

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

Expresión de una lectina de *Phaseolus acutifolius* en *Trichoderma atroviride*.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Salvador Ramírez Baltazar

Dirigido por:

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Co- Director

Dr. Alejandro Blanco Labra

Querétaro, Qro a 23 de junio de 2020

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

Expresión de una lectina de *Phaseolus acutifolius* en *Trichoderma atroviride*.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Salvador Ramírez Baltazar

Dirigido por:

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Sinodales

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo _____

Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra _____

Secretario

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca _____

Vocal

Dr. Antonio Cervantes Chávez _____

Suplente

Dr. Fidel Landeros Jaime _____

Suplente

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente. Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.

Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro. Junio 2020. México

Resumen

En plantas, las lectinas se distribuyen en varios tejidos y son abundantes en la familia *Leguminosae*. Las lectina de *Phaseolus* tienen la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerígenas ya que tienen efectos citotóxicos diferenciales sobre células transformadas y no transformadas por lo que representan un gran potencial en el tratamiento de estas enfermedades. Tal es el caso de lectinas de *Phaseolus acutifolius*, sin embargo, el proceso de extracción es costoso, tardado y de bajo rendimiento. La producción de proteínas heterólogas se han desarrollado en sistemas que permiten su expresión, incluyendo a los hongos filamentosos como *Trichoderma atroviride*, el cual tienen la capacidad para secretar grandes cantidades de proteínas en el medio de crecimiento, así como la capacidad de expresar proteínas heterólogas funcionales y con las respectivas modificaciones postraduccionales. Con la finalidad de expresar una lectina de frijol Tépari en *T. atroviride* se diseñaron y construyeron dos plásmidos de expresión regulables que pueden ser inducidos por celulosa o por luz, también se construyó un plásmido de expresión constitutiva. En estos plásmidos se clonó la lectina fusionada a un péptido señal de la celobiohidrolasa I y en su extremo carboxilo terminal se agregó una etiqueta de 6 histidinas. Las cepas transformantes se seleccionaron a través de 3 pases monospóricos por resistencia a higromicina B y la identificación de cepas sobreexpresantes se hizo mediante las técnicas de PCR y RT-PCR para determinar la integración de los plásmidos en el genoma del hongo y la expresión regulable de la lectina.

Palabras clave: *T. atroviride*, Expresión, Lectina, Regulable, Promotor

Abstrac.

In plants lectins are distributed in various tissues and have been detected in families like Leguminosae. Many plants contain lectins, such as wheat, rice, soy and beans. The lectin of *Phaseolus* has the capacity to inhibit the proliferation of different cancer cells for its cytotoxic effects due to they have a their differential anti-proliferative effect on untransformed cells, showing a great potential in the treatment of this type of diseases. The heterologous espression protein is a important molecular tolos that has been developed and that includes the expression of protein even in the filamentous fungi such as a *Trichoderma atroviride*, which secrets a large amount of proteins into the growth medium. It has been suggested that protein expressed in this system acquire their native structure and, in some case, even their appropriated post-translational modifications. In order to express the Tepari bean lectin in *T. atroviride*, two adjustable expression plasmids which can be induced by glucose source and light were designed and constructed, as well as a constitutive expression plasmid which was also constructed. In these plasmids, the lectin fused to the signal peptide of cellobiohydrolase I and a 6-histidine tag was cloned. These systems were generated to evaluate their potential for the expression of the bioactive lectin. Once the plasmids were generated, the transformation of *T. atroviride* was carried out, the transformant strains were selected through three monosporic passes and then the identification of overexpressing strains was done by PCR and RT-PCR to derermine the plasmid integration in the mushroom genome and the regulable expression of the lectin.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mi padre y a mi madre que siempre están conmigo y quienes me enseñaron y de quienes aprendí el valor del trabajo, la honestidad, la amistad, el amor por los hijos, el esfuerzo diario en la vida y que nunca hay que perder la fe.

A mi amada familia, mi esposa Elizabeth Julieta González Jaime y a mis hijas a quienes amo profundamente, Mayahuel Ramírez González e Itzel Ramírez González.

A mis familiares y amigos de quienes he recibido un apoyo incondicional y que espero algún día pueda ayudarles para que puedan conseguir los objetivos que se han propuesto en sus vidas.

Agradecimientos

Quiero expresar agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo que me acepto como su estudiante y me otorgo su confianza, agradezco sus observaciones, sus consejos, el conocimiento que adquirí, pero sobre todo su sincera amistad.

Dr. Alejandro Blanco Labra quien acepto ser parte de mi comité, muchas gracias por todas sus observaciones, su tiempo y apoyo.

Asimismo, agradezco al Dra. Teresa Gasca García, quien acepto ser parte de mi comité, agradezco sus observaciones, sus recomendaciones, consejos, y su distinguida amistad.

Asimismo, agradezco al Dr. José Antonio Cervantes Chávez, quien acepto ser parte de mi comité, agradezco sus observaciones, sus recomendaciones, consejos, y su noble amistad.

Dr. Fidel Landeros Jaime quien acepto ser parte de mi comité. Muchas gracias por todas sus observaciones, su tiempo, apoyo y genuina amistad.

Mi franco agradecimiento a la Dra. Juana Elizabeth Elton Puente, directora de la Facultad de Ciencias Naturales y al M. en G. Hugo Luna Soria secretario académico de la Facultad de Ciencias Naturales por el apoyo brindado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de esta tesis de maestría.

A mis amigos de LAMIMO, Daniel Sánchez, Andrea Rodríguez, Gabriela Calcáneo, Jairo Sánchez, Guadalupe Hernández muchas gracias por su amistad, apoyo y paciencia.

Índice general.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice general.	iii
Índice de tablas.	iv
Índice de figuras.	v
Índice general.	

	Página
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	12
II.1.-Lectinas.	12
II.2.- Clasificación de las lectinas.	13
II.3.- Lectinas de plantas.	14
II.4.- Efecto antitumoral de lectinas de <i>Phaseolus sp.</i>	15
II.5.- Efecto citotóxico de lectinas de frijol Tépari.	16
II.6.- Sistemas de expresión de proteínas.	17
II.7.- Expresión de proteínas heterólogas en hongos.	19
III.- JUSTIFICACION.	20
IV.- HIPÓTESIS.	21
V.- OBJETIVOS.	21
VI.- MÉTODOS.	21
VI.1.- Cepas y condiciones de cultivo.	21
VI.2.-Preparación de células quimio competentes de <i>E. coli</i> .	22
VI.3.- Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.	22
VI.4.- Plásmidos.	23
VI.5.- Diseño de oligonucleótidos.	25
VI.6.- Extracción del ADN genómico de <i>T. reesei</i> y <i>T. atroviride</i> .	26
VI.7.- Extracción del ADN genómico de <i>P. pastoris</i> .	27
VI.8.- Clonación del promotor del gen <i>cbhl</i> de <i>T. reesei</i> .	29

VI.9.- Clonación de la lectina de frijol Tépari.	29
VI.10.- Fusión de la lectina con el promotor y el péptido señal de la celobiohidrolasa I.	30
VI.11.- Construcción de vector regulable por celulosa para sobre expresar la lectina.	32
VI.12.- Clonación del promotor del gen <i>blu1</i> .	33
VI.13.- Construcción de vector regulable por luz.	33
VI.14.- Construcción de un plásmido para sobre expresar lectina con luz azul.	34
VI.15.- Construcción de vector para la sobreexpresión constitutiva de la lectina.	34
VI.16.- Transformación de protoplastos de <i>T. atroviride</i>	35
VI.17.- Identificación de cepas sobreexpresantes de lectina	36
VI.18.- Extracción de ARN.	36
VI.19.- Síntesis de ADN complementario.	37
VI.20.- Análisis de expresión de lectina.	38
VII.- RESULTADOS	39
VIII.- DISCUSIÓN	61
IX.- CONCLUSIÓN	64
XI.- PERSPECTIVAS	64
XII.-BIBLIOGRAFIA	65

Índice de tablas. **Pagina**

Tabla 1.- Visión general de la clasificación de las lectinas. 13

Tabla 2.- Lista de oligonucleótidos usados para amplificar los promotores PCbh1, PBlu1 y el gen de la lectina. 26

Tabla 3.- Lista de oligonucleótidos usados para generar el casete de expresión. 26

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados en el análisis de expresión. 38

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de figuras.	Página
Figura 1.- Mapa del plásmido pGEM®-T Easy	23
Figura 2.- Mapa del plásmido pCB1004-Tblu17	24
Figura 3.- Mapa del plásmido pUE10	25
Figura 4.- Esquema de PCR unión simple para generar el casete de sobreexpresión.	32
Figura 5.- Construcción del casete para la sobreexpresión regulable con celulosa de la lectina de Frijol Tépari.	40
Figura 6.- Extracción de plásmido de 8 transformantes de <i>E. coli</i> .	41
Figura 7.- Restricción con <i>EcoRI</i> para liberar el casete de sobreexpresión al plásmido pGEM®-T Easy.	41
Figura 8.- Restricción al promotor PCbhl del plásmido pGEM®-T Easy.	42
Figura 9.- Restricción al plásmido pGEM®-T Easy para liberar el casete de sobreexpresión.	43
Figura 10.- Alineamiento de secuencias del ORF de la lectina	44
Figura 11.- Alineamiento de secuencias del promotor PCbhl.	45
Figura 12. Alineamiento de aminoácidos del ORF de la lectina.	46
Figura 13.- Identificación del casete de sobreexpresión en el plásmido pUEcbh-lect con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	47
Figura 14.- Mapa del plásmido pUEcbh-let.	47
Figura 15.- Clonación del promotor PBlu1 del gen <i>blu1</i>	48
Figura 16.- Identificación del promotor PBlu1 en pGEM®-T Easy.	49
Figura 17.- Restricción para escindir al promotor PBlu1 del plásmido pGEM®-T Easy.	49
Figura 18.- Doble restricción al plásmido pUE10 para escindir el promotor PpKi1.	50
Figura 19.- Ligación del promotor PBlu1 al plásmido pGEM®-T Easy.	51
Figura 20.- Restricción al plásmido pUEcbh-lect para liberar el	

péptido señal, la lectina y la etiqueta de seis histidinas.	51
Figura 21.- Identificación del plásmido pUEblu1-lect por restricción con <i>Xho1</i> .	52
Figura 22.- Mapa del plásmido pUEblu1-lect.	53
Figura 23.- Mapa del plásmido pUE10-lect.	54
Figura 24.- Identificación de cepas transformantes con el vector pUEcbh-lect de <i>T. atroviride</i> .	55
Figura 25.- Identificación de cepas transformantes de <i>T. atroviride</i> que portan el vector pUE10-lect.	55
Figura 26.- Identificación de cepas transformantes con el vector pUEblu1-lect de <i>T. atroviride</i> .	56
Figura 27.- Extracción de ARN total de la cepa silvestre y de cepas sobreexpresantes de <i>T. atroviride</i> .	57
Figura 28.- Expresión de la lectina inducida por la luz en las sobreexpresantes Pblu2, Pblu9 y Pblu12.	58
Figura 29.- Expresión de lectina y genes regulados por luz azul en las cepas transformadas con el plásmido pUEblu1-lect.	58
Figura 30.- Cinética de expresión de la lectina inducida por la luz en la cepa transformante Pblu 12 de <i>T. atroviride</i> crecida en PDA.	59
Figura 31.- Cinética de expresión de la lectina inducida por la luz en la cepa transformante Pblu 12 de <i>T. atroviride</i> crecida en PDB.	59
Figura 32.- Expresión constitutiva en la cepa transformante PpKi2.	60
Figura 33.- Cinética de expresión de la lectina en la cepa transformante PCbhl 13 de <i>T. atroviride</i> .	61
Figura 34.- Cinética de expresión de la lectina en la cepa transformante PCbhl 13 de <i>T. atroviride</i> .	62

I. Introducción

Las lectinas son un grupo muy importante de proteínas bioactivas que se encuentran en la mayoría de los organismos entre los cuales se incluyen plantas, animales vertebrados e invertebrados, hongos, bacterias y virus (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Las lectinas fueron definidas como glicoproteínas, con al menos un dominio para el reconocimiento de carbohidratos de forma reversible a carbohidratos libres. La unión de la proteína a los carbohidratos, no implica ninguna modificación enzimática, ni ninguna escisión de estos carbohidratos, además es altamente específica, lo que les confiere la capacidad para aglutinar moléculas y células de forma diferencial.

Algunas lectinas de plantas se han utilizado para tratar enfermedades en humanos, sobre todo con respecto a sus efectos anticancerígenos. Las lectinas de las semillas del género *Phaseolus spp.* han mostrado un potencial prometedor en el tratamiento de este padecimiento, demostrando que éstas son responsables de efectos citotóxicos. Sus efectos antiproliferativos son diferenciales sobre las células no transformadas y sobre diferentes linajes de células cancerosas (Castañeda-Cuevas y col., 2007; García-Gasca y col., 2012).

Las lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) han mostrado efecto inhibitorio de la tumorigénesis temprana (Moreno-Celis y col., 2017) sin embargo, su producción es limitada, costosa y tardada. Es por esto, que resulta importante generar sistemas de expresión de proteínas heterólogas que representen mejoras en la producción de lectinas bioactivas, donde la proteína se pueda recuperar fácilmente del medio de crecimiento como una alternativa al uso más general que los establecidos en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, que se han usado para la producción de proteínas, metabolitos y fármacos. (Tomoaki y col., 2012). Además de estos organismos utilizados para la expresión de proteínas, están los hongos filamentosos, que también se han utilizado con éxito como células huésped en estos procesos, debido a que tienen un elevado nivel de expresión y una cantidad mayor de secreción. Estos hongos micromicetos pueden ser del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus*, así como varias especies del

género *Trichoderma* (Gómez y col., 2016). Por ejemplo, *T. atroviride* tiene la capacidad para producir proteínas heterólogas y como una ventaja adicional, la producción de la proteína de interés puede ser regulada por factores químicos como el pH, la fuente de carbono y metales o por factores físicos como la temperatura o la luz (Maheshwari y col., 2006).

Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó la producción de una lectina de frijol Tépari a través de la transformación genética de *Trichoderma atroviride*.

II. Antecedentes

II.1 Lectinas

Las plantas se han estado usando como medicamento durante al menos 60,000 años, esto refleja su capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, con una amplia gama de propiedades farmacológicas, esto incluye la actividad anticancerígena (Buyelab, 2018). Las plantas contienen flavonoides, que son antioxidantes y pueden quelar metales, brindando protección contra algunas enfermedades y trastornos. De los compuestos de plantas se han obtenidos también agentes anticancerígenos efectivos que se usan actualmente, debido a esto, se vuelve importante el estudio de las lectinas vegetales como agentes terapéuticos contra el cáncer (Suresh y col., 2017). Las lectinas en las plantas, se distribuyen en sus diversos tejidos tales como la corteza, bulbo, fruta, látex, hoja, nódulo, savia de floema, rizoma, raíz, semilla, tallo, tubérculo, flores y ovarios, dependiendo de su localización en la planta tienen diferentes características moleculares, así como diferentes funciones celulares (Dias y col., 2015), sin embargo, la mayor parte de estas moléculas se encuentran en cuerpos proteicos dentro del cotiledón de las semillas.

El término de lectina apareció a finales del siglo XIX y en ese tiempo fueron definidas como moléculas capaces de reconocer antígenos de los grupos sanguíneos. Tiempo después las lectinas fueron definidas como glicoproteínas, que difieren de las inmunoglobulinas, con al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (Castañeda-Cuevas y col., 2007). Los carbohidratos pueden actuar como

intermediarios de la comunicación en procesos fisiológicos de sistemas biológicos tales como la diferenciación celular, la proliferación celular y las interacciones célula-célula. Varias estructuras de oligosacáridos se encuentran comúnmente conjugadas con proteínas o lípidos en las superficies celulares, y éstas pueden ser reconocidas por proteínas estructuralmente diversas como las lectinas (Sanz-Aparicio y col., 1997).

Actualmente las lectinas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas de origen no inmune, que poseen al menos un dominio no catalítico con unión específica y reversible a los carbohidratos, sin alterar sus estructuras covalentes (Cavada y col., 2019).

Las lectinas de plantas han atraído mucha atención por las aplicaciones biomédicas, especialmente debido a sus notables propiedades antitumorales, resultante de su capacidad para inducir la muerte celular programada o por autofagia en células cancerosas. (Oliveira y col., 2014). Las lectinas vegetales, han mostrado provocar tanto la apoptosis como la autofagia modulando las vías de señalización de las líneas celulares de cáncer. Por ejemplo, la lectina de *Sophora flavescens*, una leguminosa, induce la muerte de células tumorales a través de apoptosis, que depende de la activación de la vía de las caspasas. Una lectina con especificidad para el ácido siálico de *Phaseolus coccineus* purificada de semillas, activa la apoptosis dependiente de caspasa en células L929 de fibrosarcoma murino. Sin embargo, hay un número limitado de lectinas vegetales en la que se ha demostrado que inducen vías de señalización autofágica en diferentes tipos de células cancerosas, como ConA que induce la autofagia en una forma mediada por la proteína 3 (BNIP3) que interactúa con la proteína Bcl2 / E1B (Jiang y col., 2014).

II.2 Clasificación de las lectinas

Las lectinas son un grupo de proteínas altamente heterogéneo con la capacidad de unirse de manera selectiva a carbohidratos, que han sido clasificadas con base en diferentes criterios que se resumen a continuación (Tabla1). (Martínez-Alarcón y col., 2018).

En plantas se han encontrado lectinas en muchos grupos, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas. En las plantas las lectinas se pueden encontrar como monómeros, homodímeros y heterodímeros, así como moléculas de homotetrámeros y heterotetrámeros donde el peso molecular promedio es de 25-30 kDa aproximadamente por monómero, y el sitio de unión de carbohidratos se conserva, así como los sitios de unión para cationes divalentes de metales (Silva y col., 2017). Las lectinas se han detectado con mayor frecuencia en plantas de las familias *Leguminosae* y *Euphorbiaceae*. Se sabe también tienen una participación destacada en la defensa de las plantas contra agentes patógenos, como insectos, o animales herbívoros. Se ha reportado el aislamiento y purificación de lectinas de semillas de plantas nativas de México como *Parkinsonia aculeata*, *Olneya tesota*, *Acacia constricta*, *Prosopis juliflora*, *Cercidium praecox*, *Caesalpinia caladenia* y *Phaseolus acutifolius*. (Lagarda-Diaz y col., 2017).

Tabla 1.- Visión general de la clasificación de las lectinas.		
Parámetro	Organismo	Familia
Localización en la célula	Todos	Lectinas extracelulares, lectinas intracelulares del retículo endoplasmático, lectinas del aparato de Golgi, lectinas citoplasmáticas, lectinas unidas a la membrana.
Estructuras con secuencias similares evolutivamente.	Todos	Lectinas beta prismáticas (Tipo-B), lectinas dependientes de calcio (Tipo-C), lectinas con dominio ficolinas-fibrinogeno/colágeno (Tipo F), lectinas de ajo y copo de nieve (Tipo-G), Lectinas de unión a ialuronano o hial-aderinas (Tipo-H), lectinas de la supe familia de inmunoglobulinas (Tipo-I), Jacob y lectinas relacionadas (Tipo-J), lectinas de semillas de leguminosas (Tipo-L), lectinas relacionadas a alfa manosidasa (Tipo M), lectinas nucleótido fosfo hidrolasa (Tipo-N), lectinas de ricino (Tipo-R), <i>Tachypleus tridentatus</i> (Tipo-T), Aglutinina de germen de trigo (Tipo-W), lectinas de huevos de <i>Xenopus</i> (Tipo-X).
Origen taxonómico	Todos	Lectinas de animales, lectinas de microorganismos o lectinas de plantas.
Especificidad a carbohidratos	Animales, Plantas	Lectinas de unión a D-manosa (D-glucosa), lectinas de unión a 2-acetamido-2-deoxi-glucosa, lectinas de unión a 2-acetamido-2-deoxi-galactosa, lectinas de unión a D-galactosa, lectinas de unión a L-fucosa.
	Todos	Lectinas de unión Glucosa/manosa, lectinas de unión a galactosa y N-acetil-D-galactosamina, lectinas de unión a L-fucosa y lectinas de unión a ácido sialico)
Función	Microorganismos	Hemaglutininas, adhesinas y toxinas.

	Animales	Galectinas, selectinas, colectinas y pentraxinas.
Estructura	Animales	Lectinas tipo C, lectinas tipo P, lectinas tipo I, lectinas de unión a heparina, lectinas tipo F, calnexinas, lectinas tipo M, lectinas tipo L, lectinas tipo R, lectinas tipo F, ficolinas, lectinas tipo quitinasa.
	Plantas	Amarantinas, proteínas relacionadas a nictaba, heveinas (lectinas de unión a quitina), jacalinas, lectinas de leguminosas, lectinas monocotiledóneas, lectinas de unión a manosa, lectinas con dominio de ricino B, lectinas relacionadas a GNA y aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i> .

II. 3 Efecto antitumoral de lectinas de *Phaseolus sp.*

Las plantas del género *Phaseolus* están entre las principales leguminosas que se usan como alimentos. Los frijoles se cultivan en todo el mundo, pero principalmente en América del Sur y Central, África, India y China. Además de su importancia alimenticia el género *Phaseolus* ha sido ampliamente estudiado debido a que tiene varios fitoquímicos que tienen la capacidad de inhibir diferentes tipos de cáncer (Zambre y col., 2006). El género *Phaseolus* incluye cinco especies domesticadas: *P. vulgaris* (frijol común), *P. lunatus* (frijol lima), *P. coccineus* (frijol ayocote), *P. polyanthus* (frijol botil), y *P. acutifolius* (frijol tépari) (Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017).

Estudios con *Phaseolus coccineus* L. var. *Albonanus* Bailey para determinar la actividad antitumoral in vitro de una lectina que se une a una glucosamina dimérica, designada (CHL) en células CNE1 de carcinoma nasofaríngeo humano, células HepG2 de carcinoma hepático y células MCF7 de cáncer de mama se encontró inhibición de la proliferación de células CNE1 y HepG2 y, en menor medida de las células MCF-7 (Pan y Ng, 2015). Se demostró por otra parte que la lectina de frijol *Phaseolus vulgaris* inhibe la proliferación de células HONE-1 de carcinoma nasofaríngeo (Pan y col., 2015).

BAX es una proteína proapoptótica regulada positivamente por la proteína p53 y controla negativamente la expresión de *Bcl-2*. La apoptosis es un proceso bien controlado, que implica cambios en la expresión de un grupo de genes proapoptóticos (*Bcl-2*, *Bax*, *Bak*, *Bok*, *Bcl-xL*, *Bid*, *Bim*, *Bab* entre otros). Las proteínas de la familia BCL-2 tienen un papel importante en la regulación de la

apoptosis celular. La sobreexpresión de moléculas pro-apoptóticas, como *Bax*, puede acelerar la apoptosis celular. La inhibición de la expresión de *Bcl-xL* y *Bcl-2* y sus funciones antiapoptóticas pueden ayudar a aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos. Tal es el caso de extractos de frijol negro (BTB), perteneciente a la especie *P. vulgaris*. que mostró incremento en la expresión de los genes *Bcl-2*, *Bcl-XI*, *Bax* después de 24 h en células MCF-7 y MDA-MB231, de una manera dependiente de la dosis, inhibiendo la proliferación de las células de cáncer de mama. Los niveles en la expresión del gen proapoptótico *Bax*, se incrementaron de manera dependiente de la dosis y la expresión del gen antiapoptótico *Bcl-2* disminuyó, a medida que la concentración del extracto de BTB aumentó, esto sugiere que el extracto de BTB indujo un cambio en la expresión de los genes que codifican para las proteínas de la familia BCL-2, aumentando así la probabilidad de apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama. Se demostró también el aumento gradual de la actividad de la caspasa-3/7 en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con 50 y 100 g / ml de extracto de BTB. Los resultados sugieren que el extracto de BTB induce la activación de la ruta de la caspasa intrínseca en ambas líneas celulares de cáncer (Suresh y col., 2017).

II.4 Efecto citotóxico de la lectina de frijol Tépari

La capacidad de inhibir células tumorales se ha encontrado también en semillas de frijol Tépari (*P. acutifolius*). Esta es una especie de frijol que pertenece a la familia de las Leguminosas es una planta anual de ciclo corto que alcanza su madurez entre 60 y 80 días después de su germinación. Su cultivo potencial se realiza preferentemente en áreas desérticas debido a que presenta una alta resistencia a la sequía, al calor y una gran adaptabilidad a altas concentraciones de sal. Este tipo de frijol es rico en proteínas, sin embargo, tiene efectos antinutricios y su cocción es difícil, lo que hace que su contenido de proteína no se utilice adecuadamente. Entre sus efectos anti nutricios se encuentran los inhibidores de proteasas (IP) que inhiben la asimilación de nutrientes, y las lectinas que, a través de la unión a carbohidratos, provocan daños como malestar estomacal o reduciendo la absorción de nutrientes (González de Mejía y Prisecaru, 2005). El interés en el estudio de esta

leguminosa ha aumentado debido a su contenido de fitoquímicos, ya que se sabe que el contenido de lectinas e inhibidores de proteasas es abundante en este tipo de plantas en comparación con otras (Dan y Ng, 2016).

Se han realizado trabajos para obtener fracciones de estas proteínas. Las lectinas de estas plantas tienen monómeros de 30 a 66 kDa que también pueden formar tetrámeros o dímeros (Lagarda-Díaz y col., 2017). Nuestro grupo de trabajo ha obtenido una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. La FCL presenta efectos citotóxicos diferenciales sobre diferentes tipos de líneas celulares de cáncer de mama, cérvix y colon, así como entre células cancerígenas y no cancerígenas (García-Gasca y col., 2012). La FCL es capaz de inducir apoptosis y en estudios in vivo inhibe la tumorigénesis temprana en colon (Moreno-Celis y col., 2017), sin efectos tóxicos sistémicos, pero sí con efectos adversos sobre tracto intestinal (Ferriz-Martínez y col., 2015; Alatorre-Cruz y col., 2018). El efecto apoptótico de la FCL se encuentra relacionado con la actividad de caspasas y p53 (datos no publicados).

Torres-Arteaga y col. (2016) estudiaron las características moleculares de dos lectinas contenidas en la FCL. Dado que la obtención de la FCL es costosa, tardada y de bajo rendimiento, es necesario contar con sistemas de producción biotecnológicos que permitan obtener cantidades suficientes de una lectina bioactiva a menor costo y tiempo y de forma más homogénea. Por ello, Martínez-Alarcón y col (2019) produjeron mediante rizo secreción una lectina cisgénica en plantas transformadas de frijol Tépari, sin embargo, las plantas morían de forma temprana, probablemente debido a la acumulación de lectina en las raíces. Por lo anterior, se ha optado por producir la lectina en sistemas heterólogos, principalmente en *Pichia pastoris* (datos no publicados) y en hongos filamentosos.

II.5 Sistemas de expresión de proteínas

El sistema de expresión más comúnmente utilizado en la producción de proteínas recombinantes es el sistema bacteriano. En *E. coli* es común que la proteína de

interés experimente degradación o se acumule en cuerpos de inclusión (Unzueta y col., 2015). La formación de estos cuerpos es un problema importante en la producción de proteínas recombinantes en bacterias. La purificación de las proteínas de cuerpos de inclusión generalmente requiere dos pasos adicionales de extracción y solubilización de la proteína insoluble recombinante. Este proceso es muy laborioso, requiere mucho tiempo y, en muchos casos, no es efectivo, además de estos inconvenientes, estos microorganismos no llevan a cabo de forma correcta las modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la glicosilación, que es la adición de un grupo fosfato y la adición de la cadena de sacárido a la proteína respectivamente. La adición de cadenas de polisacáridos tiene varias funciones, mantiene la estructura, la estabilidad, la actividad, la función de la proteína y tiene un papel central en la adhesión célula-célula. La glicosilación también afecta la vida media, la farmacocinética y la inmunogenicidad de la proteína. Estos sistemas tampoco forman puentes disulfuro, lo que puede ser crítico para la producción de proteínas plegadas activas (Swiech y col., 2014). Para superar este problema, se pueden usar otros sistemas de expresión, como los sistemas eucariotas.

Las proteínas recombinantes que son producidas en plantas se les conoce como "moléculas farmacéuticas" para enfatizar la relevancia médica de proteínas terapéuticas, en este contexto las plantas tienen algunas ventajas, ya que pueden sintetizar proteínas complejas con modificaciones postraduccionales (como glicosilación o formación de enlaces disulfuro), producción a bajo costo, seguridad en el proceso debido a la incapacidad de los patógenos humanos para replicarse en las plantas y el potencial para la producción a gran escala. Sin embargo, variaciones en el rendimiento del producto, contaminación con agroquímicos y fertilizantes, impacto de plagas y enfermedades y condiciones de cultivo variables, deben también ser considerados para la producción de proteína recombinante cuando se utilizan plantas (Gomes y col., 2016). Por otra parte, la fase de prueba necesaria para garantizar la estabilidad de transgenes, la expresión y la actividad bioquímica del producto, así como la ausencia de cambios fenotípicos adversos en la planta huésped puede tomar varios años dependiendo esto, de la especie de la planta (Fischer y Emans, 2000).

Para lograr la obtención de lectinas recombinantes se pueden utilizar los hongos filamentosos como sistemas de expresión, estos organismos tienen capacidades naturales para secretar una variedad de proteínas en grandes cantidades y pueden crecer en sustratos relativamente económicos. Comparados con los sistemas de expresión basados en *E. coli* o la levadura, como *S. cerevisiae* y *P. pastoris*, los hongos filamentosos como sistemas de expresión tienen la ventaja de que se cultivan a bajo costo, se puede inducir la proteína fácilmente, secretan la proteína de manera eficiente, y tienen el mecanismo de transcripción y traducción más próxima en funcionamiento a los animales superiores, lo que tiene un beneficio en la producción de diferentes proteínas de importancia industrial y médica. (Aravind y col., 2017).

II.6 Expresión de proteínas heterólogas en hongos.

Los hongos filamentosos que son mayormente utilizados para la expresión de proteínas heterólogas, pueden ser del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus*, así como varias especies pertenecientes al género *Trichoderma* (Gómez y col., 2016). Sobre la base del análisis combinado de fenotipo y filogenético, se han reconocido y aceptado alrededor de 260 especies (Sun y col., 2018). Los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son ascomicetos como, por ejemplo, *Trichoderma harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. reesei* y *T. atroviride* entre otros. Algunos de estos hongos han sido secuenciados y la información genómica está disponible en bases de datos con acceso público. Las especies de *Trichoderma* se distribuyen en suelos de todo el mundo que es donde tienden a encontrarse con mayor frecuencia. Algunas especies de este género de ascomicetos tienen actividades antagónicas contra una amplia variedad de hongos, entre ellos, patógenos de plantas de importancia económica en la agricultura y han servido como modelo para estudiar relaciones parasíticas además tiene capacidad de secretar grandes cantidades de proteínas, metabolitos y ácidos orgánicos en el medio de crecimiento. Esta capacidad ha sido ampliamente aprovechada por la industria de alimentos y bebidas, en las que los compuestos secretados por hongos, se han utilizado desde hace mucho tiempo para producir enzimas (amilasas,

proteasas y celulasas), ácidos orgánicos (ácido γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenóico) entre otros (Satoshi y col., 2017).

Los productos obtenidos de varias de estas especies se les ha “considerado como generalmente seguros” (GRAS por sus siglas en ingles). Esto hace que los hongos filamentosos sean organismos atractivos en la síntesis de productos para uso en humanos. Desde la transferencia de genes disponibles para estos organismos, ha surgido la posibilidad de utilizarlos como fábricas biológicas en la producción de proteínas de origen no fúngico (Conesa y col., 2001). Las especies del género *Trichoderma* han sido consideradas como buenos sistemas para la expresión de proteínas, ya que, además de mejorar los rendimientos de proteína recombinante en el sobrenadante del cultivo, expresan proteínas bioactivas, esto es importante, en particular para aquellas proteínas en las que la actividad o aplicación deseada, depende de su estructura molecular nativa que es de vital relevancia para la mayoría de las proteínas que tiene potencial farmacéutico, por lo que resulta importante la correcta modificación postraduccional. Esta clase de hongos muestra gran capacidad de secreción, además son eficientes productores de enzimas extracelulares que degradan una gran variedad de sustratos e incluso compuestos xenobióticos (Balcázar y col., 2016; Punt y col., 2002).

En particular *T. atroviride* (teleomorfo: *Hypocrea atroviridis*) se usa para la producción de proteínas heterólogas (Balcázar y col., 2016; Cuamatzi-Flores y col., 2019). Una ventaja adicional, es que la producción de la proteína de interés puede ser regulada por factores como el pH, las fuentes de carbono, metales, la temperatura o la luz (Maheshwari y col., 2006).

III. Justificación

Con el objetivo de generar sistemas de expresión de proteínas heterólogas para fortalecer los estudios de proteínas bioactivas en las diferentes áreas de la Biotecnología que se desarrollan en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, en este trabajo se diseñaron y construyeron plásmidos de expresión regulables, uno por la fuente carbono y otro regulable por luz, para la producción y secreción de proteínas heterólogas, usando un péptido

señal de la celobiohidrolasa I de *T. reesei*. El potencial de estos sistemas de expresión regulable se evalúa en la producción de una lectina de frijol Tépari. Los plásmidos regulables permiten un mayor control sobre el sistema y evitan posibles efectos adversos ocasionados por la carga metabólica, provocada comúnmente en las sobre expresiones constitutivas o, de la interacción de la proteína recombinante en la célula hospedera. Algunos de estos efectos pueden ser errores en la glicosilación o el plegamiento de las proteínas que, debido a la carga metabólica, alcanza niveles tóxicos en el momento en que la densidad celular es alta en un fermentador. Estos sistemas regulables proporcionan una opción para generar altos rendimientos de proteína recombinante a bajos costos.

IV. Hipótesis

Los sistemas de sobreexpresión inducibles por luz y utilizando celulosa como fuente de carbono en *T. atroviride* son una herramienta eficiente para expresar lectinas recombinantes bioactivas de *P. acutifolius* fusionada a un péptido señal de la celobiohidrolasa I de *T. reesei*.

V. Objetivos

Objetivo general

Establecer sistemas de expresión regulables por luz y celulosa para sobre expresar el gen que codifica para una lectina de *P. acutifolius* en *T. atroviride*.

Objetivos específicos

- a) Diseñar y construir vectores de expresión regulables por luz y celulosa para la sobreexpresión del gen que codifica la lectina de *P. acutifolius*
- b) Sobre expresar del gene que codifica la lectina de *P. acutifolius* en el hongo filamentoso *T. atroviride*.
- c) Determinar los niveles de expresión del gen que codifica la lectina en los sistemas de expresión regulables comparando con un sistema de expresión constitutiva.

VI. Materiales y métodos

VI.1 Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa silvestre de *T. atroviride* IMI206040 para realizar la sobre expresión de la lectina en los vectores regulables y el constitutivo. La cepa de *T. atroviride* se propagó en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) a 28 °C.

Se utilizó una cepa transformante de *P. pastoris* que porta el gen de la lectina de la cual se clonó dicho gen, esta cepa se creció en medio YPG (agar 2.0%, extracto de levadura 2.0%; peptona 2%; glucosa 1%) a 28 °C durante 48 h.

Para la clonación, propagación y purificación de plásmidos se usó como célula hospedera *E. coli* DH5 α . Esta cepa se propagó en medio de cultivo agar Luria Bertani (LB) se incubó a 37 °C durante 12 h en medio LB adicionado con los antibióticos (Ampicilina 50 μ g/ml o Cloranfenicol 34 μ g/ml) cuando fue necesarios para la selección de transformantes y propagación de los plásmidos.

VI.2 Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*.

Se tomó con un palillo estéril una colonia de *E. coli*, se sembró en 3 mL de medio LB y se incubó durante toda la noche. El cultivo anterior se colocó en 100 ml de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación constante hasta que llega a una densidad óptica (D.O.) de 0.3-0.6, el cultivo se colocó en hielo en cuanto se retiró de la agitación y se alicuotó en tubos Falcón de 50 mL. manteniéndolos en hielo durante 30 min. Después se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 1904 g. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en 750 μ l de ZX YT-CC frío. Se incubó en hielo durante 10 min, se hicieron alícuotas de 50 μ l en tubos Eppendorf para una transformación. Por último, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

VI.3 Transformación de *E. coli* por choque térmico.

Se mezclaron 5 μ l de la reacción de ligación y 45 μ l de buffer KCM frío (5.1 ml 1M KCl, 1.5 ml 1M CaCl₂, 2.5 ml 1M MgCl₂ 0.9 ml, ddH₂O) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml., con cuidado se agregó la mezcla anterior a un vial con 50 μ l de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α y se incubó durante 30 min. Posteriormente se aplicó un choque térmico incubando 2 min a 42 °C, inmediatamente se transfirieron

a hielo por 2 min, se adicionaron 450 µl de medio LB y se incubaron a 37 °C en agitación durante 1 h. para sembrar en placa de LB agar selectivo.

VI.4 Plásmidos.

a) pGEM®-T Easy

El plásmido pGEM®-T Easy de la casa comercial Promega es un vector de un elevado número de copias que contienen promotores de ARN polimerasa T7 y SP6 que flanquean una región de clonación múltiple dentro de la codificación del péptido α para la complementación de la región de la enzima β -galactosidasa. La inactivación, por inserción de un fragmento de ADN en el péptido α , permite la identificación de recombinantes por coloración azul / blanco en placas indicadoras. Estos son vectores linearizados que tienen una timidina 3' terminal en ambos extremos. Las timidinas terminales mejoran en gran medida la clonación de productos de PCR en el sitio de inserción, así como la eficiencia de la ligación de productos de PCR evitando la recircularización del vector y proporcionando un saliente compatible para productos de PCR generadas con una ADN polimerasa termoestable (Figura 1)

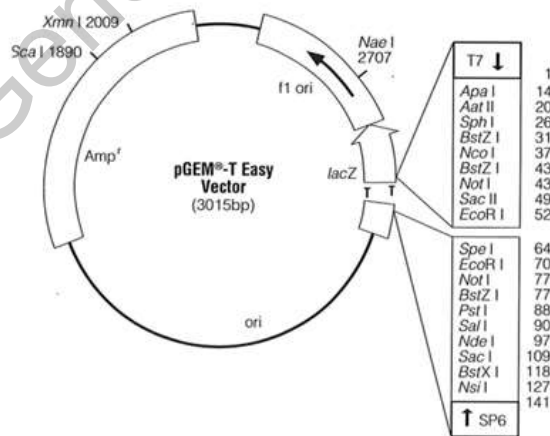


Figura 1.- Mapa del plásmido pGEM®-T Easy. En el mapa se muestra el sitio múltiple de clonación, el gen *lacZ* para α -complementación y selección de plásmidos recombinantes por coloración de colonias, el gen de resistencia a ampicilina, y el ori para la replicación autónoma en bacteria.

b) pCB1004-Tblu17.

El Plásmido pCB1004-Tblu17 es un vector integrativo, tiene una región terminadora Tblu17, (Figura 2) en el sitio múltiple de clonación se insertó la construcción del promotor de PCbhI y el gen de la lectina de Frijol Tépari con un péptido señal y una etiqueta de seis histidinas, después de esto se hicieron las restricciones en este plásmido con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI para insertar la construcción regulada por celulosa.

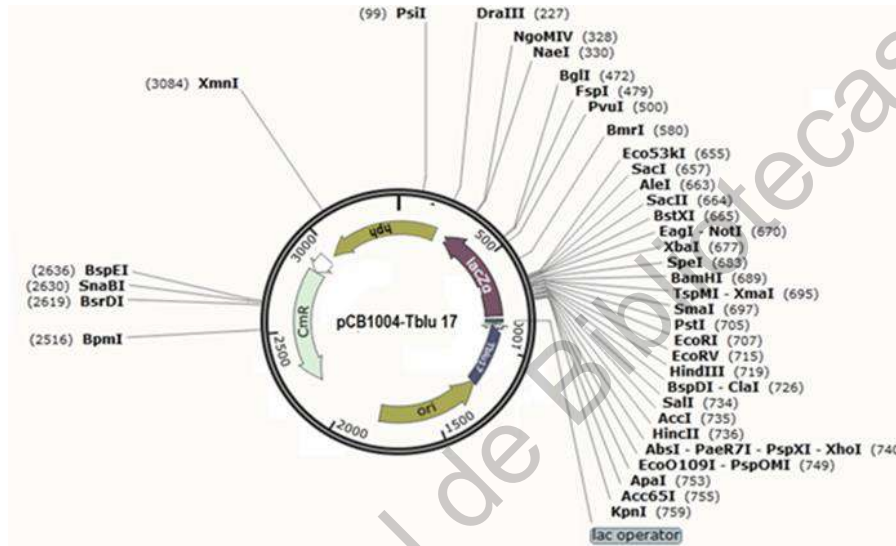


Figura 2.- Mapa del plásmido pCB1004-Tblu17. Se observa el sitio múltiple de clonación, gen de resistencia a higromicina *hph*, el gen de resistencia a cloranfenicol *CmR* y un origen de replicación para bacterias *ori*.

c) pUE10.

El vector de expresión integrativo pUE10 tiene genes de resistencia a antibióticos que se usaron para la selección con higromicina B y cloranfenicol en *T. atroviride* y *E. coli*, respectivamente (Figura 3). El terminador *blu17* permite que el casete se integre en una región intergénica cerca del terminador *blu17* de *T. atroviride*. El casete con el péptido señal, el ORF de la lectina y la etiqueta de histidinas se clonó abajo del promotor de la piruvato quinasa (*Ppki1*) utilizando los sitios de restricción *Sac*II y *Eco*RI. Los clones fueron analizados mediante digestión enzimática.

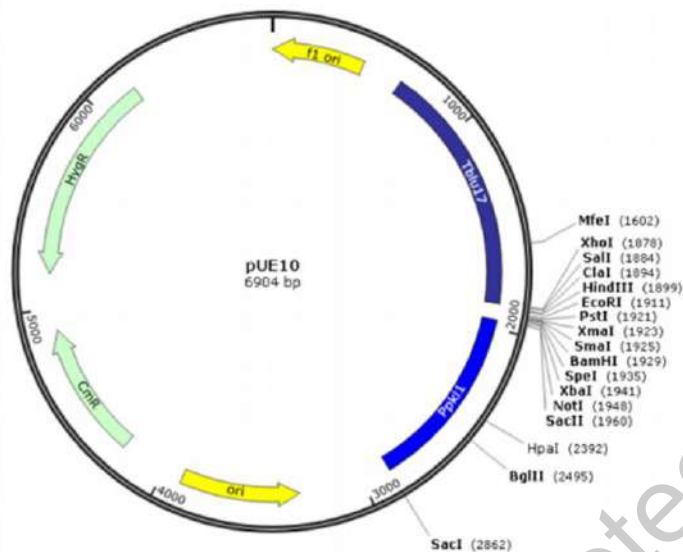


Figura 3.- Mapa del plásmido pUE10. Se puede observar el sitio múltiple de clonación, gen de resistencia a higromicina *Hph*, el gen de resistencia a cloranfenicol *CmR* y un origen de replicación para bacterias *ori*, se muestra las secuencias regulatorias para expresión en hongos, el promotor *Ppki1* y el terminador *Tbu17*.

VI. 5 Diseño de oligonucleótidos

De la base de datos del genoma de *T. reesei* (<https://genome.igi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>) se obtuvieron las secuencias de nucleótidos del promotor del gen *cbh 1* que codifica la celobiohidrolasa I (Inducible con celulosa)) y del promotor de gen *blu 1* (Inducible con luz). El programa cutter (www.firstmarket.com/cutter/cut2.html) se utilizó para determinar el mapa de restricción de las secuencias que se trabajaron y de esta manera seleccionar los sitios de restricción utilizables en los oligonucleótidos. Se utilizó el programa OligoCalc <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> para el diseño de los oligonucleótidos y análisis de las propiedades termodinámicas *in silico*, esto se hizo para cada secuencia de nucleótidos obtenidos de los promotores de cada gen. Para el promotor de la celobiohidrolasa se diseñaron 4 oligonucleótido (*Pcbh1-F*, *1N5cbh1-F*, *2N5cbh1* y *Pcbh1-R*), para el promotor del gen *blu 1* se diseñaron 2 oligonucleótidos (*PTrBlu1-F* y *PTrBlu1-R*). La secuencia de nucleótidos de la lectina de *Phaseolus acutifolius* de aproximadamente 730 pares de bases fue previamente obtenida (Martínez-Alarcón y col., 2019), con esta

secuencia se diseñaron 3 oligonucleótidos, 2 para amplificar la proteína del ADN de *P. pastoris* (Qlet-F y pGAPlect-R) (Tabla 2) y 1 (H6let-R) para generar el casete de sobreexpresión (Tabla 3).

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para amplificar los promotores Pcbh1, PBlu1 y el gen de la lectina		
Oligonucleótido	Secuencia 5'----> 3'	Sitio de restricción
Pcbh1-F	CAG CGT ACC CGT ACA AGT CG	
Pcbh1-R	AGC ACG AGC TGT GGC CAA G	
PTrblu1-F	CAC <u>GAG CTC</u> CAG AAA CAG CAC CAA C	<i>SacI</i>
PTrblu1-R	CGT <u>CCG CGG</u> TTG TTT GGT GGT TGC TTG AGA G	<i>SacII</i>
Qlet -F	CCT TCT TGG CCA CAG CTC GTG CTA ACG ACA TCT CCT TCA ACT TCC AAA G	
pGAPlect-R	GAT GAT GAT GAT GAT GGT CGA CG	

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para generar el casete de expresión.		
Oligonucleótido	Secuencia 5'----> 3'	Sitio de restricción
1N5cbh1-F	GAC <u>GAG CTC</u> GAA GGT TCA CGG CAA GG	<i>SacI</i>
2N5cbh1-F	ACT <u>GGA TCC</u> GAA CTC TGC TCG TAG AG	<i>BamHI</i>
H6let-R	TGG <u>GGA TCC</u> AGT GGT GGT GGT GGT GGT GAT TCA AAC CTT CAG ATG TGG TGC C	<i>EcoRI</i>
Qlet -F	CCT TCT TGG CCA CAG CTC GTG CTA ACG ACA TCT CCT TCA ACT TCC AAA G	

VI.6 Extracción del ADN genómico de *T. reesei* y *T. atroviride*.

La extracción de ADN genómico se hizo de micelio de *T. reesei* y de *T. atroviride* con el protocolo fenol-cloroformo, primeramente se inocularon 1×10^6 esporas de *T. reesei* en PDB (Caldo de Papa Dextrosa) y se incubaron en agitación a 28°C durante 48 horas, el micelio que se generó de este cultivo se colectó y congeló con Nitrógeno líquido, después se molió en mortero con pistilo hasta obtener un polvo fino color

blanco, con el cual se llenó un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 500 µl del micelio pulverizado y se le adicionaron 600 µl de solución amortiguador de urea (7 M Urea, 0.35 M NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA y 1 % de N-Lauril Sarcosina). Los tubos fueron mezclados en vórtex durante 2 min. y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 30 min. Después se adicionó al tubo Eppendorf 600 µl de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (50:48:2) y se mezcló en vórtex por 10 min. Posteriormente, se centrifugó 15 min a 4,230 xg. La fase acuosa (sobrenadante) se recuperó y se colocó en otro tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml. Se agregó nuevamente la misma cantidad de mezcla de fenol-cloroformo-álcool isoamílico, y se repitieron los pasos posteriores hasta recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo de 1.5 ml. Se procedió a precipitar el ADN adicionando un volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión suave hasta la formación de hebras blancas formadas principalmente por el ADN genómico. Se centrifugó la muestra a 5,077 xg por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se agregaron al tubo 500 µl de etanol al 70 %. Se mezcló el tubo en el vórtex, y de nuevo se centrifugó a 5,077 xg por 10 min. El sobrenadante se desechó y se puso a secar el tubo abierto boca abajo sobre una hoja de papel absorbente para posteriormente resuspender la pastilla de ADN en 80 µl de agua grado HPLC estéril. Se agregó 1 µl de RNAsa (10 mg/ml) (Invitrogen) al tubo y se incubó durante 20 min a 37 °C. Se analizó la integridad del ADN mediante separación por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. La muestra de ADN se reveló con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizó en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD). La concentración de ADN fue medida en Nanodrop a 260 nm y la pureza de ADN fue determinada con la relación 260/280 nm.

VI.7 Extracción del ADN genómico de *P. pastoris*.

Para obtener el gen de la lectina de *P. acutifolius*, que estaba insertado en el genoma de la levadura transformante de *P. pastoris*, se crecieron células de *P. pastoris*, transformadas con el gen de la lectina, en medio sólido YPG (extracto de levadura 2%, peptona de caseína 2%, glucosa 1%, agar 2%), las células que crecieron en este medio sólido se utilizaron para inocular 10 ml de medio líquido

YPG (extracto de levadura 2%, peptona de caseína 2%, glucosa 1%). Después se incubaron a 28 °C en agitación a 64 rpm hasta que alcanzaron la fase logarítmica (18 a 24 h), se centrifugaron a 1,481 xg durante 5 min para obtener una pastilla celular que se resuspendió en 200 µl de amortiguador Tris EDTA pH8 (tris-Cl 1 M, EDTA 5 M) y se transfirió a tubos Eppendorf estériles y adicionados con 400 µl del amortiguador de lisis TSNTE (Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 10 mM, Tris pH8 10 mM, EDTA 4mM). Se agregaron 400 µl de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1) y 0.3 g de perlas de vidrio (0.1 mm de diámetro) lavadas con ácido nítrico y esterilizadas. Para romper las paredes de las células se colocó el tubo en vórtex de 3 a 5 min y se centrifugó a 5,077xg durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf estériles, se le adicionaron 2 µl de RNAsa (10 mg·ml⁻¹) y se incubó por 5 min. a 37 °C. Se agregaron luego 400 µl de cloroformo y se agitó en vórtex por 1 min después se centrifugó durante 7 min a 5,923.5 xg y se recupera el sobrenadante en un tubo Eppendorf. Se agregaron 400 µl de cloroformo y se agitó en vórtex por 5 min. Se centrifugó 10 min a 5,924 xg y se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf, se precipitó el ADN con acetato de sodio 3 M (1/10 del volumen de la muestra) con dos volúmenes de etanol 95% frío. Se incubó a -20 °C durante 20 min para después centrifugar durante 10 min a 5,077 xg. Se lavó la pastilla con 300 µl de etanol al 70% frío y se centrifugó durante 3 min a 5,077 xg, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Después se resuspendió la pastilla de ADN con 50 µl agua grado HPLC y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. Al gel se le agregan 6 µl de bromuro de etidio (10 mg·ml⁻¹), y visualizualizando en el fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD). Una vez que se obtuvo el DNA de *P. pastoris* se hizo una reacción de PCR para clonar el gen de la lectina, se usó la polimerasa de alta fidelidad, (Taq DNA Polymerase High Fidelity), de acuerdo a las condiciones del fabricante.

La integridad del ADN se analizó mediante su separación por electroforesis en gel de agarosa como se mencionó anteriormente y se visualizó en fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

VI.8 Clonación del promotor del gen *cbh I* de *T. reesei*.

Se hizo una reacción de PCR con la polimerasa de alta fidelidad de la casa comercial Invitrogen (Taq ADN Polimerasa High Fidelity) siguiendo las condiciones del fabricante, se utilizó como templado el ADN genómico de *T. reesei* y se usaron los oligonucleótidos Pcbhl-F y Pcbhl-R. Las condiciones de reacción fueron 3 min a 95 °C seguidos de 30 s a 95 °C, 15 s a 60 °C, 75 s a 68 °C; las reacciones finalizaron con 5 min a 68 °C. Los amplicones fueron analizados con una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La muestra de ADN se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizó en un fotodocumentador con luz UV (GelDoc XR+, BIORAD). Después de verificar que los amplicones fueran del tamaño esperado, se purificaron utilizando columnas de purificación de QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente se explica enseguida, primero se agregaron tres volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel de agarosa y se agitó en vórtex. Se incubó 10 min a 50 °C y se mezcló en vórtex cada 2 o 3 min para favorecer que se disuelva la agarosa. A continuación, se agregó un volumen de isopropanol por cada volumen de gel de agarosa, la mezcla se colocó en una columna QIAquick y se centrifugó durante 60 s a 5,500 g. El flujo se desechó y la columna se lavó con 750 µl del Buffer PE y se centrifugó durante 60 s a 5,500 g. El flujo se desecha y de nuevo se centrifuga 1 min a 5,500 g para eliminar completamente el etanol residual del Buffer PE. Luego, la columna se transfirió a un tubo nuevo Eppendorf estéril y se eluyó el ADN con 50 µl de buffer EB. El Buffer de elución EB se aplicó al centro de la columna y se centrifugó 1 min a 5,500 g.

VI.9 Clonación de la lectina de frijol Tépari.

Una vez que se obtuvo el DNA de *P. pastoris* se hizo una reacción de PCR para clonar el gen de la lectina, se usó la ADNpolimerasa de alta fidelidad de la casa comercial Invitrogen (Taq ADN Polimerasa High Fidelity) con las siguientes condiciones de reacción 95 °C por 3 min seguidas por 35 ciclos a 95°C por 30 s, 60 °C por 30 s, 68 °C por 80 s; la reacción finalizó a 68 °C por 5 min.

La amplificación de la lectina se hizo con el oligonucleótido quimérico Qlet-F y el oligonucleótido Gapz-R. Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis

en un gel de agarosa al 1 %. y se visualizó en un fotodocumentador. Después de verificar que el amplicón fuera del tamaño esperado, se purificó utilizando columnas de purificación de QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN de la siguiente manera: se agregaron cinco volúmenes de buffer PB por cada volumen de muestra y se centrifugó 1 min, esta mezcla se colocó en una columna QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN y se dejó reposar 3 min, luego se centrifugo a 5,500 g. Posteriormente se agregaron 750 µl de buffer PE y se centrifugó 1min a 5,500 g, se desechó el filtrado del tubo colector y se centrifugó nuevamente 1 min a 5,500 g, para eliminar trazas de buffer PE, se colocó la columna en un tubo Eppendorf nuevo y se agregaron 35 µl de agua HPLC. Se centrifugó 1 min a 5,500 g para recuperar el ADN.

VI.10 Fusión del gen de la lectina con el promotor y el péptido señal de la celobiohidrolasa.

La construcción genética con el promotor de PCbhl, el péptido señal, la lectina y la etiqueta de hexahistidina se realizó con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Unión Simple (Single-joint PCR por sus siglas en inglés) que consta de tres rondas de reacciones de PCR (Jae-Hyuk, 2004) (Figura 4).

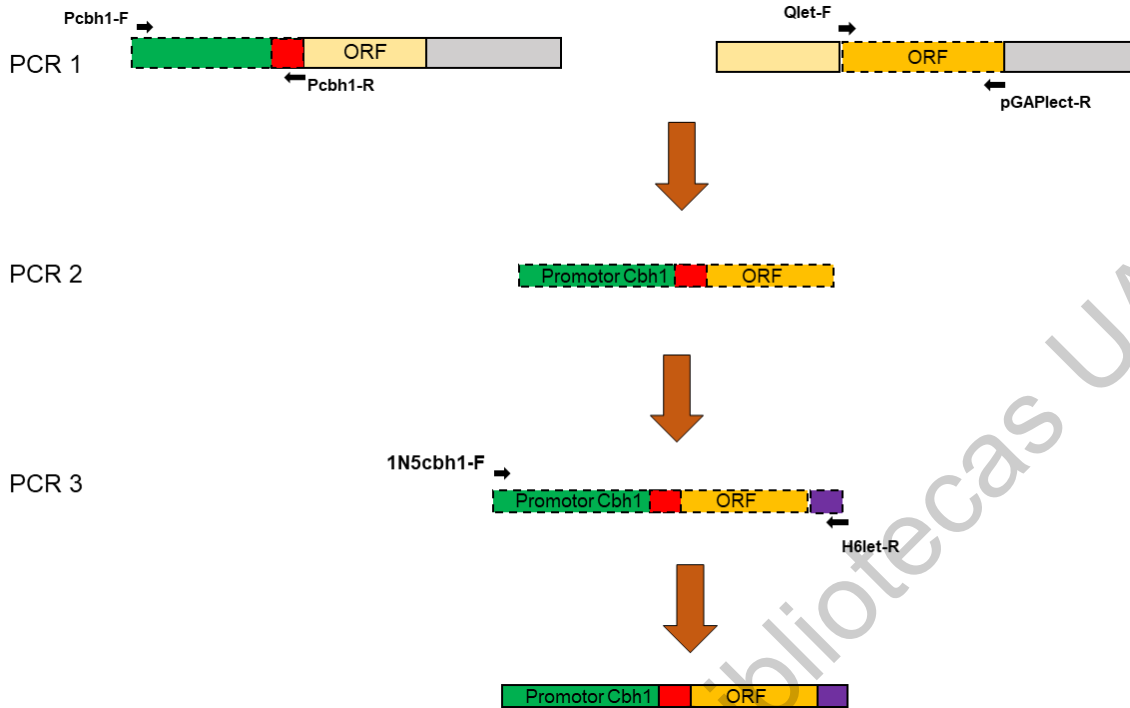


Figura 4.- Esquema de la técnica de PCR unión simple para generar el casete de sobreexpresión. Promotor *cbh1* (verde) con el péptido señal (rojo), el gen lectina (amarillo) y la etiqueta de 6 histidinas (morado). PCR 1, se amplificaron el gen de la lectina y el promotor del gen *cbh1*, PCR 2, se fusionan los fragmentos 5' y 3' usando la secuencia de empalme incluida en el oligonucleótido quimérico (Qlet -F). PCR 3, amplificación de los fragmentos fusionados, usando el oligonucleótido anidado 2N5cbh1-F y el oligonucleótido H6let-R.

En la primera ronda de PCRs se amplificó por separado el promotor de la celobiohidrolasa I con los oligonucleótidos Pcbh1-F y Pcbh1-R, utilizando como templado el ADN genómico de *T. reesei*, y la lectina se amplificó utilizando los oligonucleótidos Qlet -F, el cual es un oligonucleótido quimérico, y pGAPlect-R, utilizando como templado el DNA genómico de *P. pastoris*. Para generar este casete se usó la DNA polimerasa de alta fidelidad (Taq DNA Polymerase High Fidelity), siguiendo las recomendaciones del fabricante y mediante las siguientes condiciones de reacción 3 min a 95°C, seguida por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 62 °C, 1 min a 68 °C; la reacción se finalizó con 5 min. a 68°C.

En la segunda ronda de PCR los amplicones resultantes se purificaron y se mezclaron en una relación molar 1:1. Estos fragmentos se unieron mediante PCR sin oligonucleótidos, donde el producto de PCR del amplicón del promotor del gen

cbh-1 se usó como oligonucleótido 5' a 3' y el amplicón resultado del PCR de la lectina se usó como oligonucleótido reverso. La fusión se realizó con las siguientes condiciones de reacción: 3 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos a 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C, 1.15 min a 68 °C; la reacción finalizó con 5 min a 72°C. Los amplicones fueron analizados en una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador. Los amplicones fueron posteriormente purificados en columnas QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN.

En la tercera ronda de PCR, el producto unido se amplificó con el oligonucleótido anidado 2N5cbh1-F que tiene un sitio restricción *BamHI* en la secuencia, de igual forma se usó el oligonucleótido H6let-R, el cual tiene el sitio de restricción *EcoRI*. Estos sitios restricción se usaron para la clonación en el plásmido pCB1004-Tblu17, para generar el plásmido regulado por celulosa. Las condiciones de reacción para este PCR fueron 3 min a 95 °C seguidas por 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C, 1.45 min a 68 °C; la reacción finalizó con 5 min a 68 °C. Los amplicones fueron analizados con una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. y se visualizó en un fotodocumentador y posteriormente se purificó en columnas QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN.

VI.11 Construcción de vector regulable por celulosa para sobre expresar la lectina.

Para generar el vector regulable por celulosa se utilizó el plásmido pCB1004-Tblu17 al cual se le hicieron dos reacciones de restricción con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*. El resultado de esta reacción se corrió en un gel de agarosa 1% y se purificó el plásmido en columnas QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN. Por otra parte, una vez que se generó el casete de sobreexpresión se hizo una reacción de ligación con plásmido pGEM®-T Easy y con esta ligación se hizo un reacción de transformación en *E.coli* con el protocolo de choque térmico descrito anteriormente. A las células transformantes se les extrajo el ADN plasmídico y la identificación de

ADN plasmídico recombinantes se realizó por restricción con *EcoRI*. El casete de sobreexpresión se liberó con *BamHI* y *EcoRI*, para posteriormente insertarlo en los mismos sitios en pCB1004-Tblu17 mediante reacciones de ligación con la ligasa ADN T4 (Thermo Scientific) con las condiciones del fabricante. Después de realizar las reacciones anteriores se obtuvo el plásmido pUEcbh-lect. Con este plásmido se hicieron transformaciones en protoplastos de *T. atroviride*. Este plásmido tiene un gen que codifica para higromicina B fosfotransferasa lo que confiere resistencia a hongos, esto sirvió para seleccionar fenotipos resistentes a higromicina B, las cepas resistentes a dicho antibiótico se cultivaron durante tres pases monospóricos bajo condiciones selectivas.

VI.12 Clonación del promotor del gen *blu1*

El gen *blu1* codifica para una proteína reprimible por glucosa, este es uno de los genes con mayores niveles de expresión inducibles por luz azul. Para amplificarlo se usaron los oligonucleótidos PTrblu1-F, este oligonucleótido tiene un sitio de restricción *SacI* y PTrblu1-R el cual tiene un sitio de restricción *SacII*. La amplificación de este promotor se hizo con DreamTaq DNA Polimerasa (Thermo Scientific) mediante PCR y se utilizó ADN genómico de *T. reesei* como templado; con las siguientes condiciones de reacción: 3 min a 95 °C, 30 s a 95 °C seguido por 35 ciclos de 30 s a 61 °C, 1.2 min a 72 °C; la reacción finalizó con 5 min a 72 °C por 34 ciclos.

Después de tener los amplicones del promotor Pblu1 se hizo una ligación con el plásmido pGEM®-T Easy, con esta ligación se hizo una reacción de transformación en *E. coli* por choque térmico. Se hizo una extracción de plásmido a las cepas transformantes de *E. coli*, los plásmidos recombinantes se identificaron por restricción con *EcoRI*.

VI.13 Construcción de un vector regulable por luz.

El plásmido pUE10 es un vector integrativo de expresión constitutiva, tiene el promotor PpKi1 de *T. reesei* y el terminador del gen *blu17*, (Codifica una pirofosfato

sintetasa), tiene un marcador de selección que confiere resistencia a higromicina B y tiene, además, un sitio múltiple de clonación lo que permitió mediante restricción integrar al promotor PBlu1 y el casete de sobreexpresión. Para integrar al promotor PBlu1 primero se hicieron restricciones al plásmido pGEM®-T Easy que contenía el promotor Pblu1 con las enzimas *SacI/SacII* para liberarlo y posteriormente ser clonado en los sitios *SacI/SacII* que están en el sitio múltiple de clonación en el plásmido pUE10, reemplazando al promotor Ppki1, el cual había sido removido previamente mediante restricción con las mismas enzimas.

VI.14 Construcción de un plásmido para sobre expresar lectina con luz azul.

Con el plásmido pUE10 al que se le insertó el promotor PBlu1 se hizo una reacción de transformación en *E. coli*, a las cepas transformantes se les extrajo el plásmido. Para asegurar que el promotor se encontraba en el plásmido se le hizo una doble restricción con *SacI* y *SacII*, este resultado se analizó por electroforesis. Después a este plásmido se le hicieron dos reacciones de restricción con las enzimas *SacII* y otra con *EcoRI* para insertar el casete de sobreexpresión y de esta forma generar el plásmido pUEblu1-lect.

Los plásmidos pUEblu1-lect que contienen el promotor PBlu1, el péptido señal, el gen que codifica la lectina y la etiqueta de 6 histidinas se usaron para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

VI.15 Construcción de vector para la sobre expresión constitutiva de la lectina.

Para construir, se realizó una restricción, al pPCB1004- Tblu17 que ya tenía integrada el casete de expresión, con las enzimas *SacII* y *EcoRI*. Con estas enzimas lo que se hizo fue liberar una parte del casete de expresión, que comprende al péptido señal, la lectina y la etiqueta de histidinas, esta parte del casete fue posteriormente, mediante ligación, integrada en el plásmido pUE10 al cual previamente se la habían realizados dos restricciones con las mismas endonucleasas, para de esta manera insertar el casete de sobreexpresión y con esto, generar el plásmido pUE10-lect. Con este plásmido se hizo una transformación en *E. coli*, las transformantes se seleccionaron en LB con cloranfenicol, se hizo una extracción de plásmido, los cuales fueron analizados por restricción, para

determinar la identidad e integridad de la región codificante de la lectina. Una vez que el plásmido fue analizado se utilizó para transformar protoplastos de *T. atroviride*. Las cepas resistentes a higromicina B se cultivaron durante tres pases monospóricos bajo condiciones selectivas.

VI.16 Transformación de protoplastos *T. atroviride*.

Para generar transformantes se utilizó el protocolo de polietilenglicol-CaCl₂ (PEG), a partir de protoplastos de germínulas de *T. atroviride*. Para obtener las germínulas de la cepa silvestre de *T. atroviride* se inocularon 1x10⁸ esporas en 100 ml. de medio GEYEC (1.5% glucosa, 0.3% extracto de levadura y 0.5% hidrolizado de caseína), de 16 horas a 28 °C en agitación constante a 63.5 x g. Este cultivo se filtró con tela absorbente estéril en un embudo para recuperar el micelio, se le hace un lavado con 50 ml. de agua destilada estéril. Después, en un tubo Falcón de 50 ml., se colocaron 7 ml. de solución osmótica con 0.17 x g. de micelio y 0.1 g. de una mezcla de enzimas hidrolíticas comercial de *Trichoderma harzianum*, durante 3 h en un agitador orbital a 36 rpm. para digerir pared celular, estas enzimas tienen actividad de quitinasa y β-glucanasa. La digestión de la pared celular debe realizarse cuidadosamente para mantener la integridad celular para lo cual se usó una solución osmótica (50 mM de CaCl₂, 0.5 M Manitol, 50 mM MES, pH 5.5) que evita que las células se lisen debido a las diferencias osmóticas. Después de la digestión, el material de la pared celular no digerido se eliminó por filtración. Los protoplastos se separaron mediante centrifugación suave a 8000 rpm por 10 min. y se resuspendieron en un volumen mínimo de solución osmótica ajustando a una densidad de 1X10⁷ protoplastos por ml. La reacción de transformación se preparó mezclando 240 µl de protoplastos con 10 µg de cada plásmido y 20 µl de solución osmótica, se incubaron 20 min en hielo. Luego se agregaron 280 µl de PEG-600 al 40% a una temperatura de 42°C para provocar un choque térmico. Las reacciones de transformación se incubaron 30 min a temperatura ambiente y fueron vertidas en placas de medio de cultivo PDA selectivo con 1 M de sorbitol y 100 µg de higromicina por ml, los cultivos se incubaron a 27°C durante 5 días. Las cepas que integraron el plásmido generaron colonias en los medios selectivos, estas fueron seleccionadas

y sembradas en PDA con higromicina a través de tres cultivos monospóricos. La identificación de transformantes que sobreexpresaron la lectina, se realizó mediante reacciones de PCR, con oligonucleótidos específicos para detectar la lectina en el plásmido.

VI.17 Identificación de cepas sobreexpresantes de lectina.

Las cepas sobreexpresantes de la lectina se identificaron por PCR usando los oligonucleótidos Qlet-F y H6let-R que van dirigidos a amplificar la lectina que se insertó en el casete de sobreexpresión y que se integró a los plásmidos pUEcbh-lect, pUEblu1-lect, pUE10-lect. Las condiciones de reacción para identificar cepas transformantes fueron 3 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s 60 °C por 30 s 72 °C por 45 s; las reacciones de PCR finalizaron con 5 min a 72 °C. A las transformantes positivas a la prueba de PCR, se le hizo un RT-PCR para confirmar la expresión la lectina.

VI.18 Extracción de ARN.

Para hacer la retro transcripción y la PCR se hizo extracción de ARN total a partir de preinóculos de la cepa silvestre y de las transformantes con los plásmidos pUEcbh-lect, pUEblu1-lect, pUE10-lect de *T. atroviride*. Se inocularon 10 µL de conidios en placas de PDA y se incubaron por 48 h a 27°C en oscuridad. Posteriormente, dentro de un cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se cortaron del frente del crecimiento discos de micelio de 5 mm de diámetro de cada una de las cepas, y se colocaron con un bisturí estéril, en la parte central de placas de PDA con celofán y se dejaron incubar por 38 h a 28 °C, se colectó el micelio y se congeló en nitrógeno líquido. Para la extracción de ARN se usó el protocolo de Trizol (LifeTechnologies™) el cual consiste en moler el micelio congelado, de este se recuperaron 200 µl en un tubo Eppendorf nuevo estéril de 1.5 ml, se agregó 1 ml de Trizol a cada muestra, se mezcló en vórtex 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min, después se centrifugó a 5077 x g 1 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló en vórtex 1 min y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente, después se centrifugó a 5077 x g por 15 min. a 4 °C, se recuperó el

sobrenadante en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 ml, se agregan 500 μ l de isopropanol al 100% a cada muestra y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 5,077 x g 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se agregó etanol al 70% y se mezcló en vórtex 1 min. Posteriormente se centrifugó a 3,173 x g 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se secó el tubo boca abajo para en seguida, agregar agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) estéril (10-30 μ L) y se resuspendió la pastilla en vórtex.

La calidad del ARN extraído se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, usando como referencia el ARN ribosomal. Las muestras de ARN se mezclaron con buffer de carga para ARN (Formamida 93.75 μ l, Buffer de carga 6X 60 μ l, Formaldehído 30 μ l, TAE 10X 3.75 μ l y Bromuro de etidio 3.0 μ l) y se visualizaron en fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

VI.19 Síntesis de ADN complementario.

Se sometió a un tratamiento con DNAsa para eliminar trazas de DNA de la muestra de RNA total, para hacer esta reacción se hizo un cálculo para 100 ng/ μ l, con esto se elaboró una mezcla de reacción con volumen final de 10 μ l y se ajustó el volumen de RNA. La mezcla de reacción consta de 10X Buffer DNAsa I + MgCl₂ 1 μ l, DNase I (Casa comercial Thermo Scientific) 1 μ l, Agua DEPC y RNA, esta mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C, después de esto se agregó 1 μ l de EDTA 50 mM y se incubó nuevamente 10 min a 65 °C.

Para la síntesis del ADNc se utilizó el ARN del paso anterior, la enzima transcriptasa reversa (Thermo ScientificTM) y los oligonucleótidos antisentido de los genes *gpd1*, *env1*, *blu1*, *phr1* y el gen que codifica la lectina (Tabla 3). Estos, junto con el ARN y agua DEPC, se ajustaron a un volumen de 13 μ l, se incubó 5 min a 65 °C y después se incubó en hielo 2 min, se le dio un pulso en la microcentrifuga y se incubó en hielo. Después se agregaron 7 μ l de mezcla de reacción para lograr un volumen final de 20 μ l. La mezcla de reacción está constituida por 5X Reaction Buffer RT 4 μ l, dNTPs mix 2 μ l, Enzima Reverse Aid RT 0.5 μ l y agua DEPC 0.5 μ l. Se dio un pulso en la microcentrifuga y posteriormente se incubó a 42 °C durante 1 h. Después de este periodo se incubó a 70 °C durante 10 min y finalmente se transfirió a hielo.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el análisis de expresión génica.

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'
gpd-F	GCC GAT GGT GAG CTC AAG GG
gpd-R	GGT CGA GGA CAC GGC GGG A
blu1-F	CGT TGG CTC TCG CCT GAC C
blu1-R	GAA CGC CAT TGA AGG CCT CG
grg2-F	GAT TCC ATC AAG CAG GGT GCC
grg2-R	GTT TAG ATA GCC TGC TTG TGG G
env1-F	GCC AAA ATG GTT CCT TCA GGG TC
env1-R	GTT TGG TCG AGA CAC AAG TCG G
phr1-F	TCG GAC AGC CAG GGA CAG G
phr1-R	GTG ATT GAG CTG ACG CAT CGC

VI.20 Análisis de expresión de la lectina.

Se realizó la amplificación mediante una reacción de PCR usando como templado 1 µl de ADNc, se utilizó la enzima DreamTaq ADN Polimerasa (Thermo Scientific™). Para generar los amplicones de la lectina se usaron los oligonucleótidos Qlet-F y H6let-R. Como control de carga se utilizaron los niveles del transcrito del gen glicolítico *gpd1* (oligonucleótidos *gpd-F* y *gpd-R*) que se expresa de manera constitutiva, este codifica para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Para analizar los niveles de transcrito del gen *env1* se utilizaron los oligonucleótidos *env1-F* y *env1-R*, para el gen *blu1* se usaron los oligonucleótidos *blu1-F* y *blu1-R*, para el gen *phr1* se utilizaron los oligonucleótidos *phr1-F* y *phr1-R*, utilizando las siguientes condiciones de reacción para todos los genes: 3 min a 95°C seguida de ciclos a 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 45 s a 72 °C; las reacciones finalizaron con 5 min. a 72 °C. Para la lectina se hizo por 30 ciclos, para el gen *env1* y *blu1* se hizo por 27 ciclos, para el gen *gpd1* se hizo por 25 ciclos

y para el gen *phr1* se hizo por 36 ciclos. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (10 mg/ml) al 1. % y se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

VII Resultados

VII.1 Fusión de la lectina con el promotor y el péptido señal de la celobiohidrolasa.

Para generar el casete de sobreexpresión se utilizó la técnica de PCR unión simple y para la amplificación del promotor del gen *cbh1*, se utilizó como templado ADN genómico de *Trichoderma reesei*. Además del promotor se incluyeron los primeros 51 codones que codifican el péptido señal de la celobiohidrolasa I y para la región codificante de la lectina de frijol Tépari que se usó como templado DNA genómico de *P. pastoris* que es donde se encontraba clonada la lectina. Para esto se utilizaron oligonucleótidos quiméricos que contienen secuencias de empalme entre ambas moléculas, estos actuaron como iniciadores en la segunda ronda de PCRs (PCR 2) para fusionar ambas secuencias. La PCR 2 generó fragmentos del casete que comprende el promotor del gen *cbh1*, el péptido señal de la celobiohidrolasa I, el gen de la lectina, así como la etiqueta de 6 histidinas. No se aprecia una banda definida en el PCR 2 debido a que la polimerasa sólo fusiona fragmentos generando bandas discretas de diferentes tamaños. En la PCR 3, usando los oligonucleótidos anidados 2N5cbh1-F y H6let-R, se amplificaron 1748 pb. que corresponde al casete completo con promotor, péptido señal, lectina y etiqueta de histidinas. Al analizar electroforéticamente los amplicones, el tamaño experimental del casete coincide con el tamaño teórico (Figura 5).

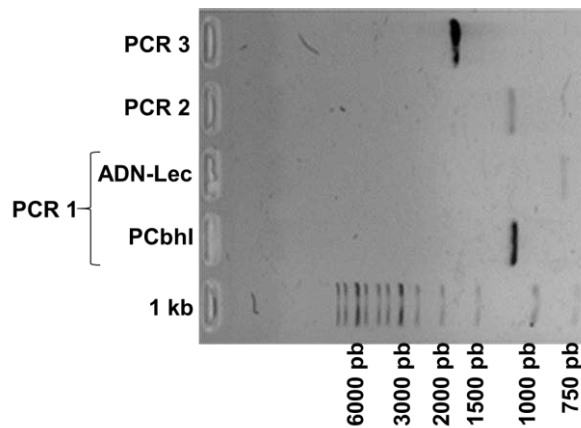


Figura 5. Construcción del casete para la sobreexpresión regulable con celulosa de la lectina de Frijol Tépari. Las reacciones de PCR se realizaron con ADN genómico extraído de micelio de *T. reesei*, para amplificar el promotor PCbhl y ADN genómico de *P. pastoris* para amplificar la lectina. **Carril 1.** Amplificación del promotor PCbhl. **Carril 2.** Amplificación de la lectina de frijol Tépari. **Carril 3.** PCR2 Fusión del promotor PCbhl con la lectina. **Carril 4.** PCR3 Amplificación de casete de sobreexpresión. Para estimar los tamaños moleculares de los amplicones se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb.

VII.2 Construcción del vector regulable por celulosa para sobreexpresar la lectina.

Después de obtener el casete de sobreexpresión de la PCR3, que es la fusión del promotor del gen *cbhl* con el péptido señal, la lectina y las 6 histidinas, se clonó en el plásmido pGEM®-T Easy. Con esta ligación se hizo una reacción de transformación en *E. coli* con el plásmido pGEM®-T Easy que tiene insertado el casete de sobreexpresión, las colonias transformantes se seleccionaron en placas de LB con ampicilina IPTG y X-GAL, de estas se tomaron ocho colonias blancas al azar para extraer el plásmido y se analizó en un gel de agarosa al 1% (Figura 6).

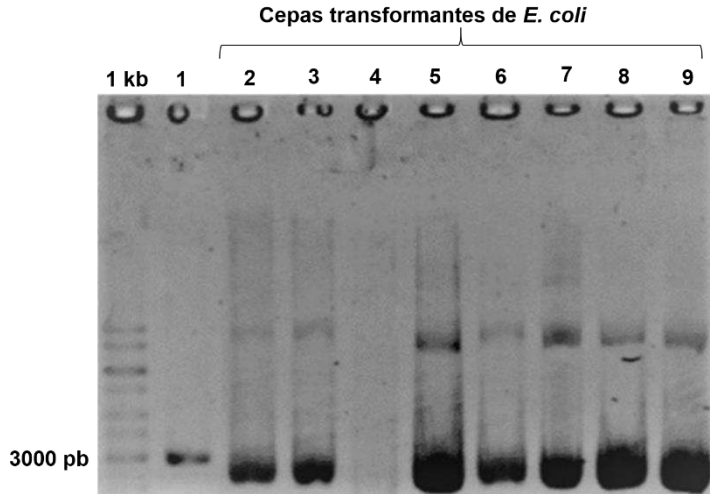


Figura 6. Extracción de plásmido de 8 cepas transformantes de *E. coli*. Carril 1. Plásmido pGEM®-T Easy. Carril 2-9. El plásmido pGEM®-T Easy se puede observar en 7 de las ocho colonias analizadas a excepción de la cepa del carril 4 donde no se encontró plásmido. Para estimar el tamaño del plásmido se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb.

Para corroborar que el casete de sobreexpresión se había integrado en el plásmido pGEM®-T Easy, se hizo una reacción de restricción con *EcoRI* para liberar el casete de sobreexpresión del plásmido, el resultado de esta reacción de restricción se analizó por electroforesis. En los plásmidos de las colonias 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 se liberó un fragmento de ADN de 1748 pb con una movilidad electroforética idéntica al casete amplificado en el PCR-3, indicando que esos plásmidos tienen clonado el casete de sobreexpresión. Solo la cepa del carril 4 muestra un resultado negativo. (Figura 7).

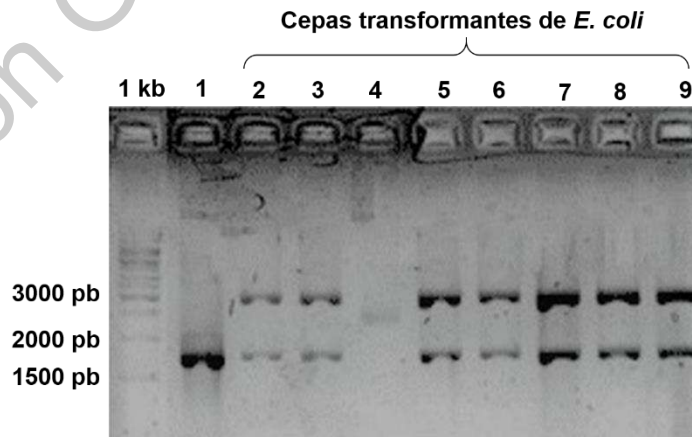


Figura 7. Restricción con *EcoRI* para liberar el casete de sobreexpresión del plásmido pGEM®-T Easy. Carril 1. Se utilizó el amplicón del casete de sobreexpresión como control positivo (PCR 3). Carril 2-9.

Plásmidos extraídos de las cepas transformantes de *E. coli* donde se pudo ver que el casete de sobreexpresión se liberó del plásmido pGEM®-T Easy. Para estimar el tamaño molecular de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb.

Posteriormente se hizo una doble restricción para identificar al promotor PCbhl con *Bam*HI y *Hin*DIII, del plásmido pGEM®-T Easy para corroborar que el promotor se había integrado al plásmido, esta restricción libera un fragmento de 770 pb. del promotor del gen *cbhl*, el movimiento en la electroforesis coincide con el tamaño teórico esperado. (Figura 8).

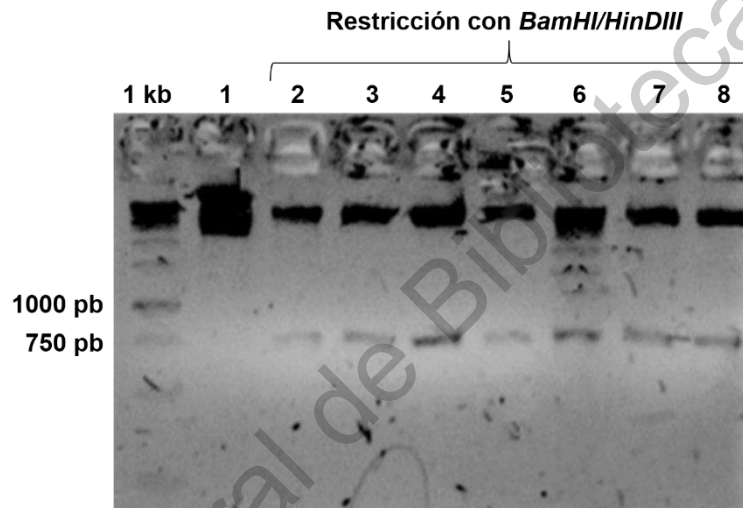


Figura 8. Restricción para identificar el promotor PCbhl del plásmido pGEM®-T Easy. Carril 1. Plásmido pGEM®-T Easy con el casete sin cortar. **Carril 2-8.** Se ve el tamaño de banda esperado del promotor del gen *cbhl*. Para estimar el tamaño molecular de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb.

Posteriormente se realizaron dos restricciones al plásmido pGEM®-T Easy, una con *Bam*HI y otra con *Eco*RI, para liberar el casete de sobreexpresión, estas restricciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se pueden ver que los tamaños de banda coinciden con los esperados una banda de 3015 pb. que corresponde al plásmido pGEM®-T Easy y una de menor tamaño que corresponde al casete de sobreexpresión de 1748 pb (Figura 9)

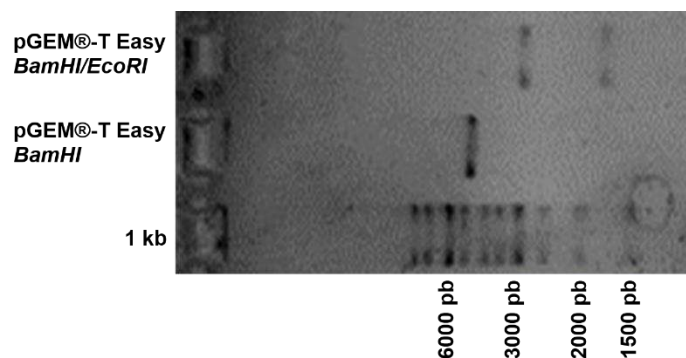


Figura 9. Restricción al plásmido pGEM®-T Easy para liberar el casete de sobreexpresión. Carril 1. Plásmido linearizado con *BamHI*. **Carril 2.** Plásmido cortado con *BamHI* y *EcoRI*, se ve el tamaño de banda esperado del casete de sobreexpresión. Para estimar el tamaño molecular de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb.

Dos plásmidos pGEM®-T Easy, uno etiquetado con el número 5 y otro con el número 7, que tienen clonado el casete de sobreexpresión se purificaron y se secuenciaron para verificar que estuviera el promotor, el marco de lectura de la lectina y la etiqueta de seis histidinas clonadas de forma adecuada. A las secuencias que se obtuvieron se les hizo un alineamiento solo para el marco de lectura abierto de la lectina (ORF) con el programa MegAlign. La secuencia que se clonó en el plásmido pGEM®-T Easy 5 y 7 resultaron ser idénticas a la que se clonó en *P. pastoris* lo cual era lo esperado (Figura 10).

A continuación, a la secuencia de nucleótidos del promotor PCbhl se le hizo un alineamiento con las secuencias de los plásmidos etiquetados como 5 y 7. El resultado del alineamiento muestra que ambas secuencias son idénticas a la secuencia depositada en la base del genoma de *T. reesei*, lo que indica que nuestro promotor se clonó de forma adecuada (Figura 11).

Posteriormente a las secuencias de nucleótidos, del ORF de la lectina, fueron traducidas a aminoácidos y se alinearon con el software MegAlign, el resultado de esta alineación refiere que todos los aminoácidos son los mismos en ambas secuencias lo que sugiere que la proteína quimérica debe ser funcional (Figura 12). Los alineamientos que se hicieron nos indican, además, que el casete de sobreexpresión se había clonado de forma correcta.

Después del análisis realizado a la secuenciación, el casete de sobreexpresión se liberó del plásmido pGEM®-T Easy con las endonucleasas *Bam*HI/*Eco*RI y se purificó. El casete se clonó en los mismos sitios de restricción, en el plásmido pCB1004-Tblu17, al cual se le habían hecho dos restricciones previas, con *Bam*HI/*Eco*RI, para poder insertar el casete.

-----ACGACATCTCTCAACTTCCAAGGTT

	10	20	30	40	50	60	70	80	
Lectina P.p	ATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTGGGCTTCTTGGCCACAGCTCGTGCTAACGACATCTCTCAACTTCCAAGGTT								80
Lectina 5	-----ACGACATCTCTCAACTTCCAAGGTT								28
Lectina 7	-----ACGACATCTCTCAACTTCCAAGGTT								28
-----CAAGGAAACCAACTCATCTCCAAGGCGATGCTCCGCTCTCATCTCCGGCCAGTTACGACTAACCAATCTTAATGACA									
	90	100	110	120	130	140	150	160	
Lectina P.p	CAAGGAAACCAACTCATCTCCAAGGCGATGCTCCGCTCTCATCTCCGGCCAGTTACGACTAACCAATCTTAATGACA								160
Lectina 5	CAAGGAAACCAACTCATCTCCAAGGCGATGCTCCGCTCTCATCTCCGGCCAGTTACGACTAACCAATCTTAATGACA								108
Lectina 7	CAAGGAAACCAACTCATCTCCAAGGCGATGCTCCGCTCTCATCTCCGGCCAGTTACGACTAACCAATCTTAATGACA								108
-----ACGGAGAACCAAGTGTCTCTGGGCCGCGCTTCTACTCCACCCCAATCGAAATCTGGGACAGCACCACGGCGCC									
	170	180	190	200	210	220	230	240	
Lectina P.p	ACGGAGAACCAAGTGTCTCTGGGCCGCGCTTCTACTCCACCCCAATCGAAATCTGGGACAGCACCACGGCGCC								240
Lectina 5	ACGGAGAACCAAGTGTCTCTGGGCCGCGCTTCTACTCCACCCCAATCGAAATCTGGGACAGCACCACGGCGCC								188
Lectina 7	ACGGAGAACCAAGTGTCTCTGGGCCGCGCTTCTACTCCACCCCAATCGAAATCTGGGACAGCACCACGGCGCC								188
-----GTGGCCAGCTTCGCCAECTCTTACATTCANATACGGTTCGCCAACATGCAGGACCCCGGATGGCCCTTGCCCTTTC									
	250	260	270	280	290	300	310	320	
Lectina P.p	GTGGCCAGCTTCGCCAECTCTTACATTCANATACGGTTCGCCAACATGCAGGACCCCGGATGGCCCTTGCCCTTTC								320
Lectina 5	GTGGCCAGCTTCGCCAECTCTTACATTCANATACGGTTCGCCAACATGCAGGACCCCGGATGGCCCTTGCCCTTTC								268
Lectina 7	GTGGCCAGCTTCGCCAECTCTTACATTCANATACGGTTCGCCAACATGCAGGACCCCGGATGGCCCTTGCCCTTTC								268
-----TCTCGTCCCGTGGCTCTTAAGCCAAAGACAGAGCGGCTTCTTAGGTCTGTTCGACGGCAGCGACAGCAAGCCATA									
	330	340	350	360	370	380	390	400	
Lectina P.p	TCTCGTCCCGTGGCTCTTAAGCCAAAGACAGAGCGGCTTCTTAGGTCTGTTCGACGGCAGCGACAGCAAGCCATA								400
Lectina 5	TCTCGTCCCGTGGCTCTTAAGCCAAAGACAGAGCGGCTTCTTAGGTCTGTTCGACGGCAGCGACAGCAAGCCATA								348
Lectina 7	TCTCGTCCCGTGGCTCTTAAGCCAAAGACAGAGCGGCTTCTTAGGTCTGTTCGACGGCAGCGACAGCAAGCCATA								348
-----CTGTGCTGTGGAGTTCGACACCTTGTAACAAGGGACTGGGAACCCAGAGAGCGTCAATTTGGCATGCACTGAACTCC									
	410	420	430	440	450	460	470	480	
Lectina P.p	CTGTGCTGTGGAGTTCGACACCTTGTAACAAGGGACTGGGAACCCAGAGAGCGTCAATTTGGCATGCACTGAACTCC								480
Lectina 5	CTGTGCTGTGGAGTTCGACACCTTGTAACAAGGGACTGGGAACCCAGAGAGCGTCAATTTGGCATGCACTGAACTCC								428
Lectina 7	ATCAAGTCTATCAAACGAGCCGCTGGGATTTTGTCAACGGAGAAGACGCCGAGGTTCTGATCACCTATGACTCTCCAC								
	490	500	510	520	530	540	550	560	
Lectina P.p	ATCAAGTCTATCAAACGAGCCGCTGGGATTTTGTCAACGGAGAAGACGCCGAGGTTCTGATCACCTATGACTCTCCAC								560
Lectina 5	ATCAAGTCTATCAAACGAGCCGCTGGGATTTTGTCAACGGAGAAGACGCCGAGGTTCTGATCACCTATGACTCTCCAC								508
Lectina 7	ATCAAGTCTATCAAACGAGCCGCTGGGATTTTGTCAACGGAGAAGACGCCGAGGTTCTGATCACCTATGACTCTCCAC								508
-----GAAGCTCTTGGTGGCTTCTCGGTTTACCCCTTCTCAGAAAACGAGCTTCACTGCTCTGACACAGTGGATCTGAAGAGCG									
	570	580	590	600	610	620	630	640	
Lectina P.p	GAAGCTCTTGGTGGCTTCTCGGTTTACCCCTTCTCAGAAAACGAGCTTCACTGCTCTGACACAGTGGATCTGAAGAGCG								640
Lectina 5	GAAGCTCTTGGTGGCTTCTCGGTTTACCCCTTCTCAGAAAACGAGCTTCACTGCTCTGACACAGTGGATCTGAAGAGCG								588
Lectina 7	GAAGCTCTTGGTGGCTTCTCGGTTTACCCCTTCTCAGAAAACGAGCTTCACTGCTCTGACACAGTGGATCTGAAGAGCG								588
-----TTCTTCCCGAGTGGGTGAGCGTGGGTTCTTGCACCTCTGGGATTAGTAAAGGGAACGTTGAAACGAAAGCACTCTCT									
	650	660	670	680	690	700	710	720	
Lectina P.p	TTCTTCCCGAGTGGGTGAGCGTGGGTTCTTGCACCTCTGGGATTAGTAAAGGGAACGTTGAAACGAAAGCACTCTCT								720
Lectina 5	TTCTTCCCGAGTGGGTGAGCGTGGGTTCTTGCACCTCTGGGATTAGTAAAGGGAACGTTGAAACGAAAGCACTCTCT								668
Lectina 7	TTCTTCCCGAGTGGGTGAGCGTGGGTTCTTGCACCTCTGGGATTAGTAAAGGGAACGTTGAAACGAAAGCACTCTCT								668
-----TCTTGGTCTTTCGCTTCCAAGCTCTCCGATGGCACCACATCTGAAGGTTTGAATCACCACCACCACCACCCTGAAATTC									
	730	740	750	760	770	780	790	800	
Lectina P.p	TCTTGGTCTTTCGCTTCCAAGCTCTCCGATGGCACCACATCTGAAGGTTTGAATCACCACCACCACCACCCTGAAATTC								800
Lectina 5	TCTTGGTCTTTCGCTTCCAAGCTCTCCGATGGCACCACATCTGAAGGTTTGAATCACCACCACCACCACCCTGAAATTC								748
Lectina 7	TCTTGGTCTTTCGCTTCCAAGCTCTCCGATGGCACCACATCTGAAGGTTTGAATCACCACCACCACCACCCTGAAATTC								748

Figura 10. Alineamiento de secuencias del ORF de la lectina. Lectina P.p, secuencia de la lectina que se encontraba clonada en *P. pastoris*. Lectina 5, secuencia de la lectina del plásmido 5. Lectina 7, secuencia de la lectina del plásmido 7. Las secuencias se alinearon usando el programa MegAline por el método de Clustal W.

	CTCGAAGGTTACGGCAAGGGAAACCCAGGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGA	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
Sec. PCbhl	CTCGAAGGTTACGGCAAGGGAAACCCAGGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGA	80
Sec. pGEM5	(CTCGAAGGTTACGGCAAGGGAAACCCAGGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGA	80
Sec. pGEM7	(CTCGAAGGTTACGGCAAGGGAAACCCAGGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGA	80
	AAATACAAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAA	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
Sec. PCbhl	AAATACAAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAA	160
Sec. pGEM5	(AAATACAAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAA	160
Sec. pGEM7	(AAATACAAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAA	160
	GTGGCTAAACGTACCCTAATTTGCCAACGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCACTTCCCACGTTTGT	
	170 180 190 200 210 220 230 240	
Sec. PCbhl	GTGGCTAAACGTACCCTAATTTGCCAACGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCACTTCCCACGTTTGT	240
Sec. pGEM5	(GTGGCTAAACGTACCCTAATTTGCCAACGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCACTTCCCACGTTTGT	240
Sec. pGEM7	(GTGGCTAAACGTACCCTAATTTGCCAACGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCACTTCCCACGTTTGT	240
	250 260 270 280 290 300 310 320	
Sec. PCbhl	TCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCCCCAATGGGTCGCTTGTGTTCGGTGAAGTGAAGAAGACAGAGG	320
Sec. pGEM5	(TCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCCCCAATGGGTCGCTTGTGTTCGGTGAAGTGAAGAAGACAGAGG	320
Sec. pGEM7	(TCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCCCCAATGGGTCGCTTGTGTTCGGTGAAGTGAAGAAGACAGAGG	320
	TAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGT	
	330 340 350 360 370 380 390 400	
Sec. PCbhl	TAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGT	400
Sec. pGEM5	(TAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGT	400
Sec. pGEM7	(TAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAATGTTGACATTCAGGAGT	400
	ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	
	410 420 430 440 450 460 470 480	
Sec. PCbhl	ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	480
Sec. pGEM5	(ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	480
Sec. pGEM7	(ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	480
	ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	
	410 420 430 440 450 460 470 480	
Sec. PCbhl	ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	480
Sec. pGEM5	(ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	480
Sec. pGEM7	(ATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACCTCTGAT	480
	GAAGTGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTC	
	490 500 510 520 530 540 550 560	
Sec. PCbhl	GAAGTGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTC	560
Sec. pGEM5	(GAAGTGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTC	560
Sec. pGEM7	(GAAGTGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTC	560
	GGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAGTGTGGTAGGATCGAACACACTGCTGCCTTT	
	570 580 590 600 610 620 630 640	
Sec. PCbhl	GGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAGTGTGGTAGGATCGAACACACTGCTGCCTTT	640
Sec. pGEM5	(GGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAGTGTGGTAGGATCGAACACACTGCTGCCTTT	640
Sec. pGEM7	(GGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAGTGTGGTAGGATCGAACACACTGCTGCCTTT	640
	ACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAATGTTACAGGGCCACTGCATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCXXX	
	650 660 670 680 690 700 710 720	
Sec. PCbhl	ACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAATGTTACAGGGCCACTGCATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCXXX	720
Sec. pGEM5	(ACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAATGTTACAGGGCCACTGCATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCXXX	717
Sec. pGEM7	(ACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAATGTTACAGGGCCACTGCATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCXXX	717

Figura 11. Alineamiento de secuencias del promotor PCbhl. Sec. PCbhl, secuencia del promotor de *T. reesei*. Sec. pGEM5, secuencia del promotor clonado en el plásmido pGEM®-T Easy 5. Sec. pGEM7, secuencia del promotor clonado en el plásmido pGEM®-T Easy 7. Las secuencias se alinearon usando el programa MegAline por el método de Clustal W.



Figura 12. Alineamiento de aminoácidos del ORF de la lectina. PS-Let-6H, aminoácidos del ORF de la lectina de frijol Tepará. Lect-Q, aminoácidos del ORF de la lectina química. Las secuencias se alinearon usando el programa MegAline por el método de Clustal W.

Se hizo una reacción de transformación a *E. coli*, con dicho plásmido y se sembró en placas de LB con cloranfenicol. Del resultado de esta transformación se tomaron 10 colonias y se sembraron en 3 ml de LB con cloranfenicol para extraer el plásmido. Se hizo la extracción de ADN plasmídico a las 10 colonias anteriores, a éstas se les hizo una doble restricción con las enzimas que flanquean nuestro inserto, *Bam*HI y *Eco*RI, para corroborar la presencia del casete ya que el casete de sobreexpresión tiene en el promotor PCbhl, un sitio de restricción *Bam*HI y un sitio de restricción *Eco*RI al final de las 6 histidinas. El resultado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, en los carriles 2, 4, 5, 6, 7, y 9 se muestran plásmidos con el movimiento electroforético esperado, una banda de 6 kb del plásmido pCB100-Tblu17 y otra banda con una movilidad electroforética idéntica al casete de sobre

expresión usado como control (Figura 13). En el carril 1, 3, 8 y 10 no se observa el patrón teórico de bandas lo que demuestra que en esos plásmidos no se había insertado el casete de sobreexpresión. Al plásmido pCB1004-Tblu17, que ya contenía el casete de sobreexpresión, será llamado de aquí en adelante pUEcbh-lect (Figura 14).

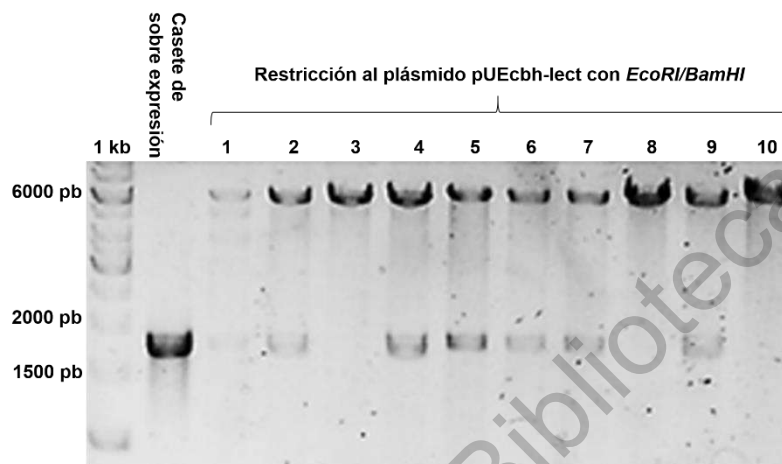


Figura 13. Identificación del casete de sobreexpresión en el plásmido pUEcbh-lect con *EcoRI* y *BamHI*. Carril 2. Fusión de Lectina mas el promotor PCbhI, péptido señal e histidinas (PCR 3) Carril 2-10. Dobles restricciones hechas al plásmido pUEcbh-lect. Para estimar el tamaño molecular de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb.

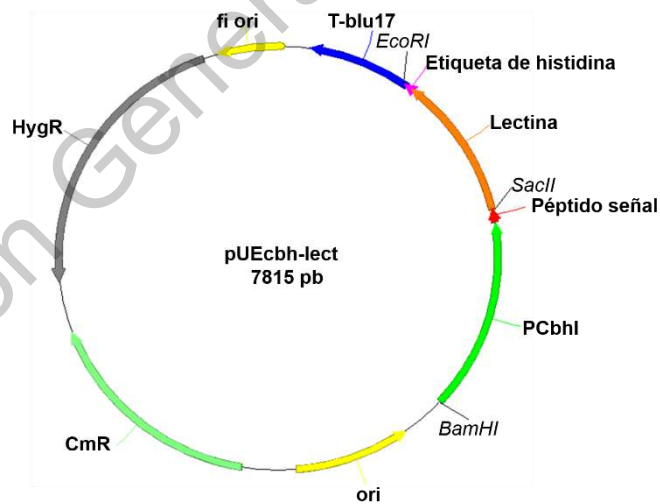


Figura 14. - Mapa del plásmido pUEcbh-let. En gris el gen de resistencia a higromicina B (*HygR*); en azul claro, gen de resistencia a cloranfenicol (*CmR*); en amarillo, el origen de replicación para bacterias (*ori*), en verde, el promotor PCbhI; en color rojo, el péptido señal; en color naranja, el gen que codifica para la lectina, en morado la etiqueta de histidinas y en azul oscuro el terminador T-blu17.

VII.3 Clonación del promotor del gen *blu1*.

Para construir el vector regulable por luz se hizo una PCR usando como templado ADN genómico de *T. reesei* y para clonar el promotor del gen *blu1* se usaron los oligonucleótidos, PTrblu1-F que tiene un sitio de restricción *SacI* y PTrblu1-R que tiene un sitio de restricción *SacII*. El resultado se analizó con un gel de agarosa al 1% (Figura 15). El tamaño teórico del amplicón fue de 1069 que coincide con el tamaño experimental, ya que se observa una banda muy próxima a los 1000 pb del marcador de peso molecular.

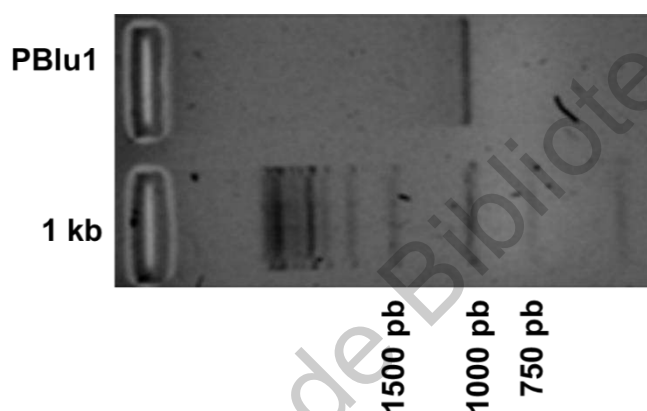


Figura 15. Clonación del promotor PBlu1 del gen *blu1*. Carril 2. Se observa la banda que corresponde al promotor PBlu1 de 1069 pb. Para estimar el tamaño de banda se usó el marcador de peso molecular de 1 Kb.

VII.4 Construcción de un vector regulable por luz azul.

El amplicón del promotor del gen *blu1* se purificó y se llevó a cabo una ligación en el plásmido pGEM-T Easy, posteriormente, con esta ligación se hizo una transformación en *E. coli* y las transformantes se seleccionaron en medio de cultivo LB agar adicionado con Xgal -IPTG y ampicilina, fueron seleccionadas 5 colonias blancas y se inocularon en 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina para hacer minipreparaciones y extraer ADN plasmídico. A este plásmido se le hizo una restricción con *XhoI*, estos sitios de restricción se encuentran únicamente en el promotor, pero no en el plásmido pGEM®-T Easy, de las 5 colonias seleccionadas en una se identificó el fragmento esperado del promotor PBlu1 de 572 pb en el plásmido (Figura 16).

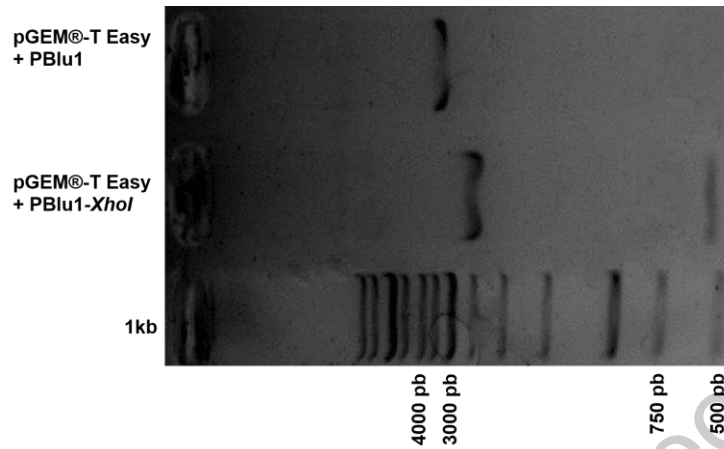


Figura 16. Identificación del promotor PBlu1 en el plásmido pGEM®-T Easy. Carril 2. Se cortó el plásmido pGEM-T Easy con *XhoI*. **Carril 3.** Plásmido pGEM®-T Easy (3015 pb.) y el promotor Blu1(1069) suman un total 4084 pb. Para estimar el tamaño de banda se usó el marcador de peso molecular de 1 Kb

VII.5 Construcción de un plásmido para sobreexpresar la lectina con luz azul.

Para liberar el promotor PBlu1 del plásmido pGEM®-T Easy, se hizo una doble digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *SacII* (Figura 18), liberando un fragmento de 1069 pares de bases que corresponde al promotor PBlu1. Esta banda se cortó y purificó para después ser insertada en el plásmido pUE10. Esta reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa en la que se puede observar una banda de mayor tamaño (3015 pb) que corresponde al plásmido pGEM®-T Easy, y otra de menor tamaño que corresponde al promotor PBlu1(1069 pb) (Figura 17).

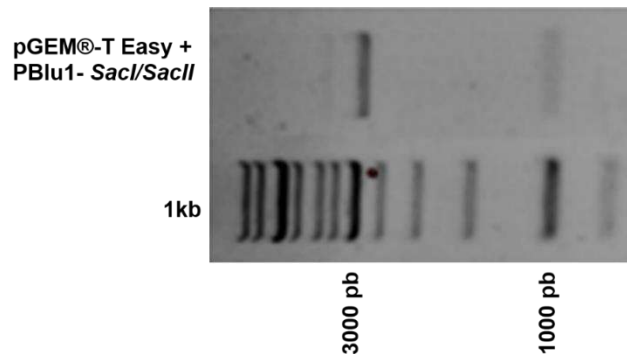


Figura 17. Restricción para escindir al promotor PBlu1 del plásmido pGEM®-T Easy. Se liberó el promotor PBlu1 del plásmido pGEM®-T Easy con una doble restricción con las endonucleasas *SacI/SacII*. **Carril 1.** Se ven dos bandas una de 3015 y otra de 1069 pb. Para estimar el tamaño de banda se usó el marcador de peso molecular de 1 Kb

Para poder insertar al promotor PBlu1 en el plásmido pUE10, se le hizo una doble restricción con las endonucleasas *SacI* y *SacII*, para liberar el promotor PpKi. El resultado de esta restricción se observa en el tercer carril del gel de agarosa donde se muestra la banda que se libera de 800 pb. que corresponde al tamaño del promotor Ppki1 y otra banda de 6104 pb. que corresponde al plásmido pUE10 sin el promotor (Figura 18).

Después con el plásmido pUE10 ya sin el promotor Ppki1, se hizo una reacción de ligación con el promotor PBlu1 el cual había sido liberado de pGEM®-T Easy con las mismas endonucleasas. La ligación se realizó en estos mismos sitios de restricción *SacI* y *SacII*, obteniendo así el plásmido pUE10blu1 (Figura 19a). Con este plásmido se hizo una reacción de transformación en *E. coli*, se extrajo el plásmido y se analizó mediante restricción con *SacI* y *SacII*, se pueden ver las bandas teóricas de 1069 y 6104 que corresponden al promotor PBlu1 y al plásmido pUE10 (Figura 19b).

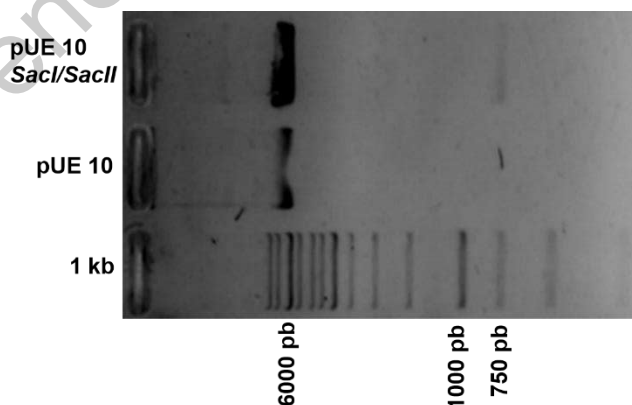


Figura 18.- Doble restricción al plásmido pUE10 para escindir el promotor PpKi1. Carril 1. Plásmido pUE10 sin cortar. Carril 2. Plásmido pUE10 cortado con *SacI* y *SacII*, liberan el promotor Ppki1. El tamaño de banda se estimó con el marcador de peso molecular de 1 Kb.

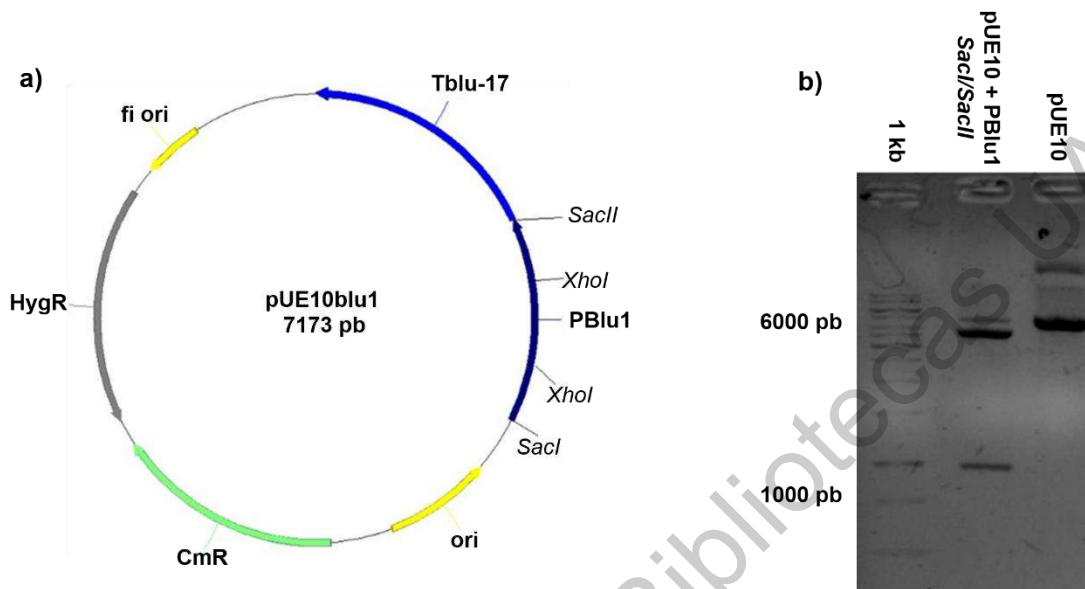


Figura 19. Ligación del promotor PBlu1 al plásmido pUE10. a) Plásmido pUE10-Blu1 con el promotor Pblu1. El promotor Pblu1 se ve en color azul fuerte, en azul claro, terminador T-blu17; amarillo, origen de replicación f1 ori; gris, gen de resistencia para higromicina *HygR*; verde claro, gen de resistencia para cloranfenicol *CmR* y en amarillo, origen de replicación ori.

Para generar el plásmido para la sobreexpresión de la lectina inducible con luz azul, al plásmido pUEcbh-lect, se le hicieron dos digestiones, una con *SacII* y otra con *EcoRI*, para liberar el fragmento del péptido señal, la lectina y la etiqueta de seis histidinas que mide 803 pb (Figura 20).

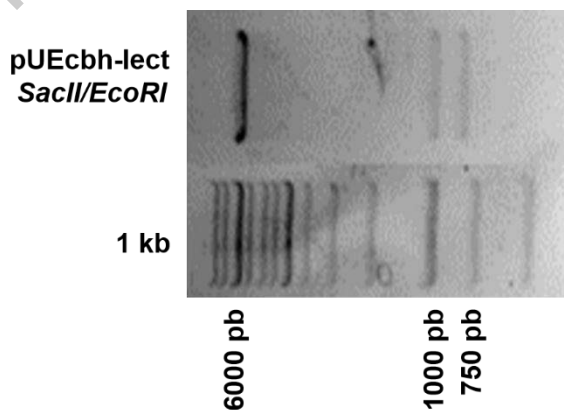


Figura 20. Restricción al plásmido pUEcbh-lect para liberar el péptido señal, la lectina y la etiqueta de seis histidinas. Carril 2. Las bandas de interés son, la que está cerca a los 6000 pb. que corresponde al plásmido y la que está cerca a los 750 pb. que corresponde al casete de sobreexpresión. Marcador de peso molecular de 1 Kb

La banda que está próxima a los 750 pb del marcador de peso molecular se cortó del gel de agarosa y se purificó, para después, ser ligada en el plásmido pUE10 al cual se le había ya insertado el promotor PBlu1 mediante una reacción de ligación. De esta manera se obtuvo el plásmido pUEblu1-lect (Figura 21). Con este plásmido se hizo una reacción de transformación en *E. coli*, se sembró en agar LB y cloranfenicol como agente selectivo. De las colonias que crecieron se tomaron 10 al azar y se les hizo una extracción de plásmido. Para identificar el casete de sobreexpresión en las 10 colonias transformadas, con el plásmido pUEblu1-lect, se hizo una digestión con la endonucleasa *XhoI*, esta enzima reconoce dos sitios de restricción que están solamente en el promotor PBlu1, con esta reacción se observaron dos bandas en 8 (carril 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, y 10) de los 10 plásmidos, una banda cercana a las 500 pb. que corresponde al fragmento que libera esta enzima del promotor PBlu1 de 572pb y otra de 7401 pb que corresponden al plásmido pUEblu1-lect (Figura 22). Esto nos reveló que el casete estaba integrado en el plásmido.

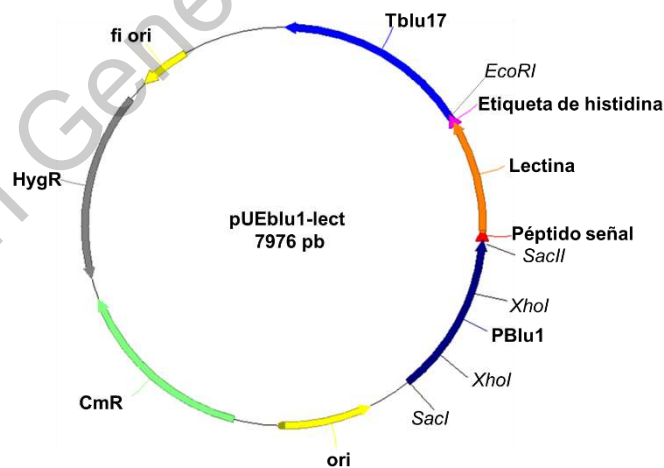


Figura 21- Mapa del plásmido pUEblu1-lect. Gris, gen de resistencia a higromicina (*HygR*); verde pálido, gen de resistencia a cloranfenicol (*CmR*); amarillo, origen de replicación para bacterias (*ori*); azul oscuro, promotor Pblu1; rojo, el péptido señal; naranja, gen que codifica para la lectina; en morado la etiqueta de histidinas y en azul oscuro el terminador T-blu17. El promotor Pblu1 tiene *Sac I* y *SacII* y 2 sitios *Xho1*.

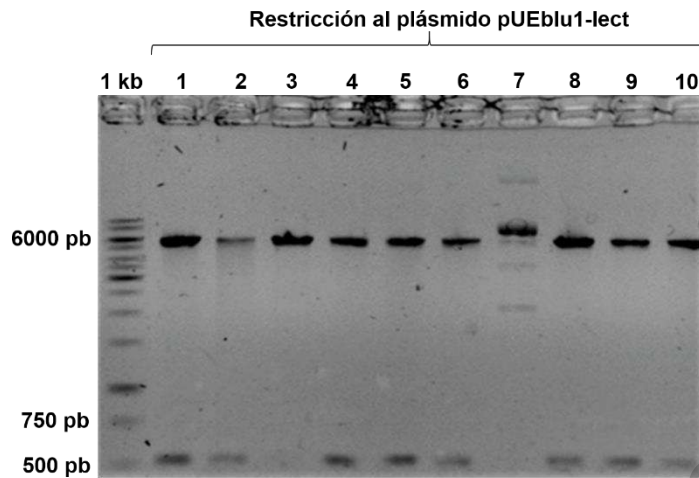


Figura 22. Identificación de plásmidos pUEblu1-lect por restricción con *Xho*I. El promotor PBlu1 tiene 2 sitios de restricción que reconoce la enzima *Xho*I. Carril 1-10 plásmidos de las 10 colonias seleccionadas analizados mediante restricción con *Xho*I. Marcador de peso molecular de 1 Kb.

VII.6 Construcción de vector para la sobre expresión constitutiva de la lectina.

Para generar este vector, al plásmido pUEcbh-lect, se le hicieron dos digestiones, una con *Sac*II y otra con *Eco*RI, para liberar el fragmento del péptido señal, la lectina y la etiqueta de seis histidinas que mide 803 pb. La banda que está próxima a los 1000 pb del marcador de peso molecular se cortó del gel de agarosa y se purificó, para después, ser ligada en el plásmido pUE10 el cual, previamente, se linearizó con dos reacciones de digestión, una con *Sac*II y la segunda con *Eco*RI, para en ese sitio, mediante una reacción de ligación insertar el fragmento del péptido señal, la lectina y la etiqueta de seis histidinas al cual previamente se le había hecho el mismo proceso, de esta manera se generó el plasmidio pUE10-lect de expresión constitutiva (Figura 23). Cabe mencionar que el casete de sobreexpresión estará bajo el control del promotor PpKi1 que porta originalmente el plásmido.

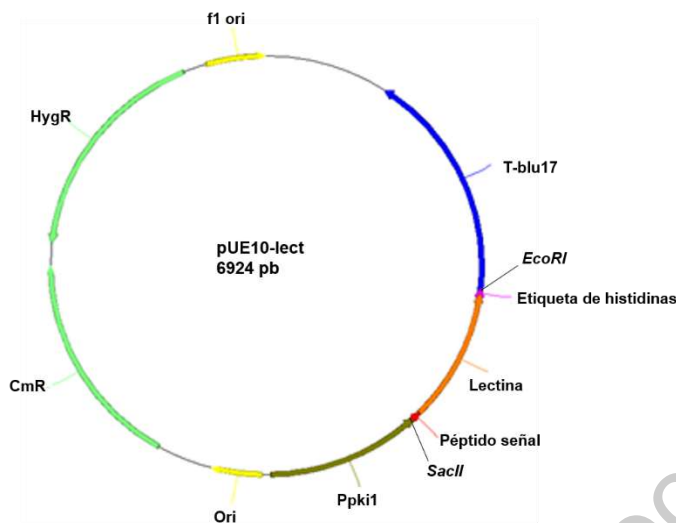


Figura 23. Mapa del plásmido pUE10-lect. Verde pálido gen de resistencia a higromicina (*HygR*), verde pálido gen de resistencia a cloranfenicol (*CmR*), amarillo el origen de replicación para bacterias (ori), verde oscuro promotor Ppki1, rojo el péptido señal, naranja el gen que codifica para la lectina, en morado la etiqueta de histidinas y en azul oscuro el terminador T-blu17. Tiene un sitio de restricción para las endonucleasas *Sac I* y otro para *SacII*.

VII.8 Transformación de protoplastos *T. atroviride*.

Con los plásmidos obtenidos en los procesos anteriores (pUEcbh-lect, pUEblu1-lect y pUE10-lect), se hicieron transformaciones a protoplastos de *T. atroviride* y se sembraron en PDA suplementado con higromicina B 50 mg/ml y 1M sorbitol, obteniendo colonias transformadas de los tres plásmidos de este hongo a la semana de haber sido sembrados. A las cepas que crecieron se les hicieron tres pases monospóricos en medio PDA suplementado con higromicina B 50 mg/ml. Después de hacer los 3 pases monospóricos quedaron 12 cepas que contienen el vector pUEcbh-lect, 12 cepas que contienen el vector pUEblu1-lect y 4 con el plásmido constitutivo pUE10-lect.

Para identificar que las cepas transformantes tenían el vector de sobreexpresión inducido por luz (pUEcbh-lect) se hizo una reacción de PCR dirigida a la lectina, el resultado se analizó electroforéticamente en gel de agarosa 1% en donde se observa que amplificó la lectina en las cepas identificadas con los números 2, 3, 8, 10 y 13, este resultado indica que el casete de sobreexpresión estaba integrado al genoma de *T. atroviride* (Figura 24) y en las cepas 1, 4, 5, 6, 9, 12 y 15 no se

amplifico la lectina. En los 12 carriles del gel de agarosa se indica el numero con el que se identifica la cepa transformante.

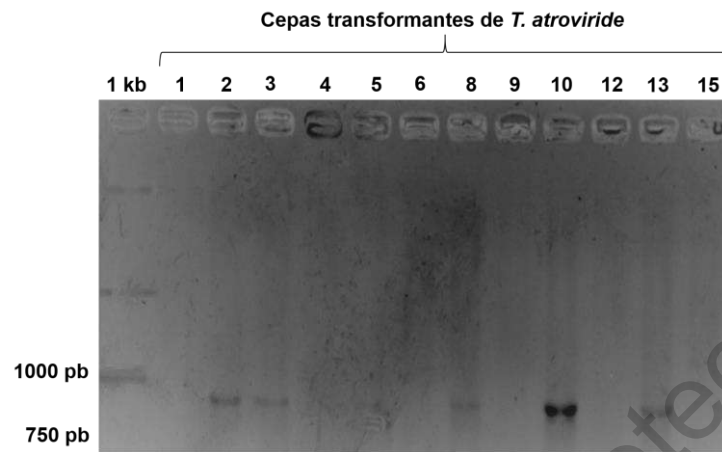


Figura 24. Identificación de cepas transformantes con el vector pUEcbh-lect de *T. atroviride*. A las 12 cepas se les extrajo DNA total de micelio, y se hizo una reacción de PCR con los oligonucleótidos Qlet-F y H6let-R que dan un tamaño de 825 pb. **Carril 1.** Cepa silvestre de *T. atroviride*. **Carril 2-12.** Cepas transformantes con el plásmido pUEcbh-lect. Para estimar el tamaño de banda se usó el marcador de peso molecular de 1 Kb.

Se hizo una reacción de PCR dirigida a la lectina para identificar que las 4 cepas transformantes tenían el casete de sobreexpresión constitutivo pUE10-lect, el resultado se analizó por electroforesis, en gel de agarosa 1%, en donde se observa que en la cepa 2 fue la única que amplificó el gen de la lectina, lo que indicó que el casete de sobreexpresión está integrado al genoma de *T. atroviride* de esta cepa (Figura 25).

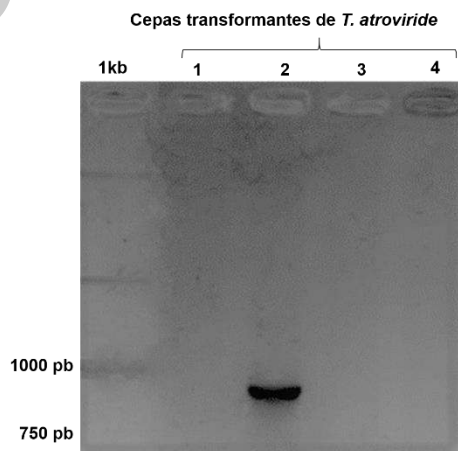


Figura 25. Identificación de cepas transformantes de *T. atroviride* que portan el vector pUE10-lect. A las 4 cepas transformantes se les extrajo DNA total de micelio y se hizo una reacción de PCR con los

oligonucleótidos Qlet-F y H6let-R que amplifican un tamaño de 825 pb. **Carril 1-4.** Cepas transformantes con el plásmido pUE10-lect. Para estimar el tamaño de banda se usó el marcador de peso molecular de 1 Kb.

De la misma manera que las cepas anteriores, para identificar que las cepas transformantes tenían el vector de sobreexpresión inducido por luz pUEblu1-lect, se hizo una reacción de PCR dirigida a la lectina en estas cepas, el resultado se analizó electroforéticamente en gel de agarosa 1% en donde se observa que en las cepas 2, 9, 11 y 12 se amplificó la lectina, lo que indicó que el casete de sobreexpresión está integrado al genoma de estas cepas de *T. atroviride* (Figura 26).

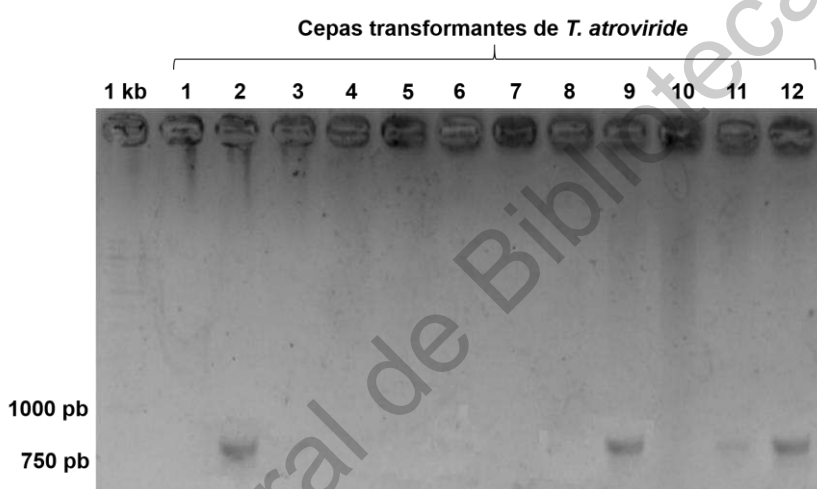


Figura 26. Identificación de cepas transformantes con el vector pUEblu1-lect de *T. atroviride*. A las 12 cepas transformantes se les extrajo DNA total de micelio y se hizo una reacción de PCR con los oligonucleótidos Qlet-F y H6let-R que amplifican un tamaño de 825 pb. **Carril 1-12.** Cepas transformantes con el plásmido pUE10-lect. Para estimar el tamaño de banda se usó el marcador de peso molecular de 1 Kb.

VII.9 Identificación de cepas sobreexpresantes de lectina.

VII.9.1 Extracción de ARN.

Después de hacer las reacciones de PCR, para identificar las cepas transformantes quedaron, finalmente, 3 cepas que contenían el vector pUEcbh-lect (PCbhl 2, PCbhl 10 y PCbhhl13), 3 cepas con el vector pUEblu1-lect (Pblu1 2, PBlu1 9 y PBlu112) y una cepa con el vector constitutivo pUE10-lect (Ppki1 2). Las cepas con el plásmido pUEcbh-lect fueron sembradas en placas con Medio Mínimo Vogels Agar adicionado con 2% de celulosa, más una película de celofán, después de 48 h en

oscuridad se hizo la extracción de ARN total. Las cepas con el plásmido pUEblu1-lect fueron sembradas en PDA con una película de celofán, después de 48 h en oscuridad, fueron expuestas a 1 hora de luz, después de esto se extrajo el ARN total. La cepa Ppki1 2 con el plásmido constitutivo se sembró en PDA con una película de celofán para obtener micelio y después de 48 h en oscuridad se hizo la extracción de ARN total. El resultado de la extracción se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio para verificar la integridad del ARN ribosomal (rARN) las bandas que se observan corresponden a rARN 28S y rRNA 18S (Figura 27).

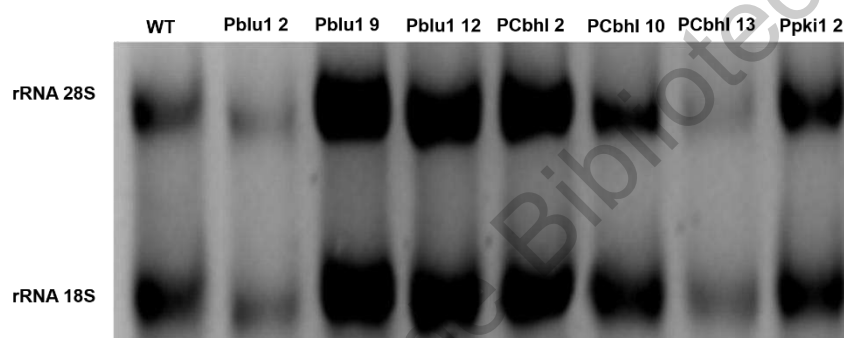


Figura 27. Extracción de ARN total de la cepa silvestre y de cepas sobreexpresantes de *T. atroviride*. De abajo hacia arriba. **Carril 1.** Cepa silvestre *T. atroviride*. **Carril 2-4** ARN de cepas sobreexpresantes con el vector inducible con luz azul Pblu1 2, Pblu1 9 y Pblu112. **Carril 5-7** ARN de cepas sobreexpresantes con el plásmido inducible por celulosa PCbhl 2, PCbhl 10 y PCbhl13. **Carril 8** ARN de la cepa transformante con el plásmido constitutivo Ppki1 2.

VII.10 Expresión regulable de lectina por luz.

A partir del ARN total se hicieron reacciones de RT a las cepas transformantes de *T. atroviride* con el vector inducible con luz azul pUEblu1-lect, la enzima utilizada para esto fue la RevertAid Reverse Transcriptase, de la casa comercial Thermo Scientific. Para hacer esto se pusieron a crecer las cepas durante 48 h en oscuridad y después fueron expuestas a luz azul durante 1 h, después se extrajo el ARN total con el protocolo de Trizol (LifeTechnologies™) descrito en el apartado de métodos. Al RNA total se le dio un tratamiento con DNasa para eliminar el ADN, se hizo la retrotranscripción para obtener el ADNc y la reacción de PCR, usando como

templado el ADNc. Se utilizaron los oligonucleótidos Qlet -F y H6let-R, éstos amplifican 825 pb que comprende el péptido señal, el ORF de la lectina y la etiqueta de histidinas. El resultado se analizó en gel de agarosa al 1%. Se puede observar que en las 3 cepas transformante con el vector pUEblu1-lect amplificó la lectina y en la cepa silvestre no se observa esta banda, lo que sugiere que el vector está integrado al genoma y operando de manera adecuada (Figura 28).

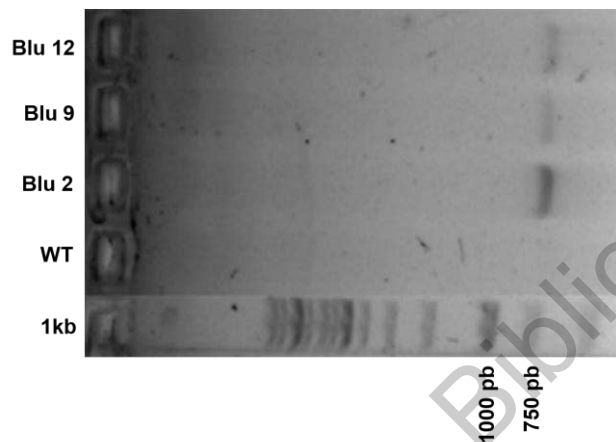


Figura 28. Expresión de la lectina inducida por la luz en las sobreexpresantes Pblu2, Pblu9 y Pblu12.

De abajo hacia arriba, marcador de peso molecular de 1 Kb. **Carril 1.** Cepa silvestre. **Carril 3-5** amplicones de la lectina obtenido a partir de ADNc de las cepas transformantes.

Se analizó la expresión de diferentes genes para conocer el nivel de expresión de la lectina mediante reacciones de retrotranscripción y PCR, se utilizaron, el gen que codifica para la lectina, el gen de expresión constitutivo *gpd1* y genes que son inducidos por luz (*blu1*, *grg1*, *env1* y *phr1*), como control. Los niveles de expresión de lectina se observan bajos en comparación a *phr1* y *blu1*, pero similar al gen *env1*, la cepa transformante PBlu 2 tuvo una mayor expresión en oscuridad que en luz y por esta razón se eliminó para ensayos posteriores. En las cepas PBlu 9 y PBlu12 que tenían el vector inducible por luz pUEblu1-lect, se observa que el sistema de expresión inducido en esta condición, operaba de forma correcta debido a que, en ambas cepas transformantes, en la condición de oscuridad, no había expresión de ninguno de los genes inducidos por luz ni de lectina y después de que fueron expuestas a luz el sistema de sobreexpresión se activó y se aprecian los transcritos de lectina y de genes inducidos por luz (Figura 29).

Después de verificar que el sistema de sobreexpresión inducible por luz trabaja de manera correcta en dos cepas transformantes, se sometió a la cepa PBlu 12 a 6 tiempos diferentes de exposición a luz, (0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h) para definir el punto de máxima expresión de lectina en medio PDA (Figura 30) y PDB (Figura 31). Se definió que el tiempo de exposición de 1 h fue el punto en que se expresó una cantidad mayor de transcrito de lectina.

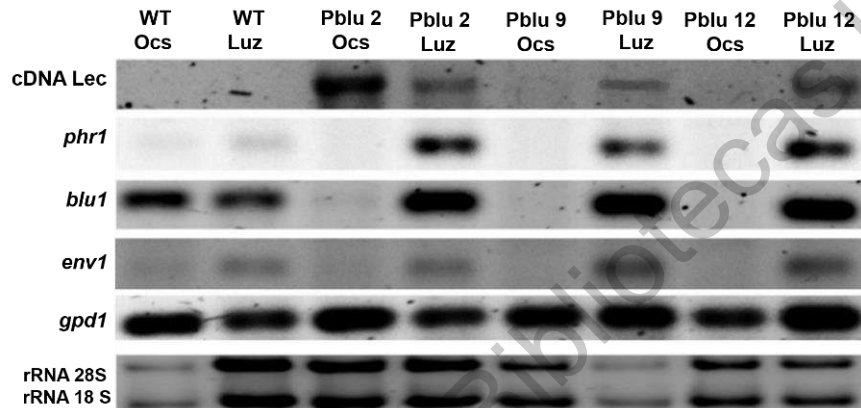


Figura 29. Expresión de lectina y genes regulados por luz azul en las cepas transformadas con el plásmido pUEblu1-lect. A partir de ARN total extraído de micelio de las cepas WT, Pblu 12, Pblu 9 y Pblu 2, crecidas en oscuridad (Osc) y expuesto a luz azul (Luz) por 1 h se sintetizó ADNc. A continuación, se amplificó mediante una reacción de PCR y los niveles de transcritos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd1*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu-1*, *env-1* y *phr-1*, lectina y 25 ciclos para *gpd1*.

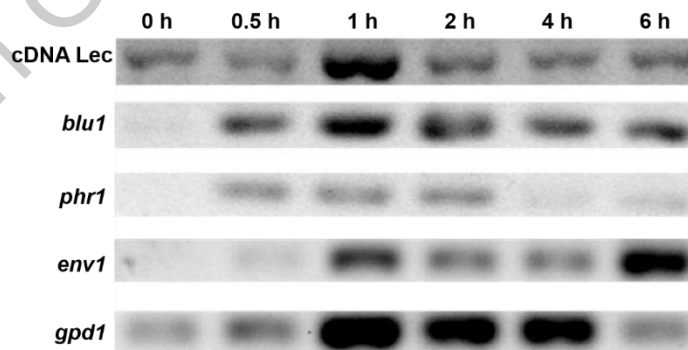


Figura 30. Cinética de expresión de la lectina inducida por la luz en la cepa transformante Pblu 12 de *T. atroviride* crecida en PDA. A partir de ARN total extraído del micelio de colonias, crecidas en placas de PDA en condición de oscuridad y después fueron sometidas a exposición de luz azul, se sintetizó ADN.

Posteriormente, el ADN se amplificó mediante una reacción de PCR y los niveles de transcritos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd1*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu-1*, *env-1* y *phr-1*, lectina y 25 ciclos para *gpd1*.

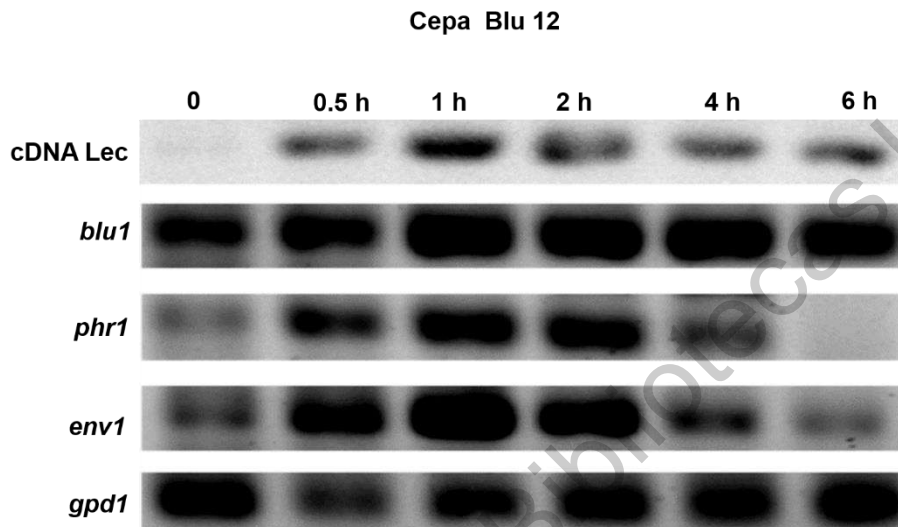


Figura 31. Cinética de expresión de la lectina inducida por la luz en la cepa transformante Pblu 12 de *T. atroviride* crecida en PDB. A partir de ARN total extraído del micelio, de esta cepa crecida en PDB, en condiciones de oscuridad y después de ser expuesta durante los tiempos indicados a la luz, se sintetizó ADNc y se amplificó mediante una reacción de PCR. Los niveles de transcritos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd1*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu1*, *env1* y *phr1*, lectina y 25 ciclos para *gpd1*.

VII.11 Expresión constitutiva de la lectina.

Para obtener el ADNc de la cepa transformante con el vector constitutivo, se creció la cepa en medio PDA durante 48 h y después se extrajo del micelio el ARN total. Se le dio un tratamiento con DNAsa para eliminar el ADN y después se hizo una reacción de retrotranscripción para obtener el ADNc, con este se hizo una reacción de PCR dirigida al gen que codifica la lectina con los oligonucleótidos Qlet -F y H6let-R, usando como templado el ADNc, el resultado de la PCR se analizó en gel de agarosa al 1%. Se observa que en la cepa con el vector constitutivo pUE10-lect se amplificó la lectina con un tamaño de 825 pb. (Figura 32)

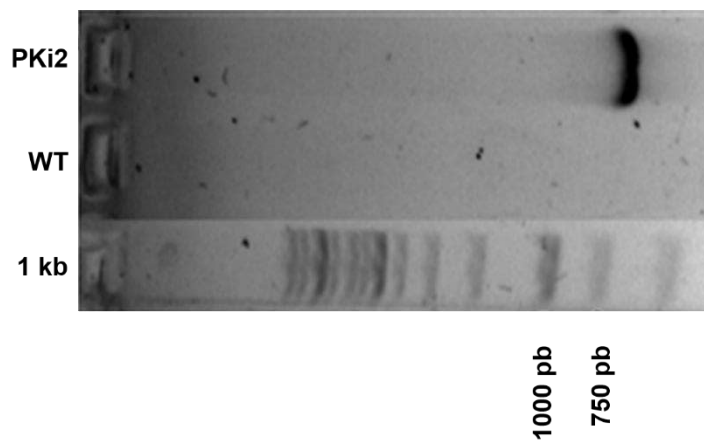


Figura 32. Expresión constitutiva en la cepa transformante PKi2. Carril 1. Cepa silvestre de *T. atroviride*. Carril 2. Amplificación de la lectina obtenido a partir de ADNc. Para estimar el tamaño de las bandas se usó el marcador de peso molecular de 1 Kb.

VII.12 Expresión de la lectina inducible por celulosa

Se analizó la expresión de diferentes genes mediante reacciones de retrotranscripción para conocer el nivel de expresión de la lectina en la cepa transformante con el vector que tiene el promotor que se induce con celulosa pUEcbh-lect, se utilizaron, el gen que codifica para la lectina, el gen de expresión constitutivo *gpd1* y el gen inducido por luz *blu1*. Los niveles de expresión de lectina se ven bajos en las primeras horas de inducción con celulosa, sin embargo, se nota claramente que mientras más tiempo se mantiene la condición de inducción hay una mayor expresión, y en la hora 8 se ve una mayor expresión.

El tiempo 0 h indica que el sistema no fue sometido a la condición de inducción, y por esto no expresó la lectina, esto indica que el sistema de expresión inducido por celulosa en los tiempos 1 h, 2 h, 4h, 6 h, y 8 h está operando de forma correcta debido a que, la cepa transformante, en celulosa a partir del tiempo 1 h comienza la inducción y presenta una débil expresión de lectina. También se observa que en los transcritos en los tiempos 2 y 4 se ve una mayor expresión de lectina, esto indica que el sistema de sobreexpresión se activa después de unos minutos, ya que se aprecian los transcritos de lectina solo en la condición en la que se da el estímulo de celulosa. (Figura 33). También es claro que conforme aumenta el tiempo de

inducción, la expresión génica va en aumento, hasta el tiempo de 8 h, donde la expresión es mayor.

Por otra parte, se hizo un ensayo para saber si los niveles de transcrito de la proteína alcanzaban su punto máximo en 8 hora o comenzaba a decaer en algún punto, para esto se utilizaron tiempos de análisis de expresión de 0, 4, 8, 12 y 24 horas. Los resultados muestran que en el tiempo 0 h, en el cual el sistema no fue sometido a la condición de inducción, no expresó la lectina, sin embargo, en los tiempos 4 h y sobre todo en el tiempo 8 h se ve una expresión muy clara de la lectina, igual que en el ensayo anterior, sin embargo, se puede observar que en tiempo 12 h aun continua la expresión, decayendo en al tiempo 24 h. Esto indica que el sistema de expresión inducido por celulosa está activo durante periodos prolongados. (Figura 34).

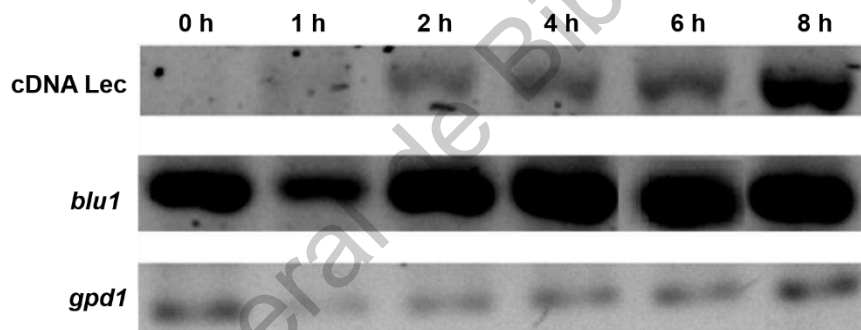


Figura 33. Cinética de expresión de la lectina en la cepa transformante PCbh1 13 de *T. atroviride*. A partir de ARN total extraído del micelio de la cepa crecida en medio mínimo Vogel con 2 % de glucosa por 48 horas, el micelio se colectó y se inoculó en Medio Mínimo Vogels con 1 % de celulosa. Los niveles de transcrito se analizaron mediante RT-PCR y separación de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd1*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu1* y lectina, *gpd1* se analizó a 25 ciclos.

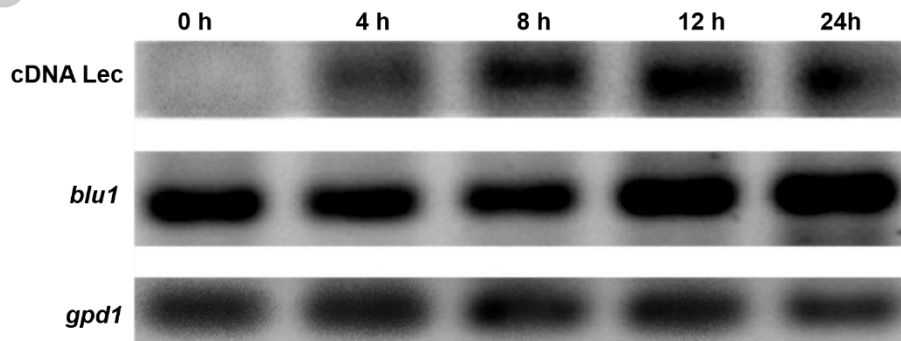


Figura 34. Cinética de expresión de la lectina en la cepa transformante PCbh1 13 de *T. atroviride*. A partir de ARN total extraído del micelio, la cepa se cultivó en Medio Mínimo Vogels con 2 % de glucosa por 48 horas, el micelio se colectó y se inoculó en Medio Mínimo Vogels con 1 % de celulosa. Los niveles de transcrito se analizaron mediante RT-PCR y separación de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd1*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu1*, lectina y 25 ciclos para *gpd1*.

VII Discusión.

La expresión heteróloga de proteínas en hongos filamentosos es una alternativa importante para producir mayor cantidad de proteínas o para generar cepas con capacidades que pueden ser utilizadas industrialmente. Además, se pueden cultivar en medios económicos, por lo que en la producción a gran escala se pueden reducir los costos.

La recombinación homóloga utilizada en este trabajo, facilita el análisis de las cepas transformadas obtenidas, por un lado, reduce en gran medida la variabilidad en la expresión génica y segundo evita el análisis de una gran cantidad de cepas transformantes. En este trabajo se construyeron 3 plásmidos, para construir el plásmido pUEcbh-lect se utilizó el plásmido pCB1004-T17 que tiene el terminador *blu 17* de *T. atroviride*, y para los plásmidos pUEblu1-lect, pUE10-lect se utilizó el plásmido pUE10 que también tiene el mismo terminador *blu17*. Esto permite la integración del vector en el genoma de *T. atroviride* en el terminador del gen *blu17*, que mejora la recombinación homóloga en este sitio, disminuyendo posibles variaciones en la producción de proteína entre diferentes cepas transformantes y no impide la expresión en el locus al cual se integra como fue previamente demostrado (Balcázar-López y col, 2016).

Los tres plásmidos generados, el inducible por luz pUEblu1-lect, el plásmido constitutivo pUE10-lect y el inducible por celulosa pUEcbh-lect, fueron analizados por restricción y secuenciación, para verificar que el casete fue correctamente construido. Se hicieron transformaciones en *T. atroviride*, las cepas transformantes fueron seleccionadas al azar, y mediante 3 pasos monospóricos, en condiciones selectivas, se obtuvieron las transformantes estables de *T. atroviride* con los tres

vectores utilizados. Esto concuerda con un trabajo (Gruber y col, 2012), en el que se transformó a *T. atroviride* y después de tres pases monospóricos igualmente se obtuvieron transformantes estables.

En ninguna de las cepas transformantes se observó alguna diferencia fenotípica importante creciendo en PDA, aunque el crecimiento fue más lento en la cepa con el vector pUE10-lect en este medio en comparación con los vectores pUEblu1-lect y pUE10-lect, en los cuales el crecimiento y el fenotipo no se vieron afectados. Esto es importante porque está indicando que el vector se integró por recombinación homóloga y no afectó ninguna otra función celular como fue previamente demostrado (Balcázar-López y col, 2016).

Las colonias que crecieron en el medio selectivo fueron solo 12 para el vector pUEcbh-lect y 4 para pUE10-lect. Para comprobar que los vectores se habían integrado al genoma a las 12 cepas que contenían el vector pUEcbh-lect, se les hizo una PCR para corroborar la presencia del casete de sobreexpresión, los oligonucleótidos que se usaron para amplificar la lectina fueron (Qlet -F y H6let-R). En el ADN genómico las cepas 2, 3, 8, 10 y 13 se amplificó la región codificante de la lectina, lo que indicó que el casete de sobreexpresión estaba integrado al genoma de estas cepas transformantes de *T. atroviride*. El mismo procedimiento se hizo a las 12 cepas transformantes generadas con el vector inducible por luz pUEblu1-lect, en las cuales se amplificó la lectina en las cepas 2, 9, 11, y 12 y en las 4 cepas transformantes que generadas con el vector constitutivo pUE10-lect solamente amplificó en la cepa 2. Para asegurar que tuviéramos transformantes estables, se hizo un pase monospórico mas a estas 11 cepas, y se les hizo otra reacción de PCR (Resultado no mostrado). En esta ocasión solo amplificaron en las cepas 2, 10 y 13 con el vector pUEcbh-lect, para el caso del vector inducible por luz, con el vector pUEblu1-lect, las cepas fueron 2, 9 y 12 y la cepa 2 con el vector constitutivo pUE10-lect. Los siguientes ensayos se hicieron con estas 7 cepas transformantes.

Las 7 cepas transformantes con los tres plásmidos generados, el inducible por luz pUEblu1-lect, el plásmido constitutivo pUE10-lect y el inducible por celulosa pUEcbh-lect, se analizaron por RT-PCR para detectar los transcritos de la lectina

usando oligonucleótidos dirigidos a la región codificante de la lectina. Los resultados obtenidos mostraron que en la cepa 2 que tiene el vector constitutivo pUE10-lect muestra una fuerte expresión, detectando una banda que corresponde al amplicón de la lectina.

Para el vector inducible por luz pUEblu1-lect, se hizo primero el análisis de expresión con RT-PCR para detectar los transcritos de la lectina. Se pudo constatar que en las 3 cepas transformantes expresan la lectina en cultivos crecidos en presencia de luz, demostrando de esta forma que el vector de expresión regulable por luz azul era funcional.

Se sabe que la exposición a luz azul de *T. atroviride* induce una respuesta rápida y sincronizada a nivel transcripcional, lo que indica que los niveles de transcrito comienzan a acumularse inmediatamente después del pulso de luz (Esquivel-Naranjo y col., 2007; Castellanos y col., 2010). Esto concuerda con los experimentos realizados con la cepa blu2, blu9 y blu12 en dos condiciones, una de obscuridad y con exposición a luz durante 1 h. En este experimento se observó como las cepas blu9 y blu12 en condiciones de obscuridad, no expresaron la lectina, en cambio con la foto inducción se detectaron altos niveles de transcrito de la lectina. La cepa blu2 se eliminó debido a que mostró altos niveles de transcrito de la lectina en oscuridad. Para determinar el tiempo de máxima expresión de la lectina foto-regulable, se realizó una cinética de expresión en PDA, detectando máximo nivel de transcrito a 1 hora y después disminuyendo a niveles basales, similar al perfil de expresión descrito para el gen *blu1* (Esquivel-Naranjo y col., 2007; Castellanos y col., 2010). En conclusión, estos resultados indican que la versión del promotor del gen *blu1* de una 1 kb tiene todos los elementos regulatorios en *cis*, necesarios para responder al estímulo luminoso. Considerando que la expresión inducible por la luz del gen *blu1* es dependiente del fotorreceptor Blr1/Blr2 y la vía de la MAPK Tmk3, sugiere que esos elementos en *cis* son necesarios para el reconocimiento de estos factores en *trans* y su consecuente activación transcripcional en respuesta a la luz.

El análisis de expresión de genes inducidos con luz azul siempre se ha desarrollado en medios sólidos, sin embargo, nuestro interés es utilizar este sistema de expresión

para la producción de proteínas de interés biotecnológico en fermentaciones en medios sumergidos. Para demostrar si el promotor del gen *blu1* se regula de forma similar en medio líquido, la cepa transformante 12 se creció en PDB en oscuridad durante 48 y posteriormente se expuso a la luz durante diferentes tiempos. Muy interesante fue la demostración de que los genes regulados por la luz azul son igualmente responsivos al estímulo luminoso en medio sumergido, alcanzando un nivel máximo de expresión durante 1 hora de fotoinducción, similar a la cinética de expresión determinada en PDA. Estos resultados indican que el sistema de expresión regulable con luz azul es prometedor para implementarlo en procesos biotecnológicos para la producción de biomoléculas en fermentación líquida.

El promotor de la celobiohidrolasa 1 *cbhl* ha sido considerado como el promotor más fuerte en *T. reesei* porque CBH I constituye hasta el 60% de las proteínas secretadas, y la expresión de mRNA del gen *cbh1* fue la más alta entre otros genes de celulasas estudiados (Rahman y col, 2008). El promotor *cbhl* es un promotor inducible por varios tipos de sacáridos, como la celulosa, soforosa y lactosa (Li y col, 2012). Cuando el promotor *cbhl* se usa para la expresión de proteínas, se debe agregar un inductor para activar la expresión de los genes diana, como en el caso del vector pUEcbh-lect. Primero se crecieron las cepas transformantes en Medio Mínimo Vogels con 1% de glucosa y, posteriormente, se colocó la biomasa generada en Medio Mínimo Vogels con 2% de celulosa para inducir la expresión de la lectina y poder determinar el momento en el que la lectina tenía un mayor nivel de expresión en la cepa transformante PCbh13, los tiempos probados fueron 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h. El resultado nos indicó que el tiempo de máximos niveles de transcrito fue de 8 h. Se ha descrito, en la literatura, que el tiempo requerido para la inducción de la transcripción de *cbh I* usando celulosa es de 14 h (Amore y col, 2013). Sin embargo, en gel de agarosa se puede ver que la expresión a las 8 h alcanza un nivel alto de expresión y va aumentando a medida que pasa el tiempo. Debido a esto, se decidió hacer otro experimento con periodos de tiempos más largos en el cual se analizaron los tiempos 4 h, 8 h, 12 h y 24 h en donde se observó que aun a las 12 h de inducción había una fuerte expresión de la lectina, pero en el tiempo 24 h, ya se ve esta expresión disminuida. En conclusión, estos resultados demuestran

que el sistema de expresión regulable por celulosa fue funcional en el hongo micoparásito *T. atroviride* y mostró una regulación similar a la descrita en el hongo celulolítico *T. reesei*, indicando que los mecanismos moleculares de percepción, señalización y regulación transcripcional impuestos por la fuente de carbono celulosa, son conservados en ambas especies de *Trichoderma*.

IX Conclusiones.

En este trabajo se demostró que se pudo expresar el mRNA mensajero que codifica lectina del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) en *Trichoderma atroviride* con los vectores generados, concluyendo lo siguiente:

La expresión constitutiva de la lectina en *T. atroviride* no tiene efectos negativos sobre el desarrollo del hongo como ocurrió con la sobreexpresión de ésta en plantas de frijol Tépari.

El sistema de expresión regulable por luz fue funcional, expresando la lectina, solo en presencia de luz indicando que en los 1000 pb de la región promotora del gen *blu1* están presentes todos los elementos regulatorios necesario para la fotoinducción.

Los genes regulados por luz muestran un perfil de expresión muy similar en medios sólidos o líquidos. Demostrando su utilidad en fermentaciones para la producción de proteínas de interés biotecnológico.

El sistema de expresión regulable por celulosa del hongo celulítico de *T. reesei* fue funcional en el micoparásito *T. atroviride* demostrando así conservación de mecanismos moleculares para detectar el inductor, la señalización y la regulación transcripcional.

El sistema de expresión regulable por luz ofrece una producción de proteínas heterólogas en tiempos más cortos comparado con el sistema de expresión regulable con celulosa.

X Perspectivas.

Será importante continuar con los esfuerzos para terminar con la caracterización molecular de los sistemas de expresión diseñados y construidos en esta investigación, enlistando los puntos de mayor relevancia.

Determinar los niveles de producción de la lectina en las transformantes para determinar el sistema de expresión más eficiente para la generación de proteínas de interés biotecnológico

Purificar la lectina para determinar su efecto citotóxico *in vitro* así como su efecto antitumorogénico *in vivo* en comparación con la FCL y la lectina recombinante obtenida en *Pichia pastoris*.

Optimizar la producción de lectina recombinante en el sistema propuesta a fin de cuantificar costos, tiempos de producción y rendimiento.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

XII Bibliografía.

Amore A., Giacobbe S., Faraco V. (2013). Regulation of Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in Fungi. *Current Genomics*. 230–249.

Aravind M., Ashok P., Rajeev K., S. (2017). Expression system for heterologous protein expression in the filamentous fungus *Aspergillus unguis*. *Bioresource Technology*. 245:1334-1342.

Balcázar-López E., Méndez-Lorenzo L.H., Batista-García R.A., Esquivel-Naranjo U., Ayala M., Kumar V. V., Savary O., Cabana H., Herrera-Estrella A., Folch-Mallol J. L. (2016). Xenobiotic Compounds Degradation by heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. *Plos One*. 11: 1-13.

Buyelab J.F. (2018). Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnology Advances*. 36: 506-520.

Cavada B. S., Osterne V.J. S., Lossio F. C., Pinto-Junior. R. V., Oliveira V. M., Silva L. M.T., Leal B. R., Nascimento S. K. (2019) One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 134: 901-911.

Castañeda-Cuevas A., Yllescas-Gasca L., López-Martínez J., Mendiola-Olaya E., Blanco-Labra A., Garcia-Gasca T. (2007). Efecto Antiproliferativo In Vitro de una Lectina De Frijol Tépari sobre Diferentes Tipos de Cáncer Humano. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 1-5.

Castellanos F., Schmoll M., Martinez P., Tisch D., Kubicek C.P., Alfredo Herrera-Estrella A., Esquivel-Naranjo E. U. (2010). Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and biology* 47:468-476.

Chávez-Mendoza C., and Sánchez E. (2017). Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules*. 2:1-32.

Conesa A., Punt J. P., Nicole L., Cees A.M.J.J.H. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*. 33: 155-171.

Dias R. O., Machado L. S., Migliolo L., Franco O. L. (2015). Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. *Molecules*. 20: 519-541.

Dan X., & Ng T. B. (2016). Two legume defense proteins suppress the mobility of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 3: 1328-1334.

Esquivel-Naranjo E.U. & Herrera-Estrella A. (2007). Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by blr-2 overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*. 153: 3909–3922.

González M. E., and Prisecaru I. V. (2005). Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 425–445

Fischer R., & Emans N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*. 19: 9279–299.

García-Gasca T., Salazar-Olivo L.A., Mendiola-Olaya E., Blanco-Labra A. (2002). The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology in Vitro*. 16: 229-233.

García-Gasca T., García-Cruz M., Hernandez-Rivera E., López-Matínez J., Castañeda-Cuevas A.L., Yllescas-Gasca L., Rodríguez-Méndez A. J., Mendiola-Olaya E., Castro-Guillén J. L., Blanco-Labra A. (2012). Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*. 64: 1269–1278.

Gardères J., Marie-Lise Bourguet-Kondracki., Hamer B., Batel R., Heinz C. S., Werner E. G. M. (2015). Porifera Lectins: Diversity, Physiological Roles and Biotechnological Potential. *Marine Drugs*. 13: 5059-5101.

Gomes A. R., Byregowda S.M., Veeregowda B. M., Balamurugan V. (2018). An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 4: 346-356.

Gómez S., López-Esteba M., Fernández J. F., Suárez T., Vega M. C. (2016). Alternative Eukaryotic Expression Systems for the Production of Proteins and Protein Complexes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 896: 167-184.

Jae-Hyuk Y., Hamarib Z., Kap-Hoon H., Jeong-Ah S., Reyes-Domínguez Y., Scazzocchiob C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 973–981.

Jiang Q.-L., Zhang S., Tian M., Zhang S.-Y., Xie T., Chen D.-Y., Chen Y.-J., He J., Liu J., Ouyang L., Jiang X. (2014). Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*. 48: 17–2.

Lagarda-Diaz I., Guzman-Partida A. M., Vazquez-Moreno L. (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Science*, 18: 1-18.

Li J., Wang J., Wang S., Xing M., Yu S., Liu G. Achieving efficient protein expression in *Trichoderma reesei* by using strong constitutive promoters. (2012). *Microbial Cell Factories*. 2-10.

Maheshwari R. (2006). Fungi as cell factories: Hype, reality and hope. *Indian Journal of Microbiology*. 46: 307-324.

Markku S. Tiina M. (2012). The cargo and the transport system: secreted proteins and proteins secretion in *Trichoderma reesei*. *Microbiology*. 158: 46-57.

Martínez-Alarcón D., Blanco-Labra A., García-Gasca T. (2018). Expression of Lectins in Heterologous Systems. *International Journal of Molecular Science*. 19: 1-16.

Pan W. L., Ng T. B. (2015). A dimeric *Phaseolus coccineus* lectin with anti-oxidative, anti-proliferative and cytokine-inducing activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 81: 960-966.

Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., Van den Hondel C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*. 20: 200-206.

Rahman Z., Shida Y., Furukawa T., Suzuki Y., Okada H., Ogasawara W., Morikawa Y. (2009). Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82: 899–908.

Sánchez-Arreguín A., Pérez-Martínez A. S., Herrera-Estrella A. (2012). *Proteomic Analysis of Trichoderma atroviride Reveals Independent Roles for Transcription Factors BLR-1 and BLR-2 in Light and Darkness*. *Eukaryotic Cell*. 11: 30 – 41

Sanz-Aparicio. J., Hermoso J., Grangeiro B. T., Calvete J. J., Cavada S. B. (1997) The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 200-206.

Satoshi W., Takayoshi A., Chiaki O., Akihiko K. (2017). Future insights in fungal metabolic engineering. *Bioresource Technology*. 245: 1314-1326.

Shida Y., Furukawa T., Ogasawara W. (2016). Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus. *Journal Bioscience. Biotechnology and Biochemistry*. 80: 1712-1729.

Silva O. V. J., Silva-Filho C.J., Queiroz S. M., Pinto-Junior V. R., Chaves A. A., Adolph Costa B. A. A. G., Wolin I. A. V., Machado N. A. P., Ferreira A. R. M., Matias R. B. A., Delatorre P., Shiniti N. C., Bairy L. R., Sampaio A. A. M., Santiago N. K., Sousa C. B. (2017). Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 94: 271-282.

Sun J., Pei Y., Li E., Li W., Hyde D. K., Wen-Bing Y., Liu X. (2016). A new species of *Trichoderma hypoxylon* harbours abundant secondary metabolites. *Scientific Reports*. 1-10

Suresh K., Vinay K. S., Savita Y., Sharmistha D. (2017). Antiproliferative and apoptotic effects of black turtle bean extracts on human breast cancer cell line through extrinsic and intrinsic pathway. *Chemistry Central Journal*. 11: 1-10.

Swiech K., Corrêa de Freitas M. C., Covas D. T., Picanço-Castro V. (2014). Recombinant Glycoprotein Production in Human Cell Lines. *Methods in Molecular Biology*. 1258: 223-240.

Tomoaki N. (2012). Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite *Leishmania tarentolae*: A Review. *Methods in Molecular Biology*. 824: 307-315.

Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in biotechnology*. 21: 570-578.

Unzueta U., Vázquez F., Accardi G., Mendoza R., Toledo-Rubio V., Giuliani M., Sannino F., Parrilli E., Abasolo I., Schwartz S., Tutino M. L., Villaverde A., Corchero J. L., 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: 5863–5874

Zambre M., Van Montagu M., Angenon G., Terry N. (2006). Protocols of *Agrobacterium*. Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*). *Methods in Molecular Biology*. 343: 407-414.