 2013), se corre el riesgo de la obtención de compuestos que copurifican y que sean tóxicos, en el caso de la producción de insumos para uso humano, además de que es más compleja su manipulación y mantenimiento (Levin et al., 2020).

II.3.- Nuevos modelos de expresión de proteínas heterólogas

Debido a lo mencionado anteriormente, surge la necesidad de contar con nuevos y mejores modelos de organismos para obtener proteínas recombinantes. Recientemente se consideró a *Ustilago maydis* como un modelo prometedor. *U. maydis* es un hongo basidiomiceto, es saprofita del maíz y de su ancestro el teocintle, en el maíz induce la formación de agallas o tumores en las partes aéreas, de manera principal en el fruto. Estas agallas son el signo más característico de la enfermedad y se producen exclusivamente en el maíz, el cual es llamado huitlacoche (Ruiz-Herrera, 2008). En México, el huitlacoche es considerado como una exquisitez culinaria (Ruiz-Herrera, 2008). Además, éste presenta características que lo hacen importante como alimento, debido a que contiene nutrientes, antioxidantes, aminoácidos esenciales y ácidos grasos que no están presentes en el maíz como tal, por lo que la infección del maíz con este

hongo lo convierte en un alimento nutritivo y de carácter funcional, y por lo tanto seguro para su manipulación por el humano (Juárez-Montiel 2011).

Junto con el hecho de que este hongo también ha sido de gran importancia para varios avances ya sean moleculares o en este caso también industriales debido a que Stoffels et al., 2020, lo implementó como un modelo eficiente para la degradación de residuos de producción de azúcar, para a partir de biomasa vegetal producir compuestos con valor agregado; como el ácido itacónico, utilizando como base la capacidad intrínseca de este hongo para crecer en pectina.

II.4.- Ciclo de vida de *U. maydis*

U. maydis inicia su ciclo de vida con la germinación de las teliosporas diploides, que generan células haploides debido a la meiosis. Éstas se reproducen por gemación y son de carácter saprófito. El siguiente paso se lleva a cabo al estar sobre la superficie de la planta, las levaduras buscarán una célula sexualmente compatible para realizar el proceso de apareamiento, que está determinado por dos *loci*, llamados a y b, solo las células con distintos *loci* se podrán aparear e iniciar el proceso infectivo (Vollmeister et al., 2011). El apareamiento se lleva a cabo mediante receptores de feromonas, esto origina que se formen tubos de conjugación los cuales son guiados por el gradiente de concentración de estas moléculas provenientes de la cepa del sexo opuesto, una vez unidos se inicia la plasmogamia (Vollmeister et al., 2011). El dicarionte así formado es estable y crece en forma filamentosa (Vollmeister et al., 2011, Zhang et al., 2019) Este proceso sucede sobre la superficie de la planta de maíz o de teocintle ya sea en las hojas, tallos o partes de la flor y este mecanismo es desencadenado por sustancias de la planta hospedera.

El micelio así formado penetra en las aperturas naturales de la planta o de una forma activa mediante un apresorio (Ruiz-Herrera, 2008, Zhang et al., 2019). Una vez dentro, el hongo comienza a crecer y desarrollarse mediante la absorción de nutrientes de la planta obtenido de los haces vasculares (Vollmeister et al., 2011).

Durante este proceso dos mecanismos importantes se activan, la supresión del sistema de defensa de la planta hospedera, esto sucede por la activación de genes específicos para la patogenicidad (Stirnberg & Djamei, 2016), y el segundo es la modificación de los tejidos celulares de la planta para la producción del tumor, este proceso está determinado por genes de *U. maydis* los cuales cuando coloniza las células inmaduras no diferenciadas reprograman su desarrollo para la formación de los tumores (Redkar et al., 2017). Subsecuentemente sucede la proliferación y fragmentación de las hifas, en este punto la cariogamia ocurre y se forman teliosporas de color oscuro dentro de los tumores, éstos una vez maduros se rompen y liberan esporas maduras que bajo condiciones favorables y sobre la planta del maíz, podrán germinar y liberar células haploides para iniciar un nuevo ciclo reproductivo (Vollmeister et al., 2011).

II.5.- Importancia de *U. maydis* a la ciencia

En el conocimiento de ciencia básica *U. maydis* ha sido un excelente modelo de estudio de la interacción planta-patógeno, la recombinación homóloga, el apareamiento, es por ello que cuenta con múltiples herramientas en biología celular, genética y molecular, así como herramientas de microscopía, genoma secuenciado entre otras (Kamper et al., 2006). Por mencionar un ejemplo, tenemos la recombinación homóloga y la resolución de la estructura de Holiday, la cual se basa en la capacidad de que los cromosomas reconozcan secuencias homólogas, las cuales pueden conjugarse dando así genes recombinantes, los cuales permiten la variabilidad genética, y de la misma manera este mecanismo es usado para realizar reparaciones en el ADN, tales como las rupturas simples o de doble cadena, mediante el reconocimiento de la cadena rota con la secuencia homóloga del cromosoma vecino (Haber et al., 2004). Otra característica llamativa de *U. maydis* es su inocuidad, puesto que, como se mencionó anteriormente por su especificidad, solamente infecta al maíz y al teocintle. Además de que no se han reportado infecciones en humanos puesto a que sido ingerido desde la época prehispánica (Juárez-Montiel et al., 2011), debido a esto *U. maydis* puede llegar a ser considerado como un organismo GRAS (Generally Recognized As Safe, por sus siglas en inglés) lo que significa que no causa infecciones a humanos y puede

ser implementado en la preparación de productos alimenticios, y lo más importante que al no producir infecciones en humanos facilita así el manejo en condiciones de laboratorio así como los productos que en este sistema se generen la probabilidad de que puedan ser tóxicos para el humano es baja, salvo la característica propia del compuesto producido (Hahn-Löbmann et al., 2019).

II.6.- Expresión de proteínas heterólogas en *U. maydis*

Respecto a la producción de proteínas heterólogas en *U. maydis*, recientemente se expresó la subunidad β de la toxina del cólera, factor de virulencia producido por la bacteria *Vibrio cholerae*. La secuencia de nucleótidos se optimizó para su expresión en un sistema eucarionte, y se clonó bajo el promotor constitutivo Otef. Esta construcción se integró en el genoma de *U. maydis* su expresión se determinó por RT-PCR (Monreal-Escalante et al., 2016). A continuación, se infectó maíz y se obtuvo el huitlacoche que expresa dicha proteína, con el huitlacoche así producido se alimentaron ratones, los cuales fueron puestos a una prueba de desafío inmunológico, para ello se inoculó vía oral la toxina del cólera, y se observó que los ratones no desarrollaron los signos de la enfermedad, además en estudios realizados para el título de anticuerpos presentes se observó una mayor cantidad en comparación con los del grupo control. Estos experimentos demostraron la funcionalidad de este sistema para expresar una proteína de origen bacteriano en el sistema de *U. maydis* (Monreal-Escalante et al., 2016).

Recientemente, en este hongo se identificó un sistema de secreción no convencional para la proteína Cts1. Cts1 es una endoquitinasa que participa en el proceso de reproducción asexual de *U. maydis*, realiza la degradación de la pared celular y posterior separación de la célula hija para concluir la gemación (Terfruchte et al., 2017). Este sistema de secreción permite evitar que una proteína circule por la ruta retículo endoplásmico rugoso aparato de Golgi y que de esta manera no sea sujeta a las modificaciones postraduccionales (Stock et al., 2012). Para determinar la efectividad de este sistema se expresó la enzima bacteriana β -glucuronidasa “Gus”, la cual posee una señal de glicosilación (asparagina 354) que al ser glicosilada en el aparato de Golgi pierde su función,

puesto que en la bacteria esta asparagina no es glicosilada. La expresión de esta proteína por la vía convencional en *U. maydis*, produjo células que no fueron capaces de hidrolizar el sustrato X-Glu (5-Bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl β -D-glucopyranosiduronic acid), por lo tanto, la proteína no está activa. Sin embargo, cuando se fusionó esta proteína a un fragmento N-terminal de la proteína Cts1 (residuos 103-502) se observó que la β - glucuronidasa expresada por este sistema no convencional, permitió producir la proteína funcional, puesto que hidrolizó el sustrato X-Glu, este resultado indicó que la proteína no está glicosilada, que se secretó al medio y que mantuvo así su actividad enzimática. De esta manera se determinó la región necesaria de la proteína Cts1 para llevar a cabo el proceso de secreción no convencional, garantizando así su secreción al medio de cultivo (Stock et al., 2012).

De la misma manera, este método fue usado para secretar otros tipos de moléculas más complejas y de mayor tamaño. Recientemente, se modificó a *U. maydis* con un vector de expresión para producir anticuerpos de una sola cadena, los cuales a su vez fueron probados mediante la reacción con el epítipo c-Myc, se observó el reconocimiento del anticuerpo expresado cuando fue expuesto a este epítipo (Sarkari et al., 2014). Así mismo, se expresaron las cadenas ligeras de anticuerpos los cuales fueron denominados nanocuerpos, de la misma manera estos mostraron tener funcionalidad al reconocer a la proteína GFP contra la cual fueron diseñados (Terfrüchte et al., 2017).

II.7.- *Babesia bigemina*

B. bigemina es un protozooario hemoparásito del filo Apicomplexa (Jalokeva et al., 2019). Causa la enfermedad conocida como babesiosis en bovinos. Su ciclo de vida consta de dos fases, una en su vector, que es la garrapata común del ganado (*Rhipicephalus* spp) y la otra en el huésped vertebrado que es el ganado vacuno (Schnittger et al., 2019). Las garrapatas y enfermedades que estas transmiten generan pérdidas económicas que se estiman en 573.6 millones de dólares anualmente en México, debido a las reducciones en la producción de lácteos, cárnicos y por pérdidas del bovino en sí (Almazán et al., 2018).

El cuadro clínico que se presenta en una infección de babesiosis es la anemia hemolítica, fiebre, la pérdida de apetito, una debilidad general, postración y en los peores casos la muerte del bovino infectado o la pérdida del feto en vacas preñadas. Las principales zonas afectadas en México son los estados cerca del golfo de México hacia el este, como Tamaulipas, Veracruz y Tabasco (Almazán et al., 2018).

II.8.- Ciclo de vida de *B. bigemina*

Inicia cuando una garrapata portadora del parásito se alimenta de un bovino, la fase infectiva se denomina esporozoito. Al momento de que la garrapata se está alimentando, *B. bigemina* es transmitida a través de las glándulas salivales de la garrapata cuando ésta realiza la absorción de sangre y la secreción de saliva (Jalokeva et al., 2019). Una vez dentro del huésped, el esporozoito de *B. bigemina* se adhiere a un eritrocito mediante el reconocimiento de las proteínas de su membrana celular. Subsecuentemente se orienta y con el complejo apical inicia la fase de invasión al eritrocito. Este proceso está modulado por la secreción de enzimas y un complejo motor de actina-miosina (Jalokeva et al., 2019). Una vez dentro del eritrocito, el esporozoito se diferencia a un trofozoito, que se caracteriza por su reproducción asexual (fisión binaria) que da lugar a dos merozoitos. Cada merozoito sale del eritrocito para repetir el proceso de infección. La ruptura masiva de los eritrocitos produce anemia (Almazán et al., 2018). En la siguiente fase los merozoitos intraeritrocíticos son ingeridos por la garrapata cuando ésta se alimenta de un bovino infectado. En la luz intestinal de la garrapata, los merozoitos se transforman en gametocitos, cuya reproducción es de tipo sexual formando un cigoto, este a su vez se transformará en un quineto en la membrana basal del intestino. Finalmente, el quineto se desplaza al ovario y se producirá una infección transovárica infectando así a los embriones o bien infectará las glándulas salivales donde se transformará de nuevo en un esporozoito y así se iniciará el ciclo de nueva cuenta (Almazán et al., 2018; Jalokeva et al., 2019).

II.9.- Signos clínicos de la babesiosis bovina

Los signos clínicos de la infección de *B. bigemina* consisten en anemia hemolítica causada por la ruptura de los eritrocitos, fiebre, hemoglobinuria

ocasional, falta de apetito, constipación, deshidratación, debilidad general, postración, disminución en la producción de leche, abortos y en algunos casos, la muerte (Mosqueda et al., 2012, Almazán et al., 2018). Algo importante de mencionar es que los bovinos menores a 9 meses pueden portar la infección, pero ésta es asintomática ya que no se desarrollan los signos clínicos como en adultos. La babesiosis bovina genera pérdidas en la producción del sector agropecuario del país, debido a la disminución de producción de leche y carne. Cabe destacar que *B. bigemina* no es una enfermedad zoonótica ya que no infecta eritrocitos de humano y su vector la garrapata, presenta predilección por el ganado bovino (Mosqueda et al., 2012).

II.10.- Métodos actuales de detección de la babesiosis bovina

Hoy en día, los métodos más usados para el diagnóstico de la babesiosis se clasifican en tres tipos; los de microscopía, los inmunológicos y los moleculares. Los métodos de microscopía son: los frotis sanguíneos, las improntas de cerebro y de hemolinfa, y los más simples y económicos (Mosqueda et al., 2012). Sin embargo, presentan problemas como: requieren personal experimentado y los diagnósticos son dependientes del criterio de quien los realiza (Mosqueda et al., 2012). Los ensayos inmunológicos son la inmunofluorescencia, las pruebas ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) y la inmunocromatografía. Estas técnicas son las más usadas, en especial la inmunofluorescencia a la cual se conoce como “la prueba de oro”, aunque de igual manera para realizar esta prueba se necesita personal experimentado y es dependiente del criterio de quien la realiza. Las pruebas de ELISA son pruebas automatizadas, que permiten analizar una gran cantidad de muestras simultáneamente. En este caso en particular, las proteínas recombinantes utilizadas, usualmente son sintetizadas en bacterias como *E. coli*, por lo que pueden dar falsos positivos cuando los anticuerpos reaccionan a proteínas de las bacterias que co-purifican con la (s) proteína (s) de interés (Mosqueda et al., 2012, Jaramillo Ortiz et al., 2018).

Finalmente están los ensayos moleculares tales como las sondas de ADN, la PCR (Polymerase Chain Reaction), y la amplificación isotérmica. Estas metodologías son las más exactas, sin embargo, requieren de personal capacitado y equipos altamente especializados para realizar estos estudios. En México son escasos los Centros de Diagnóstico que cuentan con estas instalaciones (Mosqueda et al., 2012, Hailemariam et al., 2017).

II.11.- Estudios inmunológicos de *B. bigemina*

B. bigemina ha sido motivo de estudios y experimentación en el área de la inmunología. Recientemente se identificaron péptidos de las proteínas Mic1 y Gp45 como específicos de *B. bigemina* puesto que no se encuentran en otras especies de *Babesia* (Valdez 2015).

La proteína Mic1, está presente en las micronemas, las cuales son organelos que participan en el proceso de invasión a los eritrocitos. El gen consta de 1658 pb y codifica una proteína de 445 amino ácidos, y 31 KDa (Valdez, 2015). Por otro lado, Gp45, es una glicoproteína que está presente en la membrana celular de *B. bigemina*, participa en el proceso de reconocimiento y anclaje a la superficie de eritrocitos mediante el reconocimiento por unión del ácido siálico (Fisher et al., 2001), el gen consta de 1053 pb y codifica una proteína de 351 amino ácidos; 45 KDa (Valdez, 2015).

Por análisis bioinformáticos para la predicción de epítomos, se observó que las proteínas Mic1 y Gp45, pueden generar varios epítomos, entre los diferentes epítomos generados en este análisis (Mercado, 2017), para realizar este experimento, se seleccionaron varios péptidos: Mic1 (A-C), Gp45 (1-5) Tabla 1. De estos péptidos, Mercado en el 2017 seleccionó dos de ellos: Mic-1(A), el cual consta de 16 amino ácidos y Gp45 (1), el cual tiene un tamaño de 19 amino ácidos (Valdez 2015), Tabla 1.

Mic-1(A)	MIMIDYSSDTNQCLNN
Mic-1(B)	CSSPTKCAGTAEILKTY
Mic-1(C)	KNVDQTVIKRLHHKYCGK
Gp45-1	ERAVSGATTHGGDARGVNP
Gp45-2	MHIVSNLLDVEPIVGMYG
Gp45-3	MHIVSKLLDVQPIVGMYG
Gp45-4	GFLSTATDVPESDLAKK
Gp45-5	NLQMFLKVFYNKNSPLF

Tabla 1.- Epítomos identificados en las proteínas Mic-1 y Gp45

De manera particular, estos dos epítomos presentaron una buena reacción inmune, puesto que al ser evaluados por inmunofluorescencia indirecta, demostraron que los epítomos son reconocidos por anticuerpos policlonales contra *B. bigemina* obtenidos en conejos. De igual manera Mic1 fue evaluado mediante ELISA indirecta. En este ensayo se demostró que Mic1 es reconocido por los anticuerpos en contra de *B. bigemina* obtenidos de conejos y no contra los obtenidos contra *B. bovis*; una especie muy cercana que también infecta ganado bovino, demostrando así su especificidad (Mercado 2017). Posteriormente, los resultados de esta ELISA indirecta se utilizaron para el desarrollo de una prueba inmunocromatográfica, en la cual se realizó la detección de anticuerpos en contra de este péptido de *B. bigemina*. La prueba se realizó en una placa de resina en la cual se utilizaron membranas de absorción, transferencia y detección respectivamente (Mercado 2017). La reacción positiva se visualizó por la formación de líneas de color en la membrana de detección. Estas pruebas se realizaron con sueros de bovinos infectados de varias localidades del país, se observó que mostraron un 100% de reconocimiento de infección de *B. bigemina* (Mercado 2017).

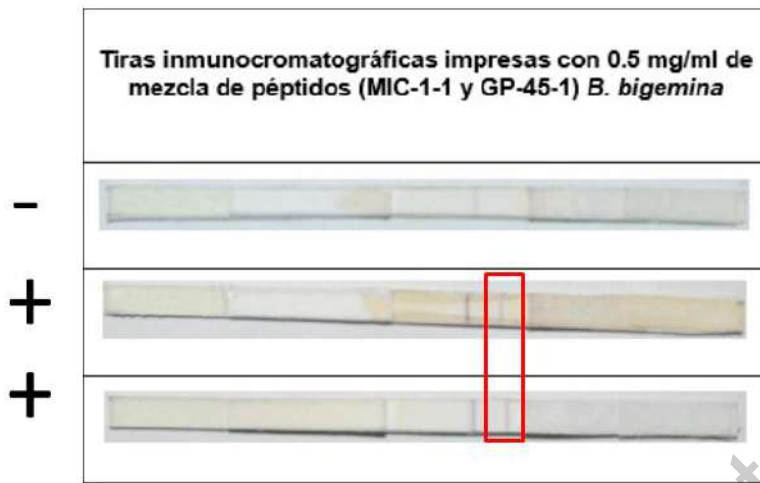


Figura 1: Prueba diagnóstica contra MIC1-1 y GP-45-1 desarrollada. Tomada y modificada de Mercado 2017. Muestran la reacción de detección (en rojo) cuando reaccionaron con suero de vacas

II.12.- Implementación del uso de epítomos recombinantes

Recientemente se han realizado experimentos en los cuales se han generado epítomos quiméricos para estudios inmunológicos, puesto que se ha observado que éstos potencializan la respuesta. Por ejemplo, para tratar la enfermedad aguda que afecta al ganado FMD (foot and mouth disease), producida por el virus FMDV (foot-and-mouth disease virus) (Cui et al., 2018). En este experimento se realizó un arreglo de epítomos VP1, TTP2 y B1B2 de este patógeno, estos fueron acomodados de distintas maneras y expresados con un gen de flagelina, los cuales fueron subsecuente expresados en *E. coli* y purificados para generar anticuerpos policlonales en ratones. Se observó que estos anticuerpos podían ser usados para el tratamiento de la enfermedad, en conejillos de indias, los cuales subsecuente fueron expuestos al virus observando que no desarrollaron la enfermedad (Cui et al 2018). En otro experimento se construyó un arreglo de epítomos en contra del virus CCHF

(Crimea-Congo hemorrhagic fever). En este caso se usaron dos glicoproteínas del virus CCHF que producen reacción de reconocimiento inmune en células B y células T, se realizó un arreglo computacional para identificar posibles epítomos para la generación de una vacuna (Nosrati et al., 2019). Finalmente, los hongos también han sido usados para este tipo de expresión, por ejemplo, el uso de *P. pastoris* para la producción de partículas tipo virus (virus-like particle - VLP), la cual produjo proteínas de la cápside del virus de la hepatitis B, los cuales fueron usadas para la producción de anticuerpos los cuales fueron usados para inmunizar los ratones usados en esta prueba y así evitar una infección por este virus (Stephen et al., 2018).

II.13.- Justificación

Por las características antes mencionadas *U. maydis* puede ser usado como plataforma para la producción de proteínas heterólogas, en este caso del parásito de bovinos *B. bigemina*, esto resulta de gran interés, debido a los problemas existentes en la detección de la babesiosis, ya que en los métodos actuales de detección que emplean péptidos producidos en sistemas bacterianos es común tener reacciones inmunes cruzadas (Mosqueda et al 2012). El sistema de *U. maydis*, cuenta con muchas ventajas, entre las cuales está la baja probabilidad de surgir reacciones inmunológicas cruzadas, así como evitar las modificaciones postraduccionales en las proteínas que podrían causar una reacción inmune diferente a la buscada, así como la secreción del péptido de interés al medio de cultivo, la generación rápida de biomasa, el fácil manejo en el laboratorio. Por lo que la producción de los péptidos quiméricos Mic-1(A) y Gp45-1 en su forma quimérica Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2) en *U. maydis* además de presentar varias ventajas para la producción en este modelo al ser menos costoso que otros métodos como la síntesis química.

III.- Hipótesis

Ustilago maydis modificado genéticamente y bajo el control del promotor fuerte pOMA, transcribe y expresa un gen quimérico conteniendo los péptidos Mic-1(A) y Gp45-1 de *Babesia bigemina*.

IV-Objetivo general:

Expresar los péptidos quiméricos Mic-1(A) y Gp45-1 de *Babesia bigemina* en el sistema heterólogo de *Ustilago maydis*.

IV.2.- Objetivos específicos:

- 1.- Diseñar el arreglo óptimo de la combinación de las secuencias de los péptidos Mic-1(A) y Gp45-1 para crear el gen quimérico.
- 2.- Generar cepas transgénicas de *U. maydis* que expresen los péptidos quiméricos Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2).
- 3.- Comprobar la modificación genética en las cepas transgénicas con las secuencias de Mic-1-Gp45-1 y Mic-1-Gp45-1(x2).
- 4.- Evaluar la producción de los péptidos Mic-1-Gp45-1 y Mic-1-Gp45-1(x2) en las cepas transgénicas.

V.- Materiales y Métodos:

V.1.- Reactivos y medios de cultivo:

Los reactivos y medios de cultivo utilizados en este trabajo se describen en el anexo 1.

V.1.2.- Microorganismos utilizados.

Se cultivaron bacterias de la cepa Top10 de *E. coli*, estas fueron sembradas en cajas Petri con medio de cultivo LB (marca US Biological) sólido y en tubos cónicos con 10 ml de medio LB líquido con ampicilina marca Científica Senna (100 µg/ml) como agente de selección. La incubación se llevó a cabo a 37 °C con agitación constante (150 RPM), para su conservación a corto plazo fue a 4°C.

Se cultivó las cepas de *U. maydis* AB33, donada por el doctor Marius Terfrüchte de la Heinrich Heine University Düsseldorf, Alemania, y la cepa de *U. maydis* $\Delta rim101$ (resistente a higromicina B; 200 µg/ml, marca Gold Bio), donada por la doctora Elva Teresa Aréchiga Carvajal de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, se sembraron en caja Petri con medio de cultivo MC sólido (para 500 ml, 2.5 gr de peptona, 5 gr de extracto de levadura, 5 gr de glucosa, 0.750 gr de nitrato de amonio, 31 ml de solución de sales de *U. maydis* y 10 gr de agar bacteriológico para medio sólido), o cultivo líquido en tubos cónicos de 50 ml, se agregó a este 10 ml de medio MC líquido. Su incubación se realizó a 28 °C, con agitación constante (150 RPM). Como agente de selección para la selección de transformantes se utilizó Carboxina (3 µg/ml, marca Fluka). Los cultivos fueron manipulados en campana de flujo laminar. Para su almacenamiento a corto plazo se realizó a 4°C y para largo plazo las cepas se conservaron en glicerol al 40% a -80 °C (Sambrook & Rusell, 1999).

V.2.- Métodos generales

V.2.1-Extracción de ADN genómico

Se siguió el protocolo descrito por Hofman y Wiston, 1987 como a continuación se describe: Se incubó la cepa de interés en 10 ml de MC por 18 h. El cultivo se centrifugó a 5,000 RPM por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. A la pastilla de células se le agregaron 200 μ l del amortiguador de extracción TSNTe (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8), se re-suspendió la pastilla y se pasó a un tubo plástico de 1.5 ml con perlas de vidrio (200 μ l), se añadieron 200 μ l de Fenol-Cloroformo (50:50) y subsecuentemente se añadieron 200 μ l de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5). Se agitó en vortex de 3 a 4 minutos y se centrifugó a 13,000 RPM por 9 minutos. Se recuperó la fase acuosa a un tubo nuevo. Se añadió 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión del tubo, se incubó por 1 hora a -20 °C, se centrifugó a 13,000 RPM por 9 minutos y se decantó el sobrenadante. Se re-suspendió la pastilla en 400 μ l de TE se agregaron 5 μ l de ARNasa A (1mg/ml) y se incubó a 37 °C por 20 minutos.

Posteriormente se añadieron 10 μ l de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol frío al 100%, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó 5 minutos a -20 °C, se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se lavó con 400 μ l de etanol al 70% y se golpeó el tubo hasta que la pastilla se desprendió. Se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar colocando el tubo boca abajo. Finalmente se agregaron 40 μ l agua grado molecular, para disolver en ADN. El ADN se observó en gel de electroforesis y se conservó a -20 °C.

V.2.2-Extracción de ADN plasmídico

Se usó el protocolo de minipreparación descrito por Birnboim & Doly (1979). Para ello se cultivó la cepa de interés en 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección. Se incubó a 37°C durante 18 h a 150 RPM. Se centrifugó a 12,000 RPM por 2 minutos, se descartó el sobrenadante (SN), se añadieron 200 μ l de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8). Se homogeneizó y se distribuyó en dos tubos de plástico de 1.5 ml. A cada uno, se añadieron 400 μ l de solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS), se mezcló suavemente y

se incubó en hielo por 10 minutos. Se agregaron 300 µl de solución III (3 M acetato de potasio, 2 M ácido acético glacial) y se incubó en hielo por 10 minutos, subsecuentemente se centrifugó a 12,000 RPM por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó con 600 µl de isopropanol frío y se incubó a -20 °C por 20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 RPM por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. La pastilla así obtenida se lavó con 300 µl de etanol al 70%, se golpeó suavemente hasta que se desprendió la pastilla, se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se invirtió el tubo boca abajo para secar la pastilla. Finalmente, el ADN de plásmido se re-suspendió con agua grado molecular 60 µl, y se conservó a -20 °C. El ADN plasmídico se digirió con enzimas de restricción y se observó en gel de agarosa al 1%.

V.2.3-Extracción de ARN

Se realizó un preinóculo de las cepas de interés en 5 ml de MC suplementado con los antibióticos de selección, estos fueron incubados a 28°C durante 20 h. Posteriormente, se inocularon 80 ml células del preinóculo, estos nuevos cultivos se incubaron en las mismas condiciones durante 44 h. Estos cultivos se realizaron a dos tiempos de 20 h y 44 h para determinar el mejor tiempo de crecimiento. Después se centrifugó a 5,000 RPM durante 5 minutos para obtener la pastilla de células, se descartó el SN y se congeló en nitrógeno líquido. La pastilla se molió en mortero y pistilo con nitrógeno líquido para obtener un polvo fino (aproximadamente 100 mg) y se depositó en tubos de plástico de 2 ml (libres de RNAsas). El ARN total se purificó con el reactivo de extracción TriZol, se usó el protocolo descrito por la marca comercial Thermofisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home.html>). Todos los reactivos se prepararon con agua DEPC (0.1%), el paso de centrifugación se realizó a 4°C. Se homogeneizó la muestra con 1 ml de TRIzol en el vórtex por 2 minutos, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 400 µL de cloroformo y se agitó suavemente. Se centrifugó a 12,000 RPM por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. El ARN se precipitó con 600 µL de la mezcla 0.8 M citrato de sodio/1.2 M NaCl, y 700 µL de isopropanol frío. Se incubó a temperatura

ambiente por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol al 75% frío y se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos, se decantó el sobrenadante. Se dejó secar el tubo boca abajo por 10 minutos y finalmente se disolvió la pastilla en 50 μ L de agua DEPC y se conservó a -80 °C. Para la cuantificación del ARN se usó un Nanodrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC).

V.2.4.- Síntesis de ADN complementario

Se realizó el protocolo de síntesis de ADN complementario (ADNc) siguiendo el protocolo de Thermo Scientific, primero el RNA se trató con la enzima ADNasa I (marca Thermo Scientific), se preparó una mezcla a 10x de la mezcla de ADNasa I Buffer de ADNasa I con $MgCl_2$ (1 μ L) ADNasa I (2.5 μ L) agua DEPC (4 μ L), y 2.5 μ L de ARN para tener 2 μ g/ml, estas se incubaron a 37 °C por 40 minutos, se agregó 1 μ L de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C por 10 minutos. Con este ARN tratado con ADNasa I, se realizó una reacción de PCR para determinar la ausencia de ADN, se amplificó un fragmento del gen de actina con los oligonucleótidos 2035-2036, se usó la enzima Dream Taq DNA polymerase según las especificaciones de la casa comercial (ThermoFisher Scientific) en el termociclador modelo Bio-Rad®T100. Una vez que el resultado de la reacción anterior fue adecuado, el siguiente paso fue la síntesis del cDNA, para ello se utilizaron los oligonucleótidos dT y 2237 (reverso), se realizó una alícuota a 10x de la siguiente mezcla: oligonucleótido dT (0.5 μ L), oligonucleótido 2237 (0.5 μ L) y agua DEPC (0.25 μ L). Se dispensaron en tubos de PCR, 1.25 μ L de esta mezcla y 5 μ L de ARN tratado con ADNasa I, se incubó por 5 minutos a 65 °C, subsecuentemente se realizó una mezcla que contenía: la enzima (RevertAid Reverse Transcriptase marca Thermo Scientific) 10x de buffer de retro-transcriptasa (2 μ L), Ribolock (marca Thermo Scientific) (0.25 μ L), 10 mM de dNTPs (1 μ L), retro-transcriptasa (0.5 μ L), se mezcló y se le dio pulso en mini centrifuga. De esta mezcla se distribuyeron a cada tubo 3.75 μ L para obtener un total de 10 μ L, se incubó a 42 °C por 70 minutos. Finalmente se incubó a 70 °C por 10 minutos. Este DNAc se utilizó para analizar la expresión del gen quimérico de las cepas de interés, para ello se utilizaron los

oligonucleótidos 2235-2236 y la enzima DreamTaq polymerase (marca Thermo Scientific) con 1 µl de ADNc en un volumen final de 12.5 µl. Como control de amplificación se utilizó el gen de actina, con los oligonucleótidos 2035 y 2036 (Tabla 2).

Tabla 2: oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia	Temperatura	Amplicon
2035 2036	CTTCCTGACGGACAGGTGAT CTCGGGAGGAAGCAACAATC	65	300 pb
2231 2232	AGCTAGTCGCTTGTGGCAAC AGCAGTTCATGATGGTAAGG	66	300 pb
2232 2233	AGCAGTTCATGATGGTAAGG AGCGGTTAGCTCCTTCGGTC	65	300 pb
2234 2235	TTTTCGCTCTACCGATGCCA CAACCCGGCGGTCAAAGTGG	65	300 pb
2236 2237	CGTCAACCCCACTAGTCTCG GATGAAGCGGATGACGATGA	65	300 pb
2238 2239	GGTCGAGCGAGATACCATTG TGGAAGCTGGTGTGGTAGGT	68	300 pb

V.2.5.- Transformación genética de *E. coli*

Para la preparación de células competentes se utilizó el método descrito por Sambrook & Ruseel., 1999. Se inoculó 1 mL de un precultivo de *E. coli* en 100 mL de medio LB que se suplementó con 20 mM de CaCl₂. Se trabajó con el cultivo cuando alcanzó una densidad óptica a 600 nm en el intervalo de 0.4 a 0.6. Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 8000 RPM a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante se desechó y la biomasa bacteriana se re-suspendió en 20 mL de una disolución de 50 mM de CaCl₂ previamente colocada sobre hielo. La suspensión se colocó en hielo durante 30 min y las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 8000 RPM durante 10 min. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se re-suspendió en una mezcla de una disolución de 50 mM de CaCl₂ con glicerol al 20 % (previamente colocada sobre hielo). Finalmente, alícuotas de 100 µL fueron conservadas a - 80 °C.

En la campana de flujo laminar, se descongeló un tubo con células competentes de *E. coli* Top10, se agregaron 2 µl del plásmido. Se dejó reposar en hielo por 20 minutos. Se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 2 min. Se

colocó en hielo por 2 min, se agregaron 600 µl de medio LB sin antibiótico. Se incubó a 37 °C/1hr en agitación a 150 RPM. Finalmente se sembraron de manera independiente 300 µl y 100 µl de la reacción de transformación en medio LB sólido con el antibiótico de selección. Una vez seco el medio de cultivo, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

V.2.6.- Diseño del arreglo de la secuencia óptima de péptidos quiméricos

Mic-1(A) y Gp45-1:

El arreglo de las secuencias de los péptidos quiméricos para llevar a cabo la construcción sintética del gen se realizó usando los programas de predicción de epítomos ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>), BCEpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) y IEDB (<https://www.iedb.org/>).

Los mejores arreglos obtenidos fueron: La secuencia de Mic-1(A) y de Gp45-1 (1:1) repetido cada uno diez veces. El segundo arreglo fue: 1:2 de Mic-1(A), Gp45-1, Repetido seis veces.

Subsecuentemente con los dos arreglos diseñados se realizó la optimización del uso de codones para *U. maydis*. Se usaron las tablas descritas por Zarnack et al., 2006, así como el programa informático; <http://dicodon-optimization.appspot.com/>. A la secuencia de nucleótidos que codifica los péptidos se le realizó un análisis BLAST para determinar la correcta identidad de los epítomos Mic-1(A) y Gp45-1. La secuencia así generada se analizó con el programa APE para determinar que la secuencia no tuviera sitios para las enzimas de restricción NcoI, SpeI y SspI, puesto que estas enzimas se usaron para clonar el gen sintético en el vector pUMA2480 (NcoI y SpeI), y la enzima SspI para linearizar el plásmido y proceder a la reacción de transformación de *U. maydis* (Stock et al., 2012).

Finalmente, los arreglos obtenidos mediante los programas de inmunopredicción se sintetizaron en la empresa 4T OLIGO (Irapuato, Guanajuato). El gen sintético se clonó en el sitio EcoRV del plásmido pUC57 (resistencia a kanamicina).

V.2.7.- Plásmido pUMA2480

Este plásmido fue la base para construir el plásmido de expresión, donado por la Doctora Kerstin Schipper de la Heinrich Heine University Düsseldorf, Alemania, constituido por el promotor fuerte pOMA, la región de gen de interés, la secuencia de secreción de Cts 1, resistencia a ampicilina y el locus *ip^R* que confiere resistencia a la carboxina, como terminador porta la secuencia del terminador Nos de la nopalina sintasa. Este fue replicado en células competentes de *E. coli* Top10 (como se mencionó anteriormente). La identidad del plásmido se verificó con las enzimas de restricción BamHI o XhoI de la empresa Thermofisher Scientific, la reacción se incubó a 37°C por 90 min. El plásmido así digerido se observó en gel de agarosa al 0.8% y se visualizó en el fotodocumentador DocTM-XR+ de la marca Bio-Rad (Sambrook & Rusell, 1999).

V.2.8.- Construcción del plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)

El gen sintético clonado en el sitio EcoRV en el plásmido pUC57, se replicó en *E. coli* (cepa Top10). El plásmido purificado se digirió con las enzimas de restricción NcoI y SpeI (Thermofisher Scientific) para liberar el gen sintético. La digestión se corrió en gel de agarosa al 0.8% y el fragmento correspondiente (de 1098 pb para Mic-1(A)-Gp45-1 y de 1020 pb para Mic-1(A)-Gp45-1(x2) se recuperó el fragmento correspondiente del gel con bisturí. El ADN se purificó con el protocolo del kit GeneJET Gel Extraction Kit de la marca Thermofisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home.html>). Por otro lado, el plásmido pUMA2480 se digirió con las enzimas de restricción NcoI y SpeI. El producto de la digestión se separó en gel de agarosa y se recuperó el fragmento de 8,191 pb, y se eliminó el fragmento correspondiente a "Um_a-gfp_llama". Una vez con ambos fragmentos puros, el plásmido pUMA2480 (8,191 pb) se mezcló de manera independiente con los genes sintéticos (relación molar 3:1, inserto:plásmido) utilizando el protocolo del kit T4-ADN ligasa de la marca Thermofisher Scientific, la reacción se incubó durante toda la noche a 4 °C. Con el producto de la ligación Se transformó *E. coli*, y de esta manera se generaron los plásmidos pUMA2480-Mic-

1(A)-Gp45-1 y pOMA2480Mic-1(A)-Gp45-1x2. Estas construcciones se identificaron por patrón de restricción. Finalmente, estos plásmidos se secuenciaron en el Langebio, Cinvestav Unidad Irapuato.

V.2.9.- Linearización de los plásmidos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1x2 para transformación genética de *U. maydis*

Los plásmidos linearizados con la enzima de restricción SspI (ThermoFisher Scientific). Para ello se utilizaron 5 µl de ADN plasmídico (1 µg/µl), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La mezcla se incubó durante dos horas y media a 37°C. Una vez terminada la digestión se precipitó con 5 µL de 3 M acetato de sodio y 100 µL de etanol al 95%. Se mezcló y se incubó a -20 °C por 15 minutos, se centrifugó por 15 minutos a 12,000 RPM, posteriormente se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70%, se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla boca abajo. Finalmente, se re-suspendió en 10 µL de amortiguador STC (1 M de sorbitol, tris HCl pH7.5, 10 mM CaCl₂) y se usó el plásmido linearizado para la transformación genética de *U. maydis* (García-Pedrajas et al., 2010).

V.3.- Modificación genética de *U. maydis* para generar cepas transgénicas que expresen los epítomos Mic1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2)

Se seleccionaron las cepas AB33 y $\Delta rim101$ de *U. maydis* por mostrar alta secreción de proteína heteróloga y menor producción de proteasas (Aréchiga-Carvajal y Ruiz Herrera., 2005; Stock et al., 2012), para transformar genéticamente con los plásmidos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480Mic-1(A)Gp45-1(x2). Con esta transformación se generaron la colección de las cepas AB33pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y AB33pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2); y $\Delta rim101$ pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y $\Delta rim101$ pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2). Las transformantes fueron seleccionadas con el antifúngico carboxina a una concentración de 3 µg/ml en el caso de la cepa AB33 y para $\Delta rim101$ además de carboxina, higromicina B 200 µg/ml. La integración de los plásmidos linearizados

se dirigió al locus *ip* (succinato deshidrogenasa) de *U. maydis* por recombinación homóloga (Stock et al., 2012).

Para llevar a cabo la formación de protoplastos se procedió de la siguiente manera usando el protocolo de García-Pedrajas et al (2010). Se realizó un preinóculo de las cepas de *U. maydis* en medio líquido MC (3 ml), se incubó con agitación de 18 a 24 horas a 28°C. Al día siguiente se tomaron 100, 200 y 300 µl del preinóculo y se inocularon respectivamente en matraces Erlenmeyer con 80 ml de medio MC y se dejaron en agitación 18 h a 28°C, o hasta alcanzar la densidad óptica de 0.8 a 600nm . El cultivo se pasó a un tubo cónico y se centrifugó a 3000 RPM por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de solución SCS (20mM citrato de sodio, 1M sorbitol), se centrifugó a 3000 RPM por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó SCS de nuevo. Se repitió este paso dos veces. A continuación, se agregaron 800 µl de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (100 mg/ml). Se revisó el progreso de la formación de protoplastos mediante la observación con un microscopio modelo Leica DM750 cada 20 minutos hasta que alcanzó una proporción del 60% de protoplastos. Se centrifugó a 2500 RPM por 10 minutos, se descartó el SCS y se agregó 1 ml de STC (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM CaCl₂, 1M sorbitol), se volvió a centrifugar a 2500 RPM por 10 minutos y se decantó el STC, se volvió a agregar 1 ml de STC junto con 70 µl de DMSO para su almacenamiento a -80 °C en alícuotas de 70 µl.

La transformación genética de *U. maydis* se llevó a cabo en frío, a 50 µl de protoplastos se le agregó el plásmido linealizado (5 µg), se incubó en hielo por 10 minutos, se agregaron 500 µl de solución PEG (polietilenglicol al 40% en STC) y se incubó por 15 minutos. Finalmente, se le agregaron 500 µl de STC y se mezcló por inversión, se centrifugó a 3,000 RPM y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron los protoplastos con 200 µl STC y se sembraron en una caja Petri con medio completo doble suplementado con sorbitol (anexo I) y carboxina (3 µg/ml) para AB33, y carboxina (3 µg/ml) e higromicina B (200 µg/ml) para $\Delta rim101$. Se incubó a 28°C por un periodo de 3 a 5 días para permitir el desarrollo de colonias resistentes a carboxina (García-Pedrajas et al., 2010).

V.3.1.- Identificación por PCR de cepas que portan el gen quimérico

De las cepas resistentes a carboxina se determinó la presencia del transgen quimérico por PCR. Para identificar a aquellas cepas que sí integraron el plásmido en el locus *ip* se usaron oligonucleótidos obtenidos con el programa Ape (Current Windows version), diseñados usando el templado de la secuencia del plásmido y el plásmido que se integró en el genoma, los cuales se encuentran en la tabla 2.

Como templado se utilizó AND genómico obtenido de las transformantes resistentes a los antibióticos de selección. Se usó la enzima Dream Taq DNA polymerase según las especificaciones de la casa comercial (ThermoFisher Scientific) en el termociclador modelo Bio-Rad®T100. Como Control negativo, se utilizó ADN de la cepa parental.

V.3.2.- Obtención de péptidos recombinantes

De las cepas transformantes seleccionadas y conservadas a -80°C se sembraron en MC sólido suplementado con el antibiótico de selección las cepas de interés. Estos cultivos se incubaron a 28 °C durante 48 a 72 h o hasta que las colonias crecieron.

Se tomó una colonia para preparar un preinóculo en 5 ml de medio MC líquido, con los antibióticos correspondientes. Se incubó a 28°C en agitación constante durante 20 h. Posteriormente se preparó un cultivo de 10 ml de MC, suplementado con MOPS (3-(N-morpholino) ácido propanesulfónico) al 0.1 M, el medio se inoculó con una D.O. de 0.2 medido en el espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Vis (Thermo SCIENTIFIC)). Los cultivos se incubaron por 48 h a 28°C con agitación de 150 RPM. Posterior a la incubación se observaron las células al microscopio para descartar contaminación, el cultivo se centrifugó a 5,000 RPM durante 7 minutos, se recuperó el sobrenadante a un tubo cónico nuevo, y se conservó la pastilla en el tubo original. La proteína presente en el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 100% de saturación, para ello se agregaron 40

ml de una solución de sulfato de amonio al 100% a los 10 ml de sobrenadante para hacer una mezcla de 80% de sulfato de amonio, la cual se incubó a 4°C durante la noche para precipitar las proteínas. Opcionalmente también se realizó la precipitación con TCA (Trichloroacetic acid, ácido tricloroacético), agregando 2 gr de TCA a 10 ml de sobrenadante con proteína para tener una solución con TCA al 20%, se dejó precipitar a 4°C durante la noche. Al día siguiente el tubo se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C para obtener la pastilla de proteínas, se decantó y se re-suspendieron las proteínas en 500 µl de PBS (para 1L: NaCl 4gr, KCl 0.2gr, Na₂HPO₄ 1.4gr, KH₂PO₄ 0.2gr) a pH 7.4 con inhibidores de proteasas (1 pastilla por 10 ml de PBS pH 7.4, marca Roche cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail).

Por otro lado, las pastillas de células se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero con pistilo, subsecuentemente el pulverizado se pasó a un tubo de plástico de 1.5 ml, se re-suspendió en 500 µl de PBS pH 7.4, se agitó en un vortex por dos minutos para homogeneizar y se centrifugó para obtener el sobrenadante de la pastilla que se pasó a otro tubo de 1.5 ml. La pastilla se re-suspendió en 500 µl de PBS pH 7.4, se agregaron perlas de vidrio y se agitó en vortex por 5 minutos para romper aún más las células. Finalmente, todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso. La concentración de proteína presente se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976) en el sobrenadante (medio de cultivo), el sobrenadante del lisado y la pastilla del lisado.

V.3.3 Determinación de proteína por el método de Bradford

Para determinar la concentración de proteínas obtenidas en los tres tipos de muestras mencionadas para cada una de las cepas. Para ello, usó el método de Bradford, se preparó una curva estándar de 2, 1.5, 1 y 0.5 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) preparada en agua grado biología molecular. Se tomaron 5 µl de cada punto de la curva y de las muestras, los cuales se colocaron en una microplaca de 96 pozos por duplicado. Se agregaron 250 µl de solución de Bradford y se cubrió la placa con papel aluminio, se dejó reaccionar por 5 minutos.

Se leyó en el lector de microplacas marca Bio-Rad a 595 nm, y se determinó la concentración de la proteína presente en las muestras.

V.3.4 SDS-PAGE

Se siguió el protocolo descrito en el manual Molecular Cloning, para ello se prepararon geles de poliacrilamida a 10%, se colocaron en una cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida y se les agregó solución de corrida 1x (para 1L: Tris 3.02 gr, glicina 18.8 gr, SDS 1gr, se ajusta pH a 8.3 con HCl), se programó la corrida a 90 Volts y 200 mAmps durante 90 min. Se ajustó la cantidad de proteína a cargar a 20 µg, se agregaron 12.5 µl del buffer de carga Laemli (para 45 ml, 18 ml de glicerol, 1.7 ml Tris-HCl pH 6.8, 3.6gr de SDS, 0.018gr de azul de bromofenol, 2.25ml de β-mercaptoetanol), se desnaturalizaron las muestras en un termoblock a 95 °C durante 5 minutos. Se cargaron 45µl de muestra en los pozos, el primer carril siempre ocupado por el marcador de peso molecular preteñido (marca Thermo Fisher) y se ajustaron las condiciones de corrida. El gel se recuperó y se tiñó con azul de Coomassie (para 100 ml, Azul de Coomassie 0.25 gr, ácido acético glacial 10 ml y H₂O metanol 1:1 90 ml) por 45 minutos. Se destiñó el gel con agua destilada durante la noche, después de dejó en solución de desteñido (ácido acético glacial 10% y H₂O metanol 1:1), hasta que las bandas fueran visibles, finalmente se observó en el equipo Chemidoc T100 marca Bio-Rad (Sambrook and Russell 2001).

V.3.5.- Detección del epítipo recombinante por Western blot

Se siguió el método semihúmedo de transferencia, siendo el siguiente; se realizó una electroforesis de SDS-PAGE, se deja correr por 90 min. Se recuperó el gel de poliacrilamida y se colocó en una cámara de electrotransferencia, la cual fue preparada mediante el acomodo de membranas de electroforesis humedecidas con buffer de transferencia (para 500 ml Tris 1.51 gr, glicina 7.13 gr, metanol 100 ml, ajustar pH a 8.3), y una membrana humedecida con el buffer de transferencia, siguiendo este orden; una cama de membranas de electroforesis, seguida de la membrana de transferencia (Bio-Rad), el gel y finalmente otra cama de

membranas de electroforesis y la placa del equipo, se deja correr por 15 minutos, se recupera la membrana de transferencia con las proteínas ya presentes en ésta y se procede a realizar el revelado con anticuerpos en un Wester blot (Thomazini et al., 2019).

V.4.- Protocolo de Western blot

Se tomó la membrana y se sumergió en una solución de bloqueo (leche en polvo Svelti sin grasa al 5%) en TBST (para buffer 500 ml (5X), Tris pH 7.5, 6.057 gr, NaCl 21.915 gr, se tomaron 200 ml de buffer 5x, se agregaron 800 ml de H₂O destilada y se agregó 1ml de Tween 20 al 20%). Se agitó durante toda la noche a 4°C, subsecuentemente se incubó con el anticuerpo primario de monoclonal de ratón anti his-tag (marca R&D systems, concentración 1:100) en 2% de leche Sveltis en TBST durante 1 h a temperatura ambiente en agitación, seguido de tres lavados con TBST cada uno de 20 minutos. Se realizó un segundo bloqueo con leche Svelti sin grasa al 5% en TBST durante una hora, subsecuente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario monoclonal de oveja anti-ratón (marca R&D systems, concentración 1/2000) en 2% de leche en TBST y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se realizaron tres lavados en TBST cada 20 minutos y finalmente se realizó el revelado con luminol, mezclando en un tubo de plástico de 1.5 ml, 250 µl de solución A con 250 µl de solución B (Ecl Armersham GE marca Sigma-Aldrich), se aplicó y se permitió que reaccionara en toda la membrana en luz tenue, seguido de la observación en un Chemi doc T 100 marca Bio-Rad.

VI.- Resultados:

VI.1: Plásmido pUMA2480:

Se transformó a *E. coli* con el plásmido pUMA2480. Se purificó y se procedió a realizar digestiones con enzimas de restricción para determinar la identidad del plásmido. Los resultados obtenidos indican que se obtuvieron las bandas esperadas, puesto que con BamH I se obtuvo una banda de 8592 pb, mientras que con XhoI se producen tres cortes, dando lugar a bandas de 5971 pb, 1654 pb y 906 pb, siendo estas las esperadas para cada enzima (Figura 2).

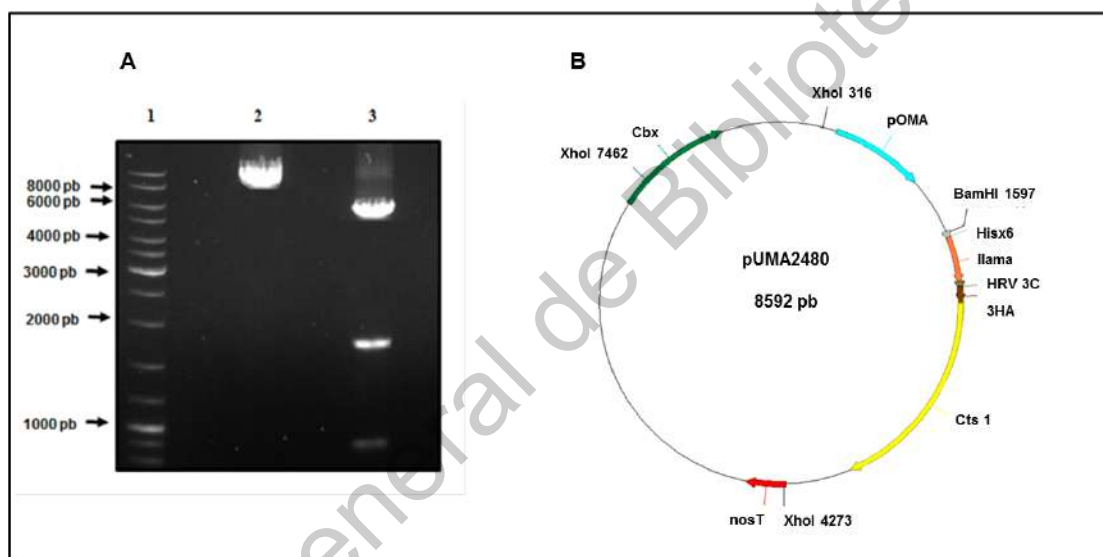


Figura 2: Digestión del plásmido pUMA2480. A) Se digirió el plásmido con las enzimas de restricción BamHI (carril 2) y XhoI. (carril 3). El producto de la digestión se separó en gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb Thermo Scientific (carril 1). B) Mapa del plásmido pUMA 2480, conformado por pOMA; promotor constitutivo fuerte pOMA, el arreglo de interés; Hisx6; cola de histidinas repetidas 6 veces, gen sintético; Llama, HRV-3C; sitio de corte de la proteasa HRV 3C, Cts 1; gen de secreción Cts1, nosT; terminador nos, Cbx; resistencia a la carboxina en el locus *ip* y las áreas de corte de la enzima XhoI.

VI.2.1: Arreglo de epítomos Mic1 y Gp45:

El epítopo Mic-(A) consta de 16 aminoácidos: MIMIDYSSDTNQCLNN. Mientras que el epítopo Gp45-1 está formado por 19 aminoácidos: ERAVSGATTHGGDARGVNP. Con estos epítomos se realizaron varios arreglos en cuanto a su acomodo, de los cuales se seleccionaron los que mostraron una mejor reacción a la formación de anticuerpos, esto por las predicciones realizadas en los programas informáticos ADCpred, BCEpred y IEDB (Potocnakova et al., 2016). En todos los casos analizados, se observó que el mejor reconocimiento se produjo al iniciar el arreglo con el epítopo Mic-1(A). Con esta información se diseñaron dos genes quiméricos, el primero Mic-1(A) seguido de Gp45-1 en el cual este acomodo se repitió 10 veces, se obtuvo el acomodo de péptidos de la Figura 3 el cual consta de 1050 pb; codifica para una proteína de 36.7 KDa.

```
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP
```

Figura 3: Gen quimérico Mic-1(A) Gp45-1. El arreglo se repitió 10 veces.

Por otro lado, el segundo gen sintético está conformado por un repetido del epítopo Mic-1(A), seguido de dos repetidos de Gp45-1, teniendo la conformación Mic-1(A) - Gp45-1 (x2) para este caso se repitió 6 veces como se observa en la Figura 4, el gen consta de 972 pb y la proteína codifica es de 33 KDa.

```

MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP ERAVSGATTHGGDARGVNP
MIMIDYSSDTNQCLNN ERAVSGATTHGGDARGVNP ERAVSGATTHGGDARGVNP

```

Figura 4: Arreglo para el gen quimérico Mic-1(A) Gp45-1(x2).
El arreglo se repitió 6 veces.

VI.2.2: Optimización del uso de codones:

Con la finalidad de que la traducción de estos genes quiméricos en *U. maydis* sea eficiente se realizó una optimización del uso de codones, puesto que se trata de una expresión heteróloga (Pritam et al., 2020). Para optimizar la transcripción de las secuencias de los genes quiméricos, primero se usó la tabla de optimización de codones reportada para *U. maydis* por Zarnack et al., 2006. Con ésta, se realizó la optimización de los codones de las secuencias de aminoácidos de los epítomos de manera manual obteniendo la siguiente secuencia (Figura 5).

```

Mic-1(A): ATG ATC ATG ATC GAC TAC TCG TCG GAC ACC AAC CAG
           M  I  M  I  D  Y  S  S  D  T  N  Q
           TGC CTC AAC AAC
           C  L  N  N

GP45-1: GAG CGC GCC GTC TCG GGC GCC ACC ACC CAC GGC GGC
          E  R  A  V  S  G  A  T  T  H  G  G
          GAC GCC CGC GGC GTC AAC CCC
          D  A  R  G  V  N  P

```

Figura 5: Secuencia de los codones optimizados para los epítomos Mic-1(A) y Gp45-1 utilizando la tabla 2 (Zarnack et al., 2006)

Posteriormente se utilizó el programa <http://dicodon-optimization.appspot.com/>, con la finalidad de corroborar cual es el mejor péptido optimizada para mejorar la eficiencia del proceso de traducción (Zarnack et al., 2006). En este caso la secuencia obtenida mostró modificaciones en la secuencia de Gp45, en los codones para arginina, glicina y alanina en los cuales la citosina

terminal del codón se cambia por una timina como se observa en la Figura 6, obteniendo las siguientes secuencias que fueron las que se usaron para la síntesis del gen, los nucleótidos cambiados se muestran en rojo. Cabe mencionar que la región codificante para Mic-1(A) se mantuvo sin cambios.

Mic-1(A): ATG ATC ATG ATC GAC TAC TCG TCG GAC ACC AAC CAG												
M	I	M	I	D	Y	S	S	D	T	N	Q	
TGC	CTC	AAC	AAC									
C	L	N	N									
Gp45-1: GAG CGT GCC GTC TCG GGT GCC ACC ACC CAC GGT GGC												
E	R	A	V	S	G	A	T	T	H	G	G	
GAG	GCT	CGC	GGT	GTC	AAC	CCC						
D	A	R	G	V	N	P						

Figura 6: Secuencias de codones optimizados posterior al análisis con el programa informático (<http://dicodon-optimization.appspot.com/>) de optimización de codones. En rojo se muestran los cambios incluidos en la síntesis del gen.

La optimización del uso de codones se realizó para asegurar la correcta traducción del ARN mensajero a proteína en el modelo de *U. maydis*, debido a que las diferencias en la selección de codones en la traducción cuando se está leyendo el ARNm por los ribosomas pueden modificar el péptido que será sintetizado (Stock et al., 2012, Almazán et al., 2018).

Una vez que se optimizaron los codones, se procedió a determinar la concordancia e identidad de las secuencias seleccionadas, Estas fueron puestas a prueba con el programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se utilizó el BLASTX (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), para realizar la traducción de nucleótidos a proteína. Como resultado se obtuvo la traducción correcta de las secuencias de nucleótidos diseñadas codifican los epítomos de Mic-1(A) y Gp45-1 en los arreglos mencionados como se muestra en la Figura 7.

A	Description	Max	Total	Query	E	Per	Accession
		Score	Score	Cover	value	Ident	
✓	hypothetical protein BBOND_0404230 [Babesia bigemina]	59.2	59.2	100%	6e-09	100.00%	XP_012770121.1
✓	MIC1 [Babesia bigemina]	59.2	59.2	100%	6e-09	100.00%	AXE72362.1
✓	MIC1 [Babesia bigemina]	59.2	59.2	100%	6e-09	100.00%	AXE72363.1
✓	MIC1 [Babesia bigemina]	59.2	59.2	100%	6e-09	100.00%	AXE72361.1

B	Description	Max	Total	Query	E	Per	Accession
		Score	Score	Cover	value	Ident	
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AGU67947.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AGU67945.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AGU67933.1
✓	hypothetical protein BBOND_0205970 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	XP_012767625.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AEJ89906.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AEJ89908.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AEJ89909.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AEJ89912.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AEJ89911.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AEJ89910.1
✓	merozoite surface glycoprotein gp45 [Babesia bigemina]	43.1	43.1	51%	0.003	100.00%	AEJ89907.1

Figura 7: Resultados obtenidos del programa Blast con las secuencias de péptidos: (A) Mic-1(A) y (B) Gp45-1, se observa el reconocimiento por el programa mostrando un 100% de identidad para ambos péptidos, asegurando la correcta traducción.

VI.3.- Diseño de plásmido de expresión de los epítopos quiméricos

El arreglo de los dos genes quiméricos que se determinó como óptimos se sintetizó en la compañía T4OLIGO. Para el péptido quimérico Mic-1(A)-Gp45-1 la secuencia constó de 1050 pb. Mientras que para el Mic-1(A)-Gp45-1(x2), fue de 972 pb. En ambos casos se cuidó que la secuencia no portara ningún sitio de restricción para las enzimas SspI o AgeI, puesto que dichas enzimas fueron utilizadas para linearizar el vector en el locus *ip^R* (gen de la succinato deshidrogenasa) modificado que confiere resistencia a Cbx (Stock et al 2012). La secuencia de interés fue clonada en el plásmido comercial pUC57 (resistencia a kanamicina), en el sitio EcoRV, cuya secuencia fue agregada en los extremos del plásmido. Para ambos genes quiméricos, estos fueron flanqueados por las secuencias de las enzimas de restricción NcoI y SpeI (5' y 3' respectivamente) de esta manera se recuperó el gen sintético, y se clonó en los mismos sitios en el

plásmido pUMA2480 generando así los plásmidos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2), estos fueron verificados por patrón de restricción y por secuenciación del ADN.

Se comprobó la identidad del plásmido modificado mediante una digestión con la enzima XhoI (Figura 8), el plásmido pUMA2480 y los plásmidos modificados pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1x2, obteniendo las bandas esperadas de 5971, 1654, 906 y 61 pb para el plásmido original pUMA2480 y bandas de 5971, 2351, 906 y 61 pb para los plásmidos construidos.

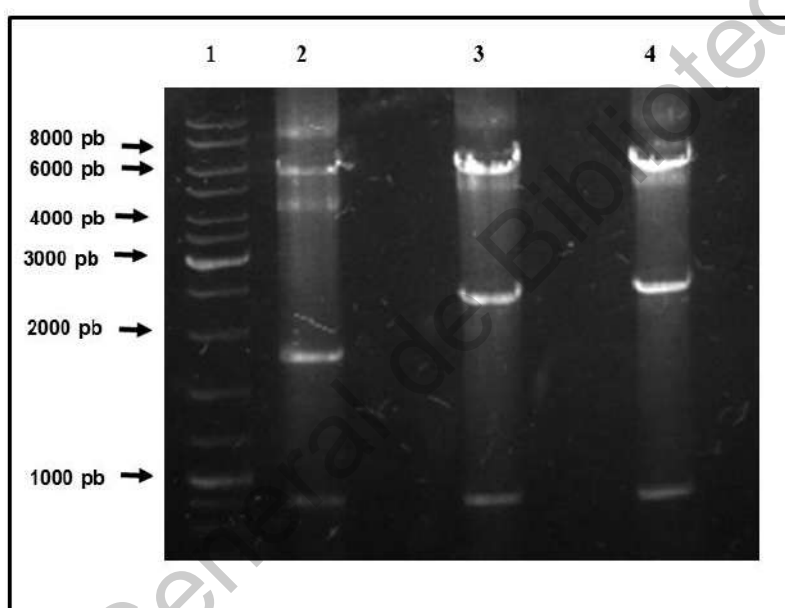


Figura 8: Digestiones con la enzima de restricción XhoI de los plásmidos pUMA2480 (2); pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1x2 (3) y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 (4). El producto de la digestión se separó en gel de agarosa al 0.8%, se corrió en buffer TAE, como marcador de peso molecular se utilizó el O'GeneRuler DNA Ladder Thermo-Scientific.

VI.4.- Plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)

Se realizaron trabajos para el arreglo final del plásmido mediante el uso del programa informático APE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>), con el cual se revisó los sitios de corte de restricción con las enzimas que serían

usadas para hacer las digestiones y los arreglos de las secuencias, tanto fuera como dentro de los plásmidos, y se obtuvo el siguiente acomodo final de la secuencia de los plásmidos pOMA2480Mic-1(A)-Gp45-1 y pOMA2480Mic-1(A)-Gp45-1(x2) como se observa en la figura 9.

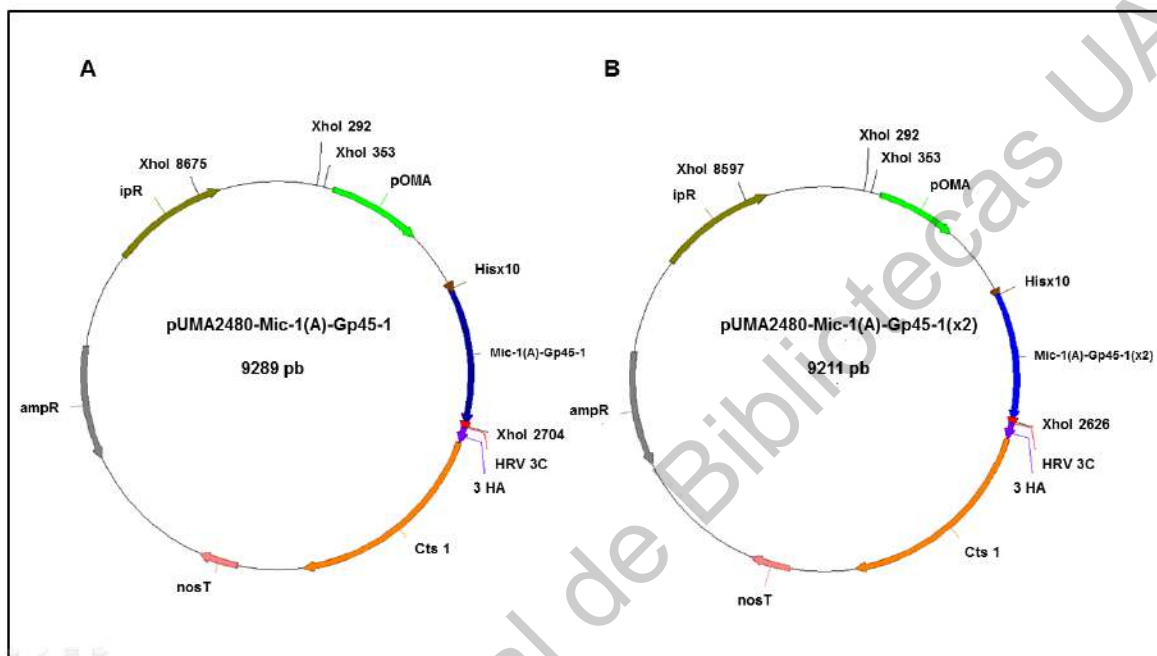


Figura 9: Mapas de los plásmidos de expresión para los péptidos quiméricos. A) pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1; B) pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2). Conformado por pOMA; promotor constitutivo fuerte pOMA, el arreglo de interés; Hisx10; cola de histidinas repetidas 10 veces, gen sintético; Mic-1(A)-Gp45-1 o Mic-1(A)-Gp45-1(x2), HRV-3C; sitio de corte de la proteasa HRV 3C, Cts 1; gen de la endoquitinasa, nosT; terminador nos, amp^R; gen de resistencia a la ampicilina ipR; resistencia a la carboxina en el locus ip y las áreas de corte de la enzima XhoI.

VI.5.- Linearización del plásmido e integración del plásmido modificado

Los plásmidos pUMA-2480Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480Mic-1(A)-Gp45-1(x2) se linearizaron con la enzima de restricción Sppl, la cual corta dentro del locus *ip* modificado (succinato deshidrogenasa) debido a la presencia de una mutación puntual la cual confiere la resistencia a carboxina (Stock et al., 2012). Esta versión del plásmido se utilizó para transformar a las cepas AB33 y $\Delta rim101$ de *U. maydis*, éste plásmido se integró en el locus mencionado por recombinación

homóloga, debido a ello se obtienen dos versiones del gen *ip* (*ip^R* que confiere resistencia a la carboxina y *ip* que es la versión silvestre susceptible al antifúngico), uno el cual confiere la resistencia al antifúngico, seguido por la construcción y el gen silvestre de la succinato deshidrogenasa (Figura 10).

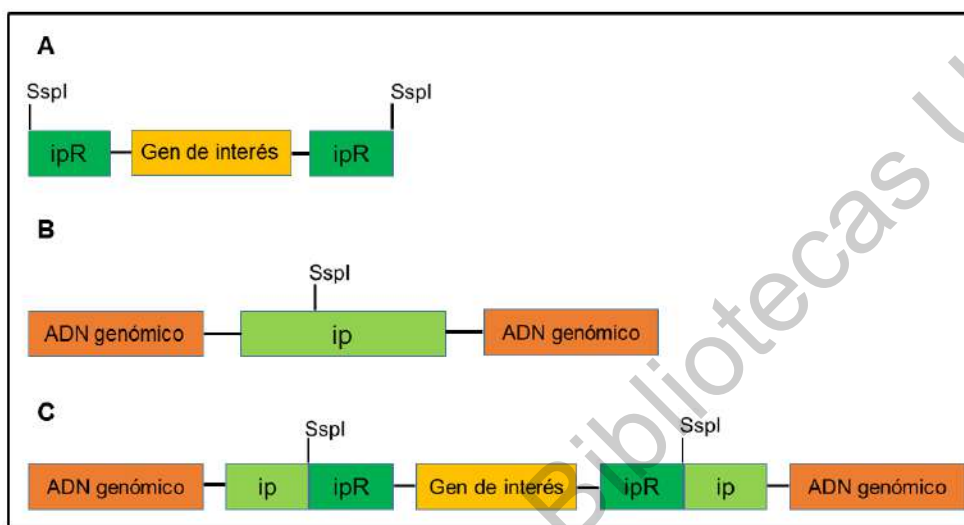


Figura 10: Diagrama de integración por recombinación homóloga. (A) Plásmido linealizado en el locus *ip* que confiere resistencia a la carboxina. (B) Región del ADN genómico conteniendo el locus *ip* silvestre. (C) Plásmido integrado en el ADN genómico mediante recombinación homóloga obteniendo dos copias del locus *ip*, una versión que confiere resistencia y una susceptible al antibiótico.

VI.6.- Transformación genética de *U. maydis*

La transformación genética de las cepas AB33 y $\Delta rim101$ se realizó siguiendo los pasos del protocolo descrito por (García-Pedrajas et al., 2010). Posterior a la incubación durante 5 días a 28°C, se obtuvieron transformantes resistentes a carboxina, estas se observan en las colonias obtenidas marcadas con flechas rojas, como se observa en la figura 11, estas luego fueron recuperadas en medio DMCS adicionados con 3.5 µg/ml de carboxina. Las placas se incubaron a 28 °C durante el periodo de regeneración que constó de 5 a 4 días.



Figura 11: cepas obtenidas de la transformación genética de la cepa AB33.

A las cepas transformantes recuperadas se les resembró en medio completo complementado con 3.5 $\mu\text{g/ml}$ de carboxina para mantener la presión de selección, subsecuentemente se les cultivó en medio líquido completo suplementado con 3.5 $\mu\text{g/ml}$ de carboxina y 4 $\mu\text{l/ml}$ de ampicilina, se les incubó por 20 h a 28 °C con agitación, los cultivos fueron centrifugados para obtener una pastilla de células a la cual se le sometió al protocolo de extracción de ADN genómico para obtener el ADN puro para las pruebas de PCR.

Las pruebas de PCR se realizaron usando los pares de oligonucleótidos 2231 y 2232, así como 2234 y 2235; esto con la finalidad de determinar la integración del plásmido linearizado en el locus *ip*; es decir que la integración haya sido homóloga y que la capacidad para crecer en carboxina no se debe a una mutación espontánea que le de resistencia al antifúngico, o a una integración ectópica (Tao et al., 2020), (Figura 12). Se realizó un primer escrutinio, en el que se identificó un grupo de cepas transformantes, con la finalidad de tener transformantes puras y fijar la integración del plásmido, se procedió a sembrar cada una de ellas en cajas de medio completo con carboxina 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para obtener

colonias aisladas. De cada transformante de interés se tomó una colonia, se sembró en las mismas condiciones, y una vez crecida se preparó un cultivo líquido para obtener ADN para proceder a realizar la confirmación por reacciones de PCR, de aquí tomamos a la cepa 992 como control positivo.

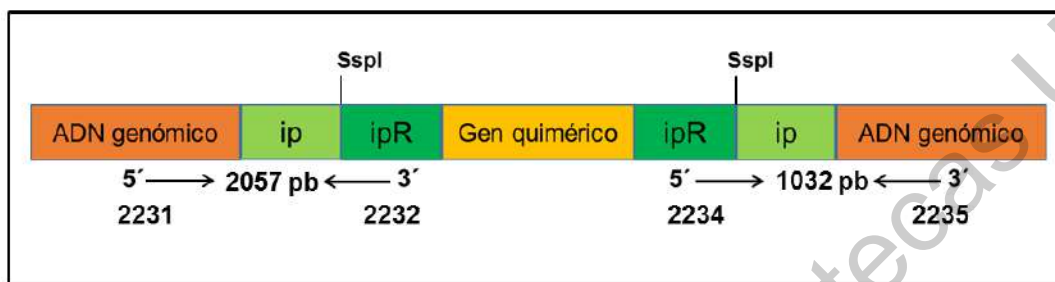


Figura 12: Diagrama de integración del plásmido al ADN genómico de *U. maydis* junto con las áreas de amplificación para los oligonucleótidos.

Estas pruebas de PCR fueron realizadas usando los pares de oligonucleótidos 2231 y 2232, así como el par 2234 y 2235 (Figura 13), los cuales fueron diseñados mediante el programa APE, usando secuencias localizadas en el genoma del plásmido, en el locus *ipR* y en el genoma de *U. maydis* que flanquea el locus *ip*. El par de oligonucleótidos 2231 y 2232 amplifican una banda de 2057 pb, una amplificación del tamaño esperado indica que el plásmido se integró en el locus *ip* (extremo 5'). Por otro lado, para el par de oligonucleótidos 2234 y 2235 fueron diseñados de la misma manera usando las secuencias del locus *ip* silvestre de *U. maydis* y la región flanqueante del locus *ip* plasmídico, este par fue diseñado para asegurar la recuperación del locus *ip* silvestre, lo que indicaría integración del plásmido mediante la recuperación de este locus, en el extremo 3' de gen (Stock et al., 2012).

Primero se realizó un PCR para el amplicón *ip^R* con un tamaño de 2 kb, con el cual se indica la integración del plásmido al genoma de *U. maydis* usando cepas de cada transformante siendo estas 995, 997, 999, 1001, 1003, 1008, 1009, 1010, 1012, 1014 y 1015, se usó la cepa 992 como control positivo y agua como el

negativo (Figura 13) se decidió usar la cepa 992 como control positivo ya que esta fue usada en un experimento previo de PCR con los mismos oligonucleótidos 2231y 2232 observando que esta cepa amplificaba en este experimento se tomó como el control positivo para este experimento de escrutinio.

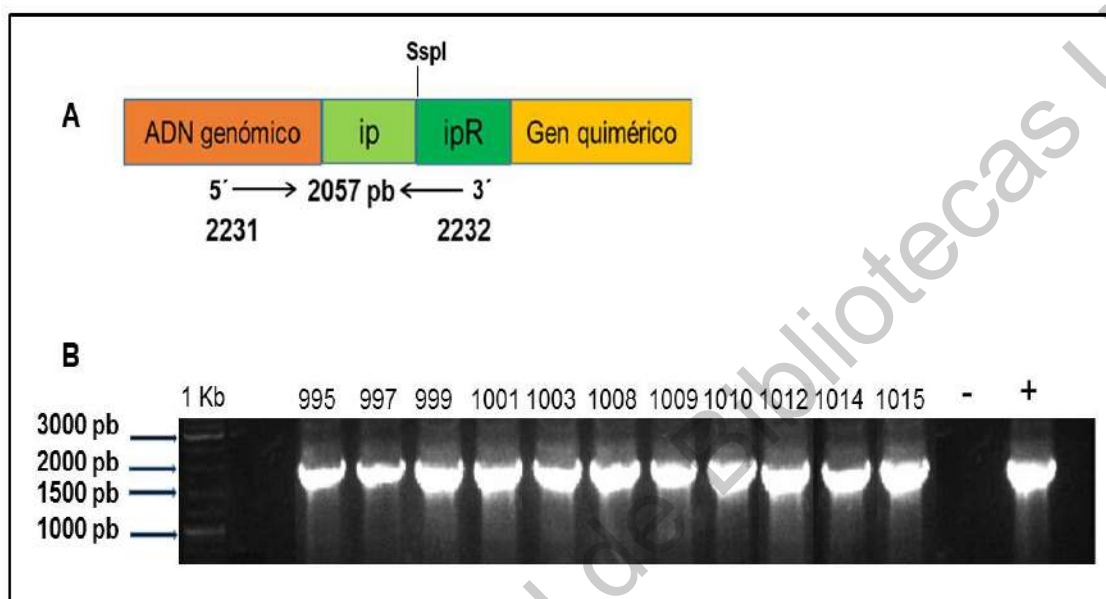


Figura 13: Identificación de las transformantes por PCR extremo 5'. (A) Diagrama del área de amplificación para los oligonucleótidos 2231 y 2232 resultando en un amplicon de 2 kb (A)- (B) Amplicón obtenido del tamaño de 2 kb; marcador de peso molecular (1kb), amplicones del tamaño esperado, -, control negativo (agua) +, el control positivo.

Una vez obtenido ese dato se procedió a realizar un PCR para el amplicón *ip* con un tamaño de 1 kb que indica la recuperación del locus *ip* silvestre. Se muestra la amplificación obtenida usando las cepas transformantes 997, 1001, 1003, 1010, 1012 y 1014, como control se usó la cepa parental AB33 como control positivo y agua como el negativo (Figura 14).

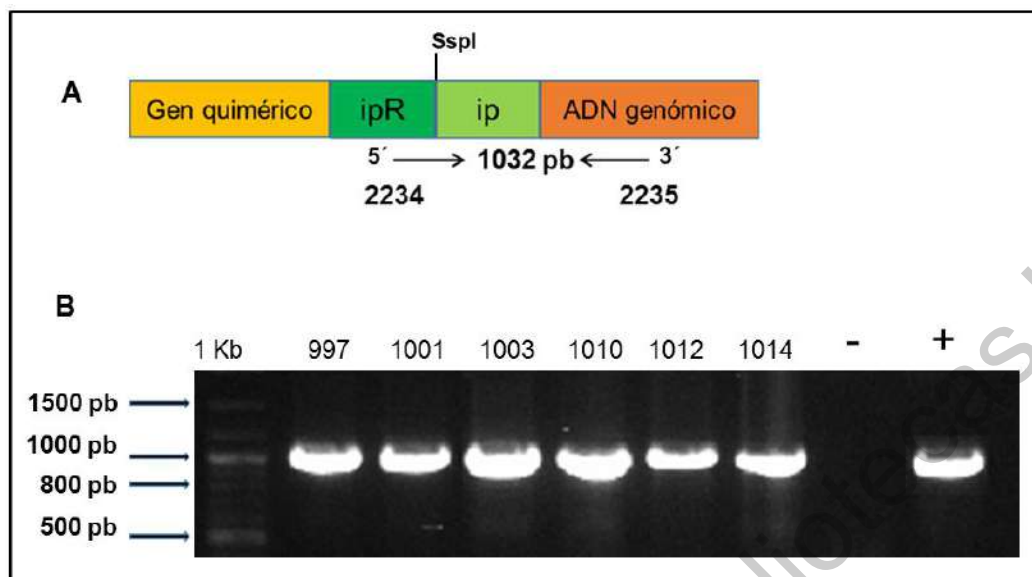


Figura 14: Identificación por PCR de cepas transformantes extremo 3'. A) Esquema de amplificación para los oligonucleótidos 2234 y 2235 posterior a la integración del plásmido linearizado con la enzima SspI en el locus *ip*, resultando de la integración en el locus *ip*. B) Amplicón de 1 kb. Escalera; O'GeneRuler DNA Ladder marca Thermo-Scientific.

Posterior a realizar las pruebas de PCR, Con los resultados de las amplificaciones indicaron que se obtuvo un total de 24 cepas que dieron positivo para las reacciones de PCR, de las cuales 16 son derivadas de la cepa AB33 modificadas y 8 de la cepa $\Delta rim101$, como se observa en la tabla 3.

VI.7 Expresión de los genes quiméricos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1(x2)

Para analizar la expresión de los genes quiméricos, las extracciones de ARN se iniciaron con una prueba para determinar el tiempo de incubación necesario. Para ello se realizaron cultivos de las cepas de interés a 28 °C por 20 h y 44 h respectivamente. Con estos cultivos procedimos a realizar la síntesis de DNAc, se realizó un análisis de expresión de los genes quiméricos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1(x2). Las cepas se incubaron a

28 °C por 20 h (A) y 44 h (B). Se amplificó un fragmento del gen quimérico con los oligonucleótidos 2236-2237. Como control negativo se incluyó a la cepa parental (AB33), como control positivo el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 (P). El análisis de expresión indicó que los cultivos incubados durante 44 h se obtuvo mejor expresión (Figura 15), por lo cual se seleccionó dicho tiempo de incubación para analizar el conjunto de cepas transformadas con los plásmidos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1(x2), se realizó una expresión de los genes quiméricos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1(x2). La expresión de gen quimérico se detectó por amplificación con los oligonucleótidos 2236 y 2237 que amplifica el gen de interés. (A), gen quimérico. (B) amplificación de un fragmento del gen de actina (oligonucleótidos 2035-2036), más una amplificación de un fragmento del gen de actina en el ARN tratado con DNAsal para determinar ausencia de contaminación de ADN genómico (Figura 16). De esta manera se determinó que de las cepas previamente seleccionadas, 10 derivadas de la cepa parental AB33 y 4 de la parental *Δrim101* expresan el gen quimérico (tabla 3).

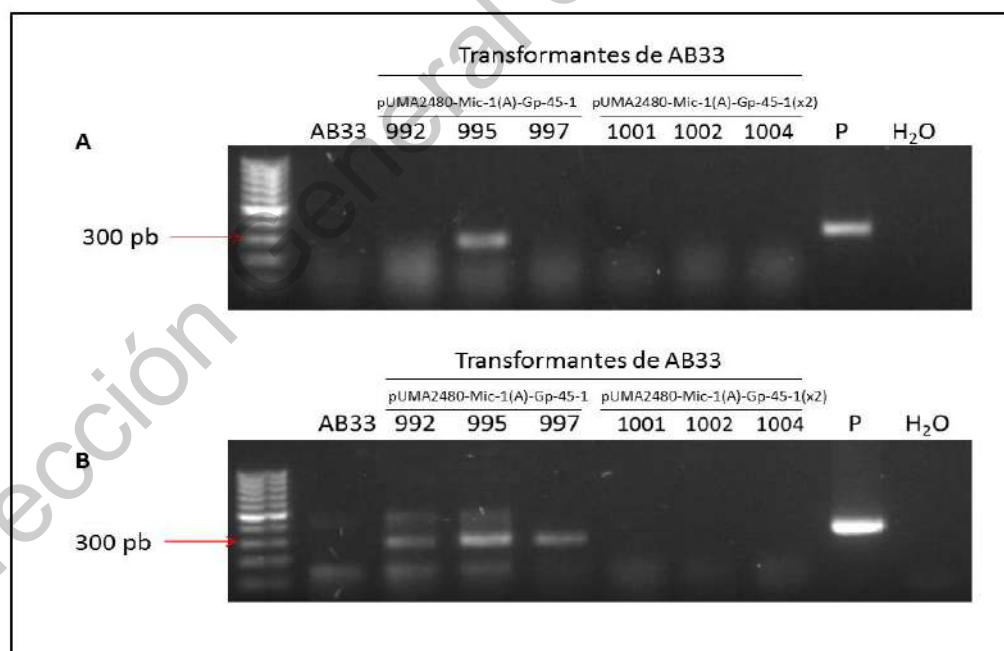


Figura 15: Resultados de experimentos de crecimiento a 20 h (A) y 44 h (B). El producto a 35 ciclos de PCR se separó en gel de agarosa al 1.2 %, fue corrido a 80 volts por 40 minutos, como marcador de peso molecular se utilizó 100 pb (Thermo Scientific).

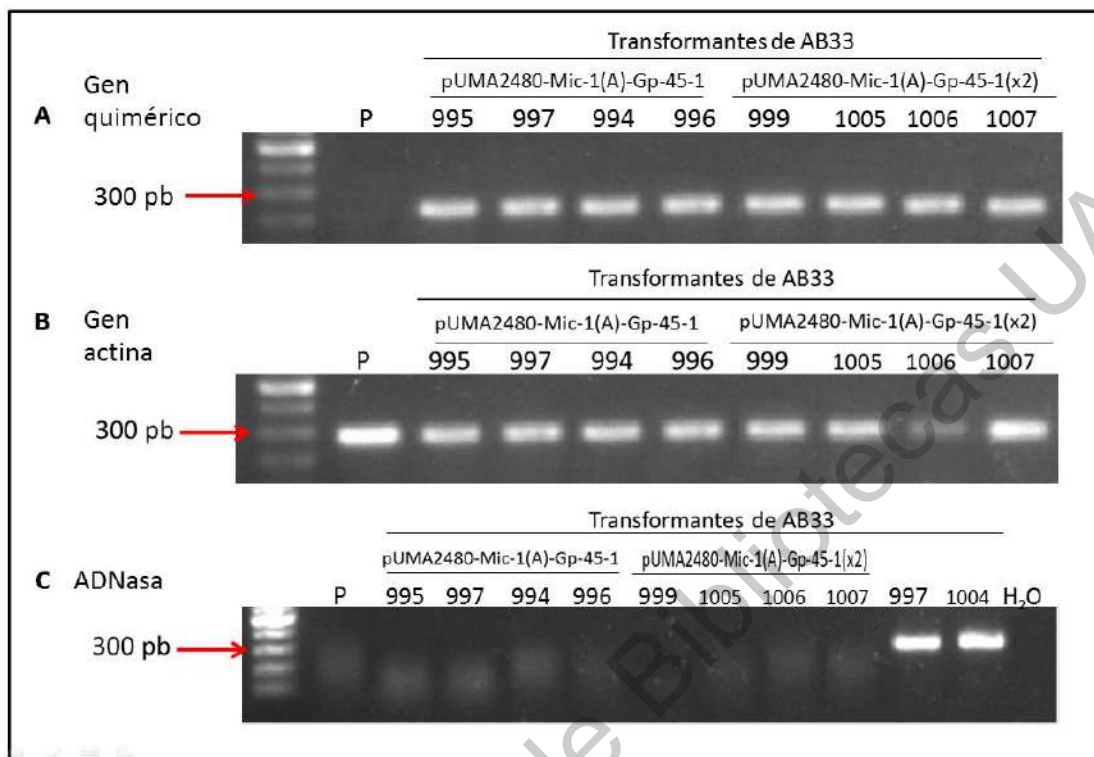


Figura 16: Resultados de expresión de gen de interés (A), gen de actina (B) y ARN tratado con ADNasa (C). Los productos de amplificación se separaron en gel de agarosa al 1.2%. La muestra se corrió por 80 volts por 40 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó 100 pb (Thermo Scientific) el PCR se realizó a 35 ciclos.

Así mismo, se consideró investigar el nivel de expresión del gen quimérico en otro medio de cultivo, para ello se utilizó medio mínimo. Para este experimento se crecieron las cepas 992, 995 y 997, las cuales previamente se observó que el gen quimérico se expresó en medio completo. Para ello se prepararon los cultivos de interés, las cepas se incubaron 20 h y 44 h. Una vez realizado el ensayo de RT PCR, determinamos que las cepas 992, 995 y 997 expresan el ARNm correspondiente al gen de interés (tabla 17), así mismo se observó una mejor expresión a las 44 h, de manera similar a lo observado en medio completo. Este dato es de interés para ser considerado para la producción de la proteína, considerando que el medio de cultivo al carecer de proteína como nutrientes, el

hongo se verá limitado en la producción de proteasas, siendo así menos probable la degradación de la proteína de interés.

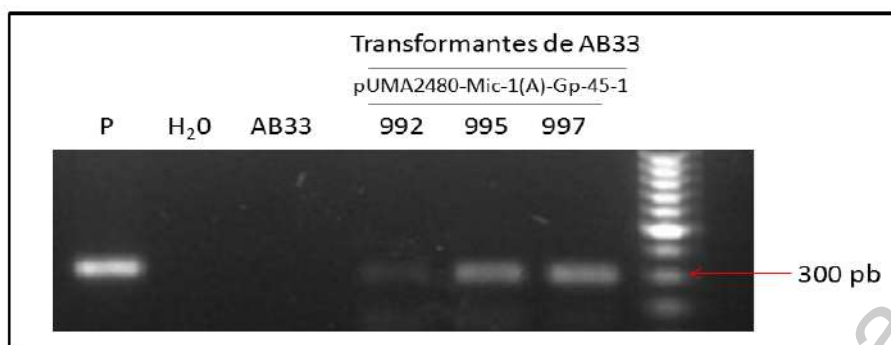


Figura 17: Expresión de los genes quiméricos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp-45-1(x2) en medio mínimo. Las cepas 992, 995 y 997 se crecieron en medio mínimo. Se observa la banda de amplificación de 300 pb obtenida con los oligonucleótidos 2236-2237. (P) como control negativo cepa parental AB33 y el plásmido 881 como control positivo. El producto de PCR se realizó a 35 ciclos, se separó en gel de agarosa al 1.2%. y fue corrido a 80 volts durante 40 minutos.

Tabla 3: Transformantes que portan los plásmidos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2) y que expresan el gen quimérico

Cepa	Plásmido	Amplifica PCR	Amplifica RT	
992	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
993	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
994	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
995	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
996	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
997	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
998	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	No	
999	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	Si	
1000	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	No	
1001	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	No	
1002	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	No	
1003	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	No	

1004	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	No	
1005	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	Si	
1006	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	Si	
1007	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	Si	
1008	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
1009	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
1010	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	Si	Si	
1011	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1	No crece	No crece	-----
1012	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	No	
1013	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	Indeterminado	
1014	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	Si	
1015	pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)	Si	Indeterminado	

VI.8.- Identificación de la proteína Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2).

Una vez identificadas las transformantes que integraron el plásmido en el locus *ip*, y que además expresan el gen quimérico, procedimos a determinar la presencia de la proteína de interés, la cual es de 38 y 35 KDa respectivamente, puesto que está fusionada al péptido Cts1 estas alcanzan los 100 KDa. Estas cepas se sembraron en medio completo suplementado con MOPS considerando el efecto inhibitor del buffer contra las proteasas producidas en medio de cultivo (Terfrüchte et al., 2017), para por medio de SDS-PAGE y de Western blot identificar la proteína de interés. En primera instancia realizamos la precipitación de proteínas con el método de sulfato de amonio a 100% de saturación. Y con base a los resultados obtenidos procedimos a utilizar como método alternativo la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) se realizaron pruebas Bradford para determinar la cantidad de proteínas presentes, se cargaron en los geles y se dejaron correr, observándose en los resultados de geles con sulfato de amonio una cantidad muy baja de proteína, así mismo se trabajó con la fracción de células para determinar si la proteína de interés se encontraba en el interior de la células.,

estas fueron trituradas con nitrógeno y luego puestas en vortex con perlas de vidrio para garantizar su ruptura estas muestras fueron corridas junto con los precipitados de medios, observando que no había presencia de proteínas de interés en los precipitados procedente de las células, además de que los precipitados de células metían demasiado ruido por la alta cantidad de proteínas presentes.

Por este método de precipitación y todas las condiciones probadas, las proteínas precipitadas siempre mostraron una migración aberrante, debido al exceso de sulfato utilizado (Wang et al., 2007) como resultado representativo mostramos el gel de la figura 18, en el que se muestra la probable presencia de la banda de interés (100 KDa), en el control correspondiente a la cepa parental, AB33, no se observa dicha banda. Finalmente cabe mencionar que se dejó de trabajar con la cepa *Δrim101* debido al polisacárido que esta cepa produce ya que impedía una correcta precipitación de las proteínas de interés.

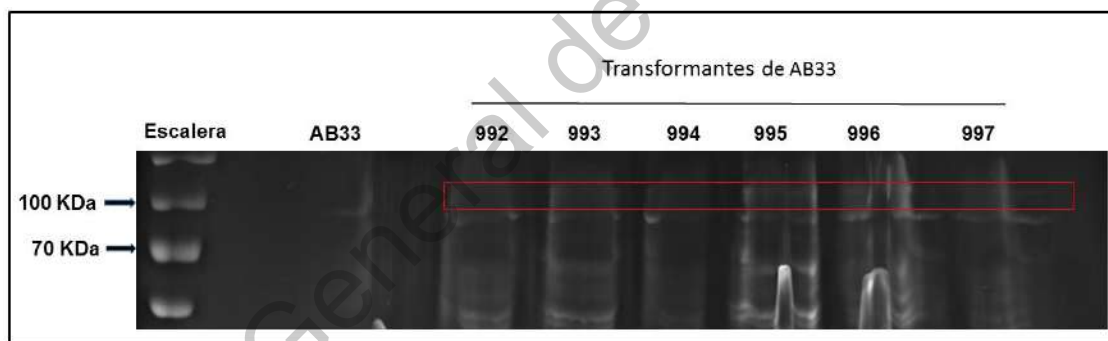
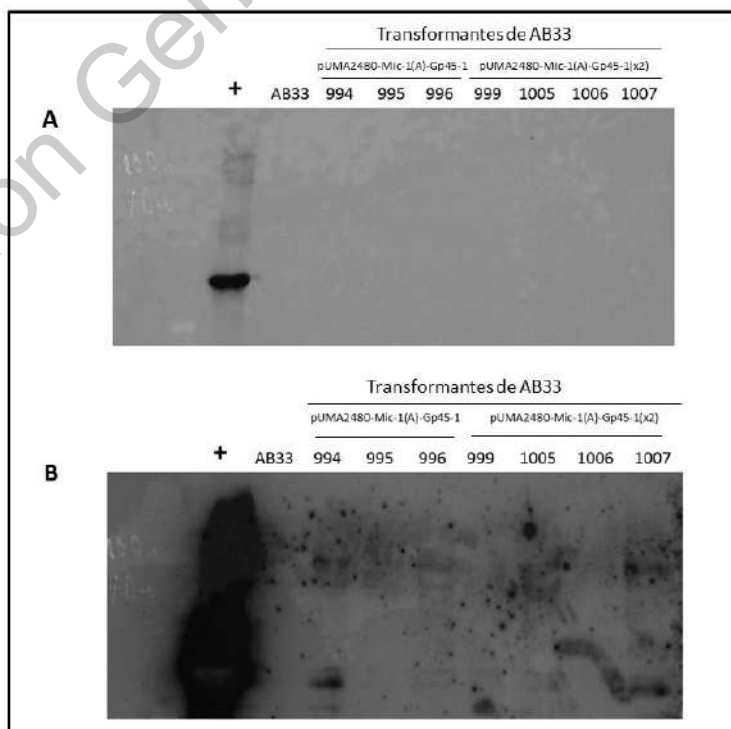


Figura 18: Resultados de SDS-PAGE, observándose bandas de los tamaños esperados (recuadro rojo) se corrieron geles de 10% de poliacrilamida, se cargaron 20 µg/µl de proteína. El gel fue corrido a 100 volts y 200 mAmp.

VI.9.- Identificación de la proteína Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2) por Western blot

El siguiente paso fue determinar la presencia de las proteínas Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2), por medio de un Western blot mediante su detección con anticuerpos de ratón, dirigidos contra cola de histidinas anti his-tag,

considerando que el péptido quimérico porta dicha etiqueta, se realizó un precipitado de proteínas del medio de cultivo con TCA, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se realizó un SDS-PAGE, cabe mencionar que con las proteínas precipitadas con el TCA se obtuvieron mejores resultados que los previamente obtenidos con la precipitación con sulfato de amonio. Este gel se transfirió a la membrana y se procedió a realizar el Western blot, utilizado un anticuerpo secundario anti-ratón, la interacción se reveló con el reactivo Luminol, a diferentes tiempos de exposición de 5 segundos, 10 minutos y 20 minutos. El revelado realizado a los 5 segundos, permitió observar solo la señal del control positivo, el cual se trata de una proteína heteróloga del virus SARS-Cov-2, la cual cuenta con una cola de histidinas, pero al aumentar más el tiempo de exposición, se logró observar una señal en el tamaño de las bandas donde se encuentra los péptidos de interés (100 KDa), sin embargo, esta señal es débil y con un alto tiempo de exposición, este dato sugiere la presencia de la proteína esperada en las cepas 994, 995, 996, 999, 1005, 1006 y 1007, aunado a que dicha señal no se observó en la cepa parental AB33 y abre la posibilidad para afinar las condiciones de obtención de la proteína para realizar el análisis en la pastilla de células molidas, así como en el sobrenadante de las proteínas molidas (Figura 19).



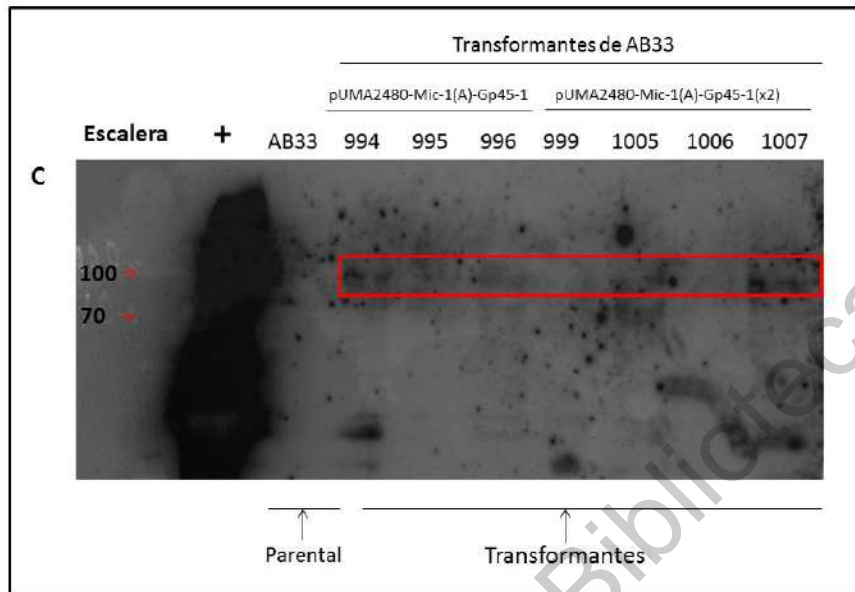


Figura 19.- Resultado del Western blot, a 5 segundos de exposición (A), diez minutos de exposición (B) y veinte minutos de exposición (C), se observan las bandas tenues de las proteínas en los tamaños esperados (C, remarcados en rojo)

VII.- Discusión:

La producción de compuestos de interés biotecnológico ha sido uno de los principales motores del avance industrial, tanto en el ámbito farmacéutico y alimenticio en las últimas décadas (Jaeger et al., 2001, Demain & Vaishnav, 2009, Sasaki et al, 2019). Ésto aunando la capacidad de modificar genéticamente a los organismos para que sean capaces de producir dichos compuestos, se ha convertido un motivo importante para la investigación y progreso de estas áreas, así como el desarrollo de la humanidad (Berlec & Strukelj, 2013, Kaur et al., 2017 Cai et al., 2018).

A lo largo de este tiempo se han utilizado diferentes modelos de expresión, sin embargo, no existe el modelo ideal ante todas las condiciones o intereses de investigación (Demain & Vaishnav, 2009, Berlec & Strukelj, 2013). Es por eso que la búsqueda de nuevos modelos de producción es algo importante e indispensable, es así que se ha implementado la búsqueda de nuevos modelos, como es el caso de *Ustilago maydis*, ya que este organismo posee varias cualidades que lo hacen deseable como modelo en comparación de otros organismos usados actualmente tales como *E. coli* en el caso de bacterias, o *Aspergillus niger* en el caso de hongos filamentos (Demain & Vaishnav, 2009, Lubertozzi & Keasling, 2009 ,Burdette et al., 2018). Entre las características que presenta *U. maydis* podemos mencionar la facilidad de su modificación genética, su inocuidad para el ser humano, ya que se le consume como huitlacoche desde tiempos ancestrales (Ruiz-Herrera, 2008) y su fácil manejo en el laboratorio. También *U. maydis* ya ha sido usado desde hace décadas para la investigación de varias áreas de desarrollo, iniciando con los estudios de los procesos moleculares y celulares (Kamper et al., 2006, Ruiz-Herrera, 2008, Juárez-Montiel 2011) hasta la producción de metabolitos secundarios como subunidades proteicas de toxinas (Monreal-Escalante et al., 2016) y de anticuerpos (Sarkari et al., 2014, Terfrüchte et al., 2017). Por todo esto, se decidió usar a *U. maydis* como un modelo de producción de péptidos del parásito de bovinos *Babesia bigemina*, con motivo de un productor alternativo y más accesible en comparación a otros métodos, tales

como la producción sintética de péptidos, el cual ha sido utilizado pero tiene un alto costo (Mercado 2017). Aunado a ello, este método de producción de péptidos también es importante para evitar las reacciones cruzadas cuando se emplean bacterias para producir vacunas en bovinos ya que estas dan falsos positivos por contaminación de proteínas bacterianas (Mosqueda et al., 2012, Jaramillo Ortiz et al., 2018).

En este estudio se usó a este hongo para la modificación genética de las cepas AB33 y $\Delta rim101$. Estas se seleccionaron debido a sus características deseables. La cepa AB33 presenta ambos alelos compatibles para iniciar la formación de filamentos de la fase infecciosa, lo cual se logra mediante el crecimiento en medio mínimo con nitrato. Adicionalmente, en la forma de levadura, esta cepa presenta una alta secreción de proteínas al medio de cultivo (Brachmann et al., 2001). De tal forma que ha sido utilizada exitosamente para la producción heteróloga de péptidos (Stock et al., 2012, Sarkari et al., 2014, Terfrüchte et al., 2017). Por otro lado, la cepa $\Delta rim101$ presenta una mutación en el gen *rim101* el cual está involucrado en la secreción de proteasas, la mutante $\Delta rim101$ presentan disminuida la producción de proteasas, lo cual es deseable y óptimo para la síntesis de proteínas heterólogas, ya que las proteínas producidas serían menos susceptibles a la degradación por parte del sistema proteolítico de este hongo (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera. 2005).

En cuanto a la expresión del gen quimérico se seleccionó el plásmido pUMA2480, por su utilidad en experimentos previos de transformación genética de *U. maydis* (Stock et al., 2012, Sarkari et al., 2014, Terfrüchte et al., 2017). El plásmido también posee el promotor constitutivo fuerte pOMA, el cual está constituido por repetidos del promotor mínimo del gen *mfa1* que codifica para la feromona lipopeptídica pequeña Mfa1 y ocho repeticiones de 40 pb de secuencias de activación río arriba. Con este plásmido se ha observado un excelente nivel de expresión en comparación con el promotor pOtef, que también es un promotor fuerte (Sarkari et al., 2014), aunado a ello pUMA2480 porta el gen resistencia a caboxina (*ip'*) que será útil para integrar la construcción de interés en el locus de la

succinato deshidrogenasa (locus *ip*), puesto que se ha determinado que los transgenes integrados en este locus se expresan de manera correcta, por ejemplo la enzima β -glucuronidasa (Gus) (Stock et al., 2012), moléculas más complejas como anticuerpos (Sarkari et al., 2014, Terfrüchte et al., 2017), o compuestos de interés bioquímicos como el ácido málico (Zambanini et al 2017) y expresar genes deseables en hongos comestibles (Herzog et al., 2019).

El trabajo *in silico* realizado para estructurar el arreglo de la secuencia de aminoácidos Mic-1(A) y Gp45-1, los cuales se seleccionaron por los resultados en trabajos previos donde se demostró su capacidad para producir una respuesta inmune específica contra estos péptidos y que son únicos para *B. bigemina* (Valdes 2015, Mercado 2017), se diseñaron varios arreglos de los péptidos mediante el uso de varios programas de inmunopredicción, tales como ABCpred, BCEpred y IEDB (Potocnakova et al., 2016). Mediante tales programas se corrieron simulaciones para determinar cuáles son las conformaciones óptimas, obteniendo las secuencias de aminoácidos Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2), los cuales están conformados por un péptido Mic-1(A) y un Gp-45 repetido una o dos veces dependiendo del arreglo, se repitieron en tándem 10 y 6 veces respectivamente, la repetición se realizó en función de lo observado previamente, en el que se demostró que este tipo de repeticiones potencia la respuesta inmune por mencionar un ejemplo, en la fiebre aftosa producida en bovinos (foot-and-mouth disease virus o FMDV en inglés) al usar acomodos de péptidos virales VP1, B1B2 y TT-P2 (Cui et al., 2019), al igual que se ha usado una vacuna de proteína recombinante contra las garrapatas rBmVDAC que reduce la repleción y la ovoposición (Ortega-Sánchez et al., 2020).

Con el arreglo estructural de los genes quiméricos, expresados bajo el promotor pOMA, se obtuvieron las transformantes de las cepas AB33 y $\Delta rim101$ con los plásmidos pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y 1pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2) respectivamente. Para garantizar la óptima la expresión y traducción de los genes quiméricos en *U. maydis*, se realizó la optimización de codones para su uso en *U. maydis*, se utilizó el programa en línea (<http://dicodon->

optimization.appspot.com/) y las tablas de optimización de codones para *U. maydis* (Zarnack et al., 2006), entre el uso de las tablas y el programa en se observó que solo hubo un cambio en un nucleótido, una citosina por una timina en algunas de las secuencias de tripletes de Gp45-1, mientras que en Mic-1(A) no hubo cambio alguno. Se seleccionó la secuencia obtenida mediante el programa en línea y finalmente se le agregó de una cola de diez histidinas al inicio del gen de interés para la purificación de la proteína por medio de columnas de purificación I.M.A.C (por sus siglas en Inglés: Immobilized metal ion affinity chromatography). Esta secuencia se utilizó además para la detección por anticuerpos comerciales anti-His, la secuencia de Kozak se agregó para un correcto inicio de la traducción del gen de interés (Zhang et al., 2006, Fernández et al., 2013, Blanco et al., 2020).

Posterior a la transformación identificamos cepas resistentes a carboxina, de las cuales se recuperaron 32 de las cepas transformadas de AB33, 10 portan el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y 12 el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2), y 10 de $\Delta rim101$ de los cuales fueron 5 transformantes con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1y 5 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2). El siguiente paso fue determinar que las cepas transformantes obtenidas integraron el plásmido correctamente al ADN genómico (locus *ip*), y que no fueran producto de resistencia espontánea al antifúngico. Se realizó mediante pruebas de PCR con los oligonucleótidos 2231-2232 y 2234-2235 que amplifican en los extremos 5' para la versión con resistencia y 3' para la versión silvestre recuperada respectivamente de los locus *ip* de las cepas que integraron los plásmidos ya que un oligonucleótido se alinea en el plásmido y el otro en el ADN genómico, una vez comprobado se obtuvieron 23 cepas las cuales amplificaron para estas reacciones de PCR, estas 16 cepas transformadas de AB33, 7 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y 9 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2), y 8 de $\Delta rim101$ de los cuales fueron 4 transformantes con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y 4 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2), significando que estas cepas integraron el plásmido y 8 se volvieron resistentes espontaneas por lo cual fueron descartadas. Posteriormente se comprobó que las

cepas transcribieran el gen de interés por ensayos RT-PCR usando los oligonucleótidos 2236-2237 que amplifican un fragmento del gen de interés, los oligonucleótidos se diseñaron en la secuencia Gp45-1 final para 2236 y en el locus Cts 1 del plásmido para el oligonucleótido 2237, puesto que el gen quimérico al ser un repetido, los oligonucleótidos se podrían alinear en múltiples regiones y con este acomodo de los oligonucleótidos se aseguró que solo amplifiquen las cepas que están expresando el gen de interés, y aunque el genoma de *U. maydis* tiene el gen que codifica para Cts 1, solo los oligonucleótidos que se alinearon con la copia de Cts 1 del plásmido van a generar la amplificación en el PCR (Stock et al., 2012). Para el ensayo de expresión se realizó una cinética corta, para determinar a qué tiempo de cultivo existe una mayor expresión de los genes quiméricos se inició con una incubación de seis cepas derivadas de la parental AB33, tres con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y tres con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2), se incubó por 20 h en MC adicionado con 0.1 M de MOPS para reducir la degradación de las proteínas secretadas e igualar las condiciones de cultivo de Terfrüchte et al., 2018, se realizó un RT-PCR, se observó que se producía poca cantidad de ARNm del gen de interés, por lo cual se aumentó el tiempo de cultivo a 44 h y se realizó el RT-PCR correspondiente donde se obtuvo mejores resultados al observar bandas con mayor intensidad, finalmente se ajustó a 44 h el tiempo de incubación para el resto de las cepas y así determinar en cuáles cepas expresan el gen de interés, obteniendo 14 cepas que amplificaban en el RT-PCR, de las cuales fueron 10 cepas transformadas de AB33, 6 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y 4 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2), y 4 de la cepa *Δrim101* de los cuales fueron 3 transformantes con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1 y 1 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2), descartando las otras 9 cepas ya que no estaban expresando el gen de interés, lo cual puede ser porque el gen de interés se dañó por alguna mutación, tal como una delección (Gordon et al., 2015), en la secuencia importante del gen o del plásmido, esto debido al manejo del material genético al exponerlo a rayos UV, problemas al momento de la traducción del gen o degradación del

ARNm (Hager et al., 2009, Yao, 2017) o la proteína que se está produciendo es tan poca que es imperceptible (Ahmad et al., 2014).

Cabe mencionar que también se realizó un experimento de crecimiento en medio mínimo donde se incubaron las cepas 992, 995 y 997 (transformantes de AB33 con el plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1). El análisis de expresión indicó que estas cepas expresan el gen de interés en estas condiciones de crecimiento, aunque se observó una banda ligeramente más débil en comparación con las cepas crecidas en medio completo, esto debido al crecimiento más lento por de las células en este medio. Por lo que el crecimiento en medio mínimo es un método viable para realizar a futuro experimentos en el que se varié el tiempo de incubación así como el volumen de cultivo para obtener a las proteínas quiméricas.

Posteriormente, se determinó la presencia de la proteína por medio de geles SDS-PAGE y Western blot, en cultivos obtenidos a las 44 h de crecimiento seleccionados por presentar una mayor intensidad de las bandas de RT-PCR, con el objetivo de potencializar su producción. Es importante mencionar que a los medios se les adicionó 0.1 M de MOPS para reducir la actividad de proteasas que podrían ser secretadas al medio de cultivo y así evitar degradación de los péptidos de interés como se observó en un experimento previo (Terfrüchte et al., 2018). Es importante mencionar que la cepa *Δrim101* que presenta un deseable sistema proteolítico disminuido por lo que esta produciría menos enzimas proteolíticas en comparación de la cepa AB33, no fue posible utilizarla para obtener los péptidos producidos por esa cepa, debido a que se produce un polisacárido que se secreta al medio de cultivo y lo torna viscoso (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera. 2005). Para optimizar el uso de la cepa será necesario implementar algún paso que permita eliminar el polisacárido, tal como el método de Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera describen usando etanol para precipitar el polisacárido y removerlo por centrifugación, dejando así el medio libre, o usando LPMOs (lytic polysaccharide monooxygenases) para degradar este polisacárido (Forsberg et al., 2019). Para purificar las proteínas Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-

Gp45-(x2) derivadas de la cepa AB33 modificadas genéticamente, utilizamos dos protocolos para precipitación de los péptidos, primero el método con sulfato de amonio, debido a los reportes en el que es utilizado (Wingfield, 2016, Fishman & Berg, 2018, Pringels et al., 2018). Este método fue óptimo para la precipitación de la proteína del medio de cultivo, ya que permitió obtener alta cantidad de proteína dando cantidades mayores a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, sin embargo; también presentó el inconveniente al momento de correr los geles de acrilamida; ya que las muestras quedaban con una alta cantidad de la sal y esto produjo corrimientos aberrantes en los geles, los cuales podrían alterar la lectura del tamaño de las proteínas así obtenida y por lo tanto no se podría asegurar la correcta identidad de los péptidos de interés, en este caso utilizamos la proteína obtenida de la precipitación de los medios de cultivo, al igual que los obtenidos de las pastillas de células; el sobrenadante de los lisados y el precipitado de los lisados, aunque estos dos últimos debidos a la excesiva cantidad de proteínas fue imposible distinguir bandas correctamente en los geles.

. Posteriormente, utilizamos el protocolo con ácido tricloroacético (Wu et al., 2014) para precipitar proteínas del medio de cultivo, con este compuesto se observó que aunque no precipitó la misma cantidad de proteína dando cantidades de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en comparación del sulfato de amonio, al correr los geles de poliacrilamida estos no presentaron el corrimiento aberrante y se pudo observar bandas bien definidas, correspondientes al tamaño esperado (100 KDa), siendo visibles en las cepas 994 y 996 (plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1); así como en las cepas 1005 y 1007 (plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)) con lo cual se corrobora lo obtenido en los resultados de RT-PCR, mientras que es posible que a las cepas faltantes 995 (plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1) y 999 y 1005 (plásmido pUMA2480-Mic-1(A)-Gp45-1(x2)) necesitaran más tiempo de exposición para poder observar las bandas esperadas.

Finalmente, con los resultados obtenidos de los Western blot, este dato sugiere la producción de la proteína de interés en las transformantes de la cepa AB33 con ambas versiones del gen de interés, sin embargo no se está obteniendo

en cantidad esperada, según lo reportado en experimentos previos en los que se expresaron otras proteínas (Stock et al., 2012, Sarkari et al., 2014, Terfrüchte et al., 2017), tal como el control positivo usado, el cual se trató de una proteína quimérica del virus SARS-Cov 2, el cual fue detectado a partir de los 5 segundos de exposición. Por lo cual es necesario, modificar los métodos de cultivo, ya sea agregando un nuevo buffer al ver que MOPS reduce la degradación por proteasas, o bien el crecimiento en medios diferentes tales como el medio mínimo, para evitar lo más posible la degradación de los péptidos desde el momento en que estos están siendo secretados al medio al igual que mejorar el método empleado o utilizar un método más óptimo para la precipitación para obtener la mayor cantidad posible del péptido de interés. Otra alternativa, podría ser de las muestras precipitadas con sulfato de amonio, proceder a su limpieza usando un método con fenol (Wang et al., 2007).

VIII.- Conclusiones:

En este trabajo se realizó la transformación genética de *U. maydis* obteniendo cepas modificadas que produjeron los péptidos de interés como se esperaba por lo cual se corrobora con trabajos previos que *U. maydis* es un buen modelo de trabajo por la facilidad de transformación y que expresa los genes que fueron agregados a su genoma, aunque hubo dificultades en la producción de proteínas heterólogas, ya que posiblemente se debe de proponer un método de purificación mas optimo, aunque con este momentáneo inconveniente *U. maydis* puede ser usado como plataforma de producción para las proteínas Mic-1(A)-Gp45-1 y Mic-1(A)-Gp45-1(x2), por lo cual *U. maydis* es un productor de bajo costo para la producción de estas proteínas que tienen un costo alto por síntesis química.

Aunque aún falta realizar pruebas con métodos diferentes de cultivo tal como el medio mínimo y de precipitación a los utilizados, ya que se observó que aunque se obtenía la proteína mostró los problemas de corrimiento aberrante en el caso de sulfato de amonio o una baja cantidad en el caso del ácido tricloroacético, o bien realizar un protocolo de limpieza para eliminar la sal de sulfato de amonio, además de realizar un protocolo de purificación de proteínas por el método IMAC, para de ese modo buscar los métodos y poder obtener las cantidades esperadas de proteínas.

IX.- Perspectivas:

- 1.- Estudios moleculares como PCR cuantitativo del gen sintético para comprobar su expresión.
- 2.- Estudios de la proteína quimérica para comprobar su estabilidad y capacidad de secreción.
- 3.- Utilizar nuevos métodos de precipitación de proteínas con la finalidad de obtener mayor cantidad, como puede ser métodos con etanol o Trizol.
- 4.- Realizar los ensayos en medio mínimo, ya que se observó que *U. maydis* expresa el ARNm del gen de interés en estas condiciones, de esta manera esto podría disminuir la actividad de proteasas presentes en el medio extracelular.
- 5.- Realizar un SDS-PAGE de proteínas nuevamente precipitadas, para determinar si se puede observar una diferencia en los resultados obtenidos en este trabajo y realizar Western blot con proteínas así precipitadas.
- 6.- Purificar las proteínas Mic-1(A)-Gp-45-1 y Mic-1(A)-Gp-45-1(x2) mediante la cola de histidinas en una columna de níquel, y realizar Western blot.
- 7.- Realizar digestiones de Mic-1(A)-Gp-45-1 y Mic-1(A)-Gp-45-1(x2) con la proteasa HRV 3C, esto para separar la proteína de interés del fragmento de Cts 1 y comprobar la diferencia de tamaño de la proteína por Western blot.

X.- Bibliografía:

Almazán, C., Aguilar-Tipacamu, G., Rodriguez, S., Mosqueda, J., & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, 23(8), 1535-1551. doi: 10.2741/4659

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317. doi:10.1007/s00253-014-5732-5

Al-Sulaiman, A., Vallely, P., Klapper, P., Al Baradie, R., Almatrouk, S., & Alharbi, K. (2017). Expression of variable viruses as herpes simplex glycoprotein D and varicella zoster gE glycoprotein using a novel plasmid based expression system in insect cell. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1497-1504. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.05.003

Aréchiga-Carvajal, E. T., & Ruiz-Herrera, J. (2005). TheRIM101/pacCHomologue from the Basidiomycete *Ustilago maydis* Is Functional in Multiple pH-Sensitive Phenomena. *Eukaryotic Cell*, 4(6), 999–1008. doi:10.1128/ec.4.6.999-1008.2005

Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Aria, M. (2019). Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*. doi:10.1007/s12033-019-00164-8

Berlec, A., & Štrukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(3-4), 257-274. doi: 10.1007/s10295-013-1235-0

Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. doi:10.1093/nar/7.6.1513

Blanco, B., Williams, A. J., Tang, D., Zhan, D., Misaghi, S., Robert F. Kelley, R. F. & Simmons L. C (2020) Tailoring translational strength using Kozak sequence variants improves bispecific antibody assembly and reduces product-related impurities in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020;117:1946-1960. DOI: 10.1002/bit.27347

Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. & Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 42, 1047-1063.

Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Burdette, L. A., Leach, S. A., Wong, H. T., & Tullman-Ercek, D. (2018). Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins. *Microbial Cell Factories*, 17(1). doi:10.1186/s12934-018-1041-5

Cai, D., Rao, Y., Zhan, Y., Wang, Q., & Chen, S. (2019). Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14192

Cui, B., Liu, X., Zhou, P., Fang, Y., Zhao, D., Zhang, Y., & Wang, Y. (2019). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant proteins consisting of multiple epitopes of foot-and-mouth disease virus fused with flagellin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s00253-019-09691-5

Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

Tena Fernández, F., González, I., Doblas, P., Rodríguez, C., Sahana, N., Kaur, H., Canto, T. (2013). The influence of cis-acting P1 protein and translational elements on the expression of Potato virus Y helper-component proteinase (HC-Pro) in

heterologous systems and its suppression of silencing activity. *Molecular Plant Pathology*, 14(5), 530–541. doi:10.1111/mpp.12025

Fisher, T.G., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 2001. Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of *Babesia bigemina*. *Infect Immun* 69:3782-3790.

<https://dx.doi.org/10.1128%2FIAI.69.6.3782-3790.2001>

Fishman, J. B., & Berg, E. A. (2018). Ammonium Sulfate Fractionation of Antibodies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot099119. doi:10.1101/pdb.prot099119

Forsberg, Z., Sørli, M., Petrović, D., Courtade, G., Aachmann, F. L., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V. G. (2019). Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 54–64. doi:10.1016/j.sbi.2019.02.015

García-Pedrajas, M. D., Nadal, M., Denny, T., Baeza-Montañez, L., Paz, Z., & Gold, S. E. (2010). DelsGate: A Robust and Rapid Method for Gene Deletion. *Methods in Molecular Biology*, 55–76. doi:10.1007/978-1-60761-611-5_5

Geiser, E., Reindl, M., Blank, L. M., Feldbrügge, M., Wierckx, N., & Schipper, K. (2016). Activating intrinsic carbohydrate-active enzymes of the smut fungus *Ustilago maydis* for the degradation of plant cell wall components. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(17), 5174-5185.

Grzegorski Steven J., Chiari Estelle F., Robbins Amy, Kish Phillip E. & Alon Kahana (2014) Natural Variability of Kozak Sequences Correlates with Function in a Zebrafish Model PLOS ONE | www.plosone.org September 2014 | Volume 9 | Issue 9 | e108475

Gordon, A. J., Satory, D., Halliday, J. A., & Herman, C. (2015). Lost in transcription: transient errors in information transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 80–87. doi:10.1016/j.mib.2015.01.010

Haber, J. E., Ira, G., Malkova, A. & Sugawara, N. (2004) Repairing a double-strand chromosome break by homologous recombination: revisiting Robin Holliday's model Phil. Trans. R. Soc. Lond. B (2004) 359, 79–86

DOI 10.1098/rstb.2003.1367

Hager, G. L., McNally, J. G., & Misteli, T. (2009). Transcription Dynamics. Molecular Cell, 35(6), 741–753. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.005

Hahn-Löbmann, S., Stephan, A., Schulz, S., Schneider, T., Shaverskyi, A., & Tusé, D. et al. (2019). Colicins and salmocins – new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials. Frontiers In Plant Science, 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00437

Hailemariam, Z., Krücken, J., Baumann, M., Ahmed, J., Clausen, P., & Nijhof, A. (2017). Molecular detection of tick-borne pathogens in cattle from Southwestern Ethiopia. PLOS ONE, 12(11), e0188248. doi: 10.1371/journal.pone.0188248

Herzog, R., Solovyeva, I., Böker, M., Lugones, L. G., & Henricke, F. (2019). Exploring molecular tools for transformation and gene expression in the cultivated edible mushroom *Agrocybe aegerita*. Molecular Genetics and Genomics. doi:10.1007/s00438-018-01528-6

Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene, 57(2-3), 267–272. doi:10.1016/0378-1119(87)90131-4

Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. En R. C. King (Ed.), Handbook of Genetics (Vol. 1, págs. 575-595). New York: Plenum Press.

Jaeger, K., Eggert, T., Eipper, A., & Reetz, M. (2001). Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(5), 519-530. doi: 10.1007/s002530100643

Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. Trends In Parasitology. doi: 10.1016/j.pt.2019.01.007

Jaramillo Ortiz, J., Montenegro, V., de la Fournière, S., Sarmiento, N., Farber, M., & Wilkowsky, S. (2018). Development of an Indirect ELISA Based on a Recombinant Chimeric Protein for the Detection of Antibodies against Bovine Babesiosis. *Veterinary Sciences*, 5(1), 13. doi: 10.3390/vetsci5010013

Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana De Micología*, 28(2), 69-73. doi: 10.1016/j.riam.2011.01.001

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Müller, O. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97–101. doi:10.1038/nature05248

Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli* : Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080

Keon, J.P., White, G.A., Hargreaves, J.A. (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* (Vol 19, págs. 475-481) Springer-Verlag

Levin, G., Aguiar-Koga B. A., Belchior G. G., Ana Claudia Oliveira-Carreira A. C., & Sogayar M. C. (2020) Production, purification and characterization of recombinant human R-spondin1 (RSPO1) protein stably expressed in human HEK293 cells *BMC Biotechnology* (2020) 20:5
<https://doi.org/10.1186/s12896-020-0600-0>

Lin, A. (2015). Indirect ELISA. *Methods In Molecular Biology*, 51-59. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_5

Lipońska, A., Ousalem, F., Aalberts, D. P., Hunt, J. F., & Boël, G. (2018). The new strategies to overcome challenges in protein production in bacteria. *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.13338

Lubertozzi, D., & Keasling, J. D. (2009). Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances*, 27(1), 53–75. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.001

Massa, S., Paolini, F., Marino, C., Franconi, R., & Venuti, A. (2019). Bioproduction of a Therapeutic Vaccine Against Human Papillomavirus in Tomato Hairy Root Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00452

Margolin, E., Chapman, R., Williamson, A., Rybicki, E., & Meyers, A. (2018). Production of complex viral glycoproteins in plants as vaccine immunogens. *Plant Biotechnology Journal*, 16(9), 1531-1545. doi: 10.1111/pbi.12963

Mercado Uriostegui M.A., (2017), Desarrollo de un dispositivo inmunocromatográfico para la detección rápida de anticuerpos contra *Babesia bigemina*, (tesis de maestría), Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro.

Monreal-Escalante, E., Navarro-Tovar, G., León-Gallo, A., Juárez-Montiel, M., Becerra-Flora, A., Jiménez-Bremont, J., & Rosales-Mendoza, S. (2016). The corn smut-made cholera oral vaccine is thermostable and induces long-lasting immunity in mouse. *Journal Of Biotechnology*, 234, 1-6. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.047

Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & Canto, G.J. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504-1518. doi: 10.2174/092986712799828355

Nosrati, M., Behbahani, M., & Mohabatkar, H. (2019). Towards the first multi-epitope recombinant vaccine against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A computer-aided vaccine design approach. *Journal of Biomedical Informatics*, 103160. doi:10.1016/j.jbi.2019.103160 Ortega-Sánchez, R., Camacho-Nuez, M., Castañeda-Ortíz, J. E., Martínez-Benítez, M. B., Hernández-Silva, D. J., Aguilar-Tipacamú, G., & Mosqueda, J. (2020). Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on *Rhipicephalus microplus* fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2019.12.040

Ortega-Sánchez, R., Camacho-Nuez, M., Castañeda-Ortíz, J. E., Martínez-Benítez, M. B., Hernández-Silva, D. J., Aguilar-Tipacamú, G., & Mosqueda, J. (2020). Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on *Rhipicephalus microplus* fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2019.12.040

Potocnakova, L., Bhide, M., & Pulzova, L. B. (2016). An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–11. doi:10.1155/2016/6760830

Pringels, L., Broeckx, V., Boonen, K., Landuyt, B., & Schoofs, L. (2018). Abundant plasma protein depletion using ammonium sulfate precipitation and Protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1089, 43–59. doi:10.1016/j.jchromb.2018.04.045

Rebello, S., Abraham, A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Babu, A. K., Pandey, A. (2018). Non-conventional Yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiology Letters*. doi:10.1093/femsle/fny222

Redkar, A., Matei, A., & Doehlemann, G. (2017). Insights into host cell modulation and induction of new cells by the corn smut *Ustilago maydis*. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00899

Ruiz-Herrera, J. (2008). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Nova Scientia*, 1(1), 118. doi: 10.21640/ns.v1i1.246

Sarkari, P., Reindl, M., Stock, J., Müller, O., Kahmann, R., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2014). Improved expression of single-chain antibodies in *Ustilago maydis*. *Journal Of Biotechnology*, 191, 165-175. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.06.028

Sasaki, Y., Eng, T., Herbert, R., Trinh, J., Chen, Y., & Rodriguez, A. et al. (2019). Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce the biogasoline isopentenol

from plant biomass hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). doi: 10.1186/s13068-019-1381-3

Sambrook, J., & Russell, D. W. (1999). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (3 ed.). New York: Cold Spring Harbor.

Sanders, R., Derking, R., Cupo, A., Julien, J., Yasmeen, A., & de Val, N. et al. (2013). A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but not Non-Neutralizing Antibodies. *Plos Pathogens*, 9(9), e1003618. doi: 10.1371/journal.ppat.1003618

Schnittger, L., Rodriguez, A., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. (2019). Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>

Stephen, S. L., Beales, L., Peyret, H., Roe, A., Stonehouse, N. J., & Rowlands, D. J. (2018). Recombinant Expression of Tandem-HBc Virus-Like Particles (VLPs). *Virus-Derived Nanoparticles for Advanced Technologies*, 97–123. doi:10.1007/978-1-4939-7808-3_7

Stirnberg, A., & Djamei, A. (2016). Characterization of ApB73, a virulence factor important for colonization of *Zea mays* by the smut *Ustilago maydis*. *Molecular Plant Pathology*, 17(9), 1467-1479. doi: 10.1111/mpp.12442

Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal Of Biotechnology*, 161(2), 80-91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.03.004

Stoffels P., Müller M., Stachurski S. , Terfrüchte M., Schröder S., Ihling N., Wierckx N., Feldbrügge M., Schipper K., Büchsb J. (2020) Complementing the intrinsic repertoire of *Ustilago maydis* for degradation of the pectin backbone polygalacturonic acid. *Journal of Biotechnology* 307 (2020) 148-163 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.022>

Sun, X., & Su, X. (2019). Harnessing the knowledge of protein secretion for enhanced protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(4). doi:10.1007/s11274-019-2630-0

Terfrüchte, M., Reindl, M., Jankowski, S., Sarkari, P., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2017). Applying unconventional secretion in *Ustilago maydis* for the export of functional nanobodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 937. doi:10.3390/ijms18050937

Terfrüchte M., Wewetzerb S., Sarkaria P., Stollewerka D., Franz-Wachteld M., Macekd B., Schlepütz T., Feldbrüggea M., Büchsb J. & Schipper K. (2018) Tackling destructive proteolysis of unconventionally secreted heterologous proteins in *Ustilago maydis*, *Journal of Biotechnology* DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.035>

Teijaro, C. N., Adhikari, A., & Shen, B. (2018). Challenges and opportunities for natural product discovery, production, and engineering in native producers versus heterologous hosts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. doi:10.1007/s10295-018-2094-5

Thomazini C. M, Silva-Soares R. P, Flores-Rochac T. R, Azevedo-Sachetto A. T, Santoro M. L., (2019) Optimization of von Willebrand factor multimer analysis in vertical mini-gel electrophoresis systems: A rapid procedure Elsevier 175 (2019) 76-83

Unzueta, U., Vázquez, F., Accardi, G., Mendoza, R., Toledo-Rubio, V., Giuliani, M., Ferrer-Miralles, N. (2015). Strategies for the production of difficult-to-express full-length eukaryotic proteins using microbial cell factories: production of human alpha-galactosidase A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14), 5863–5874. doi:10.1007/s00253-014-6328-9

Valdez Espinoza M.A., (2015), Identificación de epítomos conservados en aislados de *Babesia bigemina*, (Tesis de maestría), universidad nacional autónoma de México, Mexico D.F.

Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., & Feldbrügge, M. (2012). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. FEMS Microbiology Reviews, 36(1), 59-77. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00296.x

Wang W., Liu Q. J., & Cui H. (2007) Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulfate fractionation. Electrophoresis 2007, 28, 2358–2360 DOI 10.1002/elps.200600743

Wingfield, P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. Current Protocols in Protein Science, A.3F.1–A.3F.8. doi:10.1002/0471140864.psa03fs13

Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., & Cresti, M. (2014). Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. Nature Protocols, 9(2), 362–374. doi:10.1038/nprot.2014.022

Yao, J. (2017). Imaging Transcriptional Regulation of Eukaryotic mRNA Genes: Advances and Outlook. Journal of Molecular Biology, 429(1), 14–31. doi:10.1016/j.jmb.2016.11.007

Zambanini, T., Hosseinpour Tehrani, H., Geiser, E., Sonntag, C. K., Buescher, J. M., Meurer, G., Blank, L. M. (2017). Metabolic engineering of *Ustilago trichophora* TZ1 for improved malic acid production. Metabolic Engineering Communications, 4, 12–21. doi:10.1016/j.meten.2017.01.002

Zarnack, K., Maurer, S., Kaffarnik, F., Ladendorf, O., Brachmann, A., Kämper, J. and Feldbrügge, M. (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. Fungal Genetics and Biology, 43(11), pp.727-738.

Zhang, Y., Yin, Y., Hu, P., Yu, J., Xia, W., & Ge, Q. et al. (2019). Mating-type loci of *Ustilago esculenta* are essential for mating and development. Fungal Genetics and Biology, 125, 60-70. doi: 10.1016/j.fgb.2019.01.008

-Anexo 1:

1.- Reactivos:

-Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8

-Solución II: 0.2 M NaOH, 1% SDS

-Solución III: 3 M acetato de potasio, 2 M ácido acético glacial

-Solución de sales: KH_2PO_4 16g, Na_2SO_4 4g, KCl 8g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1g, elementos traza (solución 2000X) 2ml

-Solución SCS: 20 mM de citrato de sodio (pH 5.8), 1M de sorbitol

-Solución STC: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM CaCl_2 , 1M sorbitol

-T.E.: 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5

-Buffer II: 25 mM tris-HCl (pH 7.5), 25mM CaCl_2 , 1M de sobitol

-Etanol al 70% y 100%

-Isopropanol marca Sigma

-Fenol marca Sigma

-Cloroformo marca Sigma

-Ácido acético glacial al 100%

-PEG: polietilenglicol

-DMSO: dimetilsulfóxido

-TSNTE: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8

-guanidina-HCl: 1M

-TBST: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20

- Solución de ligación: 0.2 M carbonato-bicarbonato, pH 9.4
- Solución de bloqueo: 5% de leche descremada en TBST
- Solución de lavado: amortiguador Tris salino (pH 7.4), 0.1 % (v/v) Tween 20
- Buffer de dilución: 2 % leche descremada en TBST
- buffer TAE (50x 1L): 242 gr de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de solución 500 mM de EDTA (pH 8.0) se afora a 1 L
- Peptona de caseína marca BD bioxon
- Extracto de levadura marca usb
- Nitrato de amonio marca Sigma-Aldrich
- Cloruro de sodio
- Glucosa
- Agar bacteriológico marca Agarmex

2.- Antibióticos:

- Ampicilina (stock de 100 µg/ml)
- Carbenicilina (stock de 100 µg/ml)
- Carboxina (stock de 5000 µg/ml)
- Kanamicina (stock de 100 µg/ml)
- Higromicina B (stock de 5000 µg/ml)

3.- Medios de cultivo:

- Medio LB (medio Luria Bertani de la marca Sigma-Aldrich), para 200 ml: 4 gr de LB más 196 ml de agua destilada para medio líquido y 4 gr de LB más 4 gr de agar más 192 ml de agua destilada para medio sólido.

-Medio completo (para 500 ml): 2.5 gr de peptona, 5 gr de extracto de levadura, 5 gr de glucosa, 0.750 gr de nitrato de amonio, 31 ml de solución de sales de *U. maydis* (y 10 gr de agar bacteriológico para medio sólido)

-Doble medio completo (para 500 ml): 5 gr de peptona, 10 gr de extracto de levadura, 10 gr de glucosa, 1.5 gr de nitrato de amonio, 62 ml de solución de sales de *U. maydis* (y 10 gr de agar bacteriológico para medio sólido)

-Medio mínimo: glucosa para 1L: 50g, KNO_3 3g, solución de sales 62.4ml

-Doble medio completo con sorbitol (para 500 ml): 5 gr de casaminoácidos, 1.5 gr de nitrato de amonio, 10 gr de extracto de levadura, 62 ml de solución sales, 91.1gr de sorbitol. Se autoclavea y se agrega glucosa esteril al 1% (está hecha al agregar 20 mM de solución de glucosa al 50%)