



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Maestría en Ciencias Biológicas

**Determinación del perfil de isoenzimas lacasa de  
*Pleurotus ostreatus* PoB cultivado sobre agar y  
clonación de fragmentos para silenciamiento de sus  
genes codificantes**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

**Leyda Cortés Maldonado**

Directora de tesis

Dra. Alba Mónica Montiel González

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2012





Universidad Autónoma de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Maestría en Ciencias Biológicas

**Determinación del perfil de isoenzimas lacasa de  
*Pleurotus ostreatus* PoB cultivado sobre agar y  
clonación de fragmentos para silenciamiento de sus  
genes codificantes**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

**Leyda Cortés Maldonado**

Comité Tutorial

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre de 2012

## **Hoja de Financiamiento**

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Este trabajo contó con el apoyo financiero otorgado por el fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT para el proyecto "Implicación fisiológica de la inactivación de genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* PoB sobre la morfogénesis y aprovechamiento de fuentes complejas de carbono" No. 167759.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03)



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Leyda Cortés Maldonado** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “**Determinación del perfil de isoenzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* PoB cultivado sobre agar y clonación de fragmentos para silenciamiento de sus genes codificantes**”.

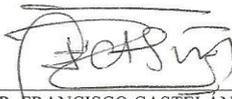
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., SEPTIEMBRE 3 DE 2012

  
DR. ARTURO ESTRADA TÓRRES

  
DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

  
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

  
DR. FRANCISCO CASTELÁN

  
DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:  
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)  
Tlaxcala, Tlax.

## **Agradecimientos**

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorga a lo largo de la Maestría con el número de registro: 329376 y número de beca: 36603.

Al Programa de Movilidad Estudiantil ECOES

A integrantes del cuerpo académico del Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa: Dr. Jaime Marcial Quino, Dr. Francisco Fierro Fierro, Francisco José Fernández Perrino, M en C Jérica C. Ramón y M en C Marisol Roldán Tapia; gracias por su tiempo, y apoyo pero sobre todo por el conocimiento aportado para lograr concluir este proyecto.

Al comité tutorial, Dra. Alba Mónica Montiel González, Francisco José Fernández Perrino y en especial al Dr. Arturo Estrada Torres por su aporte en el enriquecimiento del escrito.

## RESUMEN

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxido-reductasa, CE 1.10.3.2), son enzimas monoméricas extracelulares, pertenecientes a la familia de las fenoloxidasas que actúan sobre *p*-difenoles. Debido a la baja especificidad por el sustrato, pueden oxidar gran variedad de compuestos de origen natural e industrial. Hasta ahora se han identificado seis diferentes genes y sus correspondientes cADNs: *poxc*, *pox1*, *poxa1b*, *poxa3*, *pox3*, *pox4* y un pseudogen *pox5*.

En los hongos, inicialmente se pensaba que las lacasas eran producidas sólo para degradar fuentes complejas de carbono. Sin embargo, se han visto involucradas en la síntesis de melanina y la formación del cuerpo fructífero, patogénesis hacia las plantas, conidiación, esporulación, respuestas hacia el estrés, procesos de detoxificación, formación de primordios y rizomorfos. Aunado a lo anterior, se ha observado que en medio líquido con una fuente de carbono de fácil asimilación (glucosa), la producción de lacasas es superior comparada con la obtenida cuando el hongo se cultiva sobre fuentes complejas (paja de trigo), y que el número de isoformas cambia dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo. Por otra parte, de los basidiomicetos que se han secuenciado por completo, el hongo degradador de lignina *Phanerochaete chrysosporium* no posee genes *sensu stricto* de estas enzimas. En cambio, el hongo expresa una ferredoxina y varias multicobre oxidasas desconocidas. Por el contrario, pueden reconocerse varios genes de lacasa en basidiomicetes no degradadores de lignina *Coprinus cinereus* y *Laccaria bicolor*, con varios perfiles de expresión y funciones desconocidas. Con base en lo anterior la participación de las lacasas únicamente en la descomposición de la lignina es cuestionable.

Una estrategia para poder investigar la función de un gen es evitando o disminuyendo su expresión y determinando como es alterado el fenotipo del organismo en estudio durante su desarrollo. Una manera de evaluarlo es utilizando técnicas de biología molecular e ingeniería genética. El RNA de interferencia (iRNA) es una forma de silenciamiento génico pos-transcripcional en el que un RNA de doble cadena (dsRNA) origina la degradación de un mRNA homólogo, de este modo se reduce o suprime la expresión de un gen. El silenciamiento ofrece varias ventajas técnicas para la inactivación de un gen:

eficiencia en la recombinación homóloga, induce la supresión de genes en una secuencia específica pero no en un locus específico y principalmente la disminución de los niveles de expresión de un gen particular.

Sin embargo a pesar de las virtudes que ofrece la técnica antes mencionada, es primordial antes de llevarla a cabo, contar con los fragmentos específicos en secuencia y tamaño del gen que se desea silenciar para desarrollarla de manera exitosa.

En este trabajo, se logró realizar la evaluación del perfil de isoformas en *Pleurotus ostreatus* PoB, encontrando 3 de ellas tanto extra como intracelularmente, la estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de un gen de lacasa de la cepa *Pleurotus ostreatus* PoB, se obtuvo la secuencia de un fragmento (517pb) del gen amplificado y una colección de fragmentos de distintos tamaños del gen ligados a un vector de clonación para su posterior amplificación secuenciación y posible inserción en un vector de silenciamiento.

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 GENERALIDADES DE LOS HONGOS .....	1
1.2 LACASAS .....	3
1.3 EL GÉNERO <i>PLEUROTUS</i> .....	4
1.4 ¿PARA QUÉ PRODUCE LACASAS UN HONGO? .....	5
1.5 ¿CÓMO SABER PARA QUÉ SE UTILIZA UNA ENZIMA EN EL HONGO QUE LA PRODUCE?.....	6
1.6 INACTIVACIÓN GÉNICA .....	7
1.7 KNOCK-OUT .....	8
1.8 RNA DE INTERFERENCIA IRNA .....	9
1.8.1 Silenciamiento post-transcripcional, RNAs pequeños de interferencia (siRNA) .....	9
1.8.2 Estrategias de silenciamiento .....	11
1.8.3 Ventajas del iRNA.....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
5.1 GENERAL.....	24
5.2 PARTICULARES.....	24
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	25
6.1.1 <i>Pleurotus ostreatus</i> PoB.....	25
6.1.2 <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	25
6.1.3 Vectores .....	26
6.2 MEDIO DE CULTIVO. ....	26
6.2.1 Medio agar extracto de malta (EMA) .....	26
6.3 CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO .....	27
6.4 OBTENCIÓN DE BIOMASA.....	27
6.5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMÁTICO.....	27
6.6 EVALUACIÓN DEL PERFIL ENZIMÁTICO.....	27
6.7 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	29
6.8 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL .....	30
6.9 ELIMINACIÓN DE RNA Y DESPROTEINIZACIÓN DE ADN.....	31

6.10 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	31
6.11 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL PRODUCTO DE PCR.....	33
6.12 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS BANDAS OBTENIDAS.....	33
6.13 DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN.....	34
6.14 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LAS DIGESTIONES.....	34
6.15 LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AL VECTOR DE CLONACIÓN PJET1.2 BLUNT. ....	35
6.16 AMPLIFICACIÓN DEL VECTOR DE CLONACIÓN.....	36
6.17 GENERACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES .....	36
6.18 AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PJET1.2 BLUNT POR CHOQUE TÉRMICO .....	36
6.19 EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO (MINI-PREPS).....	37
6.20 ELECTROFORESIS.....	37
6.21 AMPLIFICACIÓN DEL GEN A PARTIR DE VECTOR PJET1.2 BLUNT.....	38
<b>6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
7.1 EVALUACIÓN DEL PERFIL DE ISOENZIMAS EXTRACELULARES .....	39
7.2 PERFIL DE ISOENZIMAS INTRACELULARES.....	40
7.3 AMPLIFICACIÓN A PARTIR DE ADN TOTAL.....	41
7.4 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA OBTENIDA.....	42
7.5 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL GEN Pox1 CON CLC GENOMICS WORKBENCH.....	43
7.6 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN EN GEL DE AGAROSA .....	46
7.7 RESTRICCIÓN PARA LA PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS A CLONAR.....	48
7.8 PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS A CLONAR .....	50
7.9 AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO CON LOS INSERTOS .....	50
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>53</b>
<b>8 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>54</b>
<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>58</b>

## Índice de figuras

Figura. 1 Proceso de silenciamiento post-transcripcional .....	11
Figura. 2 Estrategias de silenciamiento.....	12
Figura. 3 pJET1.2 Blunt.....	26
Figura. 4 Perfil de isoenzimas del cultivo 1.....	40
Figura. 5 Perfil de isoenzimas del cultivo 2.....	40
Figura. 6 Perfil de isoenzimas del cultivo 1.....	41
Figura. 7 Productos de PCR obtenidos con los primers O1'-Lac2.....	42
Figura. 8 Secuencia de nucleótidos obtenida.....	43
Figura. 9 Resultado del análisis de la secuencia obtenida en BLAST.....	43
Figura. 10 Análisis de restricción SmaI.....	44
Figura. 11 Análisis de restricción AluI.....	44
Figura. 12 Análisis de restricción PvuII.....	45
Figura. 13 Análisis de restricción BsuRI.....	46
Figura. 14 Análisis de Restricción con distinta endonucleasas.....	48
Figura. 15 Restricción con BsuRI.....	49
Figura. 16 Purificación de las bandas a clonar.....	50
Figura. 18 Producto de la amplificación con la digestión total.....	51
Figura. 17 Productos de la amplificación con fragmentos seleccionados.....	51

## Índice de tablas

Tabla. 1 Reactivos para el gel de separación 12%.....	28
Tabla. 2 Reactivos para el gel concentrador.....	29
Tabla. 3 Reactivos para PCR.....	32
Tabla. 4 Ciclo de PCR.....	32
Tabla 5 Cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa.....	33
Tabla. 6 Reactivos para ligación.....	35
Tabla. 7 Reactivos para amplificación del plásmido pJET1.2 Blunt.....	38
Tabla. 8 Ciclo de PCR para el plásmido pJET1.2 Blunt.....	38
Tabla. 9 Bandas obtenidas en la purificación.....	50

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de los hongos

El reino de los hongos es un grupo numeroso y diverso de organismos eucariotas que incluye alrededor de cien mil especies conocidas y probablemente un millón que aún no se han descrito. Además tienen un impacto enorme en las actividades humanas y en el funcionamiento de los ecosistemas. Los hongos son utilizados directamente como alimento y como grupo tienen roles ecológicos específicos:

(i) Son parásitos de animales y plantas: algunos hongos tienen ciclos de vida parasitaria y causan una gran cantidad de enfermedades en animales y seres humanos, tan es así que el tratamiento de infecciones fúngicas ha ganado atención pública debido al creciente número de pacientes inmunodeficientes. Además los hongos son el grupo más importante de patógenos en plantas, causando graves pérdidas en el rendimiento de los cultivos y su comercialización alrededor del mundo.

(ii) Son simbioses al formar micorrizas con las raíces de las plantas y endófitos como los líquenes de donde el hongo obtiene los carbohidratos de su hospedero fotosintético y a su vez él le proporciona iones minerales y agua. Se estima que más del 90% de las plantas terrestres tienen un hongo asociado con sus raíces y muchas de ellas no podrían sobrevivir sin la asociación.

(iii) Son saprótrofos, responsables de convertir la ligninocelulosa de las plantas en azúcares simples, oligosacáridos y sustancias húmicas en el suelo, por lo que son importantes en el ciclo del carbono, en particular en los sistemas forestales, donde las enormes cantidades de ligninocelulosa de árboles muertos (troncos) son biodegradados por basidiomicetos, específicamente por hongos filamentosos, causantes de la pudrición blanca y café (Nakayashiki, 2005 y Lundell y cols., 2010).

En cuanto a la utilización de sus productos derivados, podemos mencionar que, históricamente, estos organismos (macro y micro) han sido utilizados (generalmente cultivados a gran escala) para obtener productos comerciales o para realizar importantes transformaciones químicas. Posteriormente se desarrollaron metodologías para la producción de diferentes compuestos aprovechados hoy en día, tal es el caso de compuestos farmacéuticos (antibióticos), aditivos alimentarios (aminoácidos), enzimas y compuestos como butanol y ácido cítrico. Todos estos procesos microbiológicos se basaban en la potenciación de reacciones metabólicas que los organismos ya eran capaces de llevar a cabo con el fin, en la mayoría de los casos, de aumentar la producción del compuesto de interés (Prescot y cols., 2002). Además de compuestos que inciden en áreas como la farmacéutica o de alimentos, en los últimos años se han realizado diversos estudios dirigidos hacia la detoxificación de diferentes ambientes (agua y suelo) utilizando microorganismos como hongos y bacterias dotados con complejos enzimáticos capaces de degradar compuestos contaminantes presentes en dichos sistemas (Prescot y cols., 2002).

Los hongos de pudrición blanca pertenecen al grupo de los basidiomicetos, son microorganismos que degradan eficientemente la lignina debido su capacidad para producir distintas enzimas extracelulares involucradas en el proceso de biodegradación, éstas incluyen: lignino peroxidasa (LiP), peroxidasa dependientes de manganeso (MnP), lacasas y oxidasas que generan el  $H_2O$  necesaria para la actividad peroxidasa. (Muñoz y cols., 1997). Aunque efectivamente degradan lignina, los hongos no pueden utilizarla como fuente de energía, porque se asume que la degradan para tener acceso a la celulosa de la pared celular. (Gao y cols., 2010).

La maquinaria enzimática presente en los hongos de pudrición blanca les brinda la capacidad para degradar o mineralizar contaminantes orgánicos. Los compuestos químicos que son capaces de degradar estos organismos incluyen pesticidas, hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), bifenilos policlorados (PCB) y otros derivados halogenados aromáticos (entre ellos las dioxinas), algunos colorantes, productos químicos tóxicos como el cianuro, azida, tetracloruro de carbono y pentaclorofenol (PCP). Hasta la fecha los hongos más estudiados por su capacidad de degradación y su potencial uso en el

tratamiento de aguas residuales incluyen a: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus ostreatus*, entre otros (Gao y cols., 2010).

## 1.2 Lacasas

Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde finales del siglo XIX. Se encontraron por primera vez en la resina de *Rhus vernicifera*, un árbol japonés. Años más tarde se demostró que también se encontraban en hongos. A pesar de que se conocen desde hace mucho tiempo, las lacasas sólo llamaron la atención después de que se iniciaron los estudios acerca de la degradación enzimática de la madera realizada por los hongos de pudrición blanca (Baldrian, 2005).

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxido-reductasa, CE 1.10.3.2) son típicas enzimas monoméricas extracelulares pertenecientes a la familia de las fenoloxidasas, que actúan sobre  $p$ -difenoles. Tienen un sitio catalítico caracterizado por cuatro átomos de cobre unidos a tres sitios REDOX (T1, T2 y T3), con los que se une a cuatro electrones para reducir oxígeno a agua mientras oxida su respectivo sustrato (Kunamneni y cols., 2008).

Debido a la baja especificidad que dichas enzimas tienen por el sustrato, pueden oxidar gran variedad de compuestos de origen natural e industrial. Algunas aplicaciones potenciales incluyen el blanqueamiento de fibras en la industria del papel y textil, la conversión enzimática de intermediarios químicos, la transformación oxidativa de contaminantes ambientales como los colorantes, la degradación de fenilureas en suelo y un amplio intervalo de fenoles clorados.

Sin embargo, la producción de lacasas depende del organismo involucrado y las condiciones ambientales en las que se desarrolle, ya que no hay sólo un mecanismo para realizar la degradación y la maquinaria enzimática de los organismos es distinta; aunado a lo anterior, se requieren de grandes cantidades de enzima y las lacasas secretadas por los hongos típicos no son suficientes para propósitos comerciales. Por tal razón se han realizado numerosos estudios en los que se pretenden encontrar las condiciones y sustratos ideales para obtener las mejores actividades y concentraciones de enzima.

La familia de lacasas de *Pleurotus ostreatus* representa un grupo variado de enzimas, algunas de las cuales están dotadas con propiedades peculiares. La isoenzima POXC representa la lacasa más abundantemente producida por *Pleurotus ostreatus*. También secreta una lacasa blanca, la isoenzima POXA1w, que tiene un singular contenido metálico, una lacasa heterodimérica, la isoenzima POXA3 y POXA1b, notablemente estable a pH alcalino (pH 10). Estudios acerca de los genes que codifican lacasas hasta ahora han identificado seis diferentes genes y sus correspondientes cADNs poxc (Giardina y cols., 1996), pox1 (Giardina y cols., 1995), poxa1b (Giardina 1999), poxa3 (Palmieri y cols., 2003), pox3, pox4 y un pseudogen pox5 (Pezzella y cols., 2009).

### **1.3 El género *Pleurotus*.**

El género *Pleurotus* pertenece a los basidiomicetos de pudrición blanca. La habilidad del micelio de *Pleurotus* para crecer sobre materiales lignino-celulósicos se ha atribuido a la secreción de enzimas, principalmente lacasas, de las cuales se producen isoenzimas citoplasmáticas o extracelulares y son muy importantes en el sistema ligninolítico de estos hongos (Rajarithnam y Bano 1989).

*Pleurotus ostreatus* es el segundo hongo de pudrición blanca más cultivado después de *Agaricus bisporus*. Tiene un alto valor económico y ecológico y propiedades medicinales. Requiere un tiempo de crecimiento corto comparado con otros hongos. El sistema ligninolítico de las especies de *Pleurotus* está conformado principalmente por enzimas modificadoras de lignina (LMEs), lacasa, aril-alcohol oxidasas y dos tipos de peroxidasas: una dependiente de manganeso (MnP) y una peroxidasa versátil (VP). Todas estas enzimas pueden actuar de manera separada o en conjunto. Se ha sugerido que la peroxidasa versátil es un híbrido entre una manganeso peroxidasa y una lignino peroxidasa, basándose en su capacidad para degradar distintos sustratos en presencia o ausencia de  $Mn^{2+}$ , y en su estructura cristalina y molecular teórica (Tomer y cols., 2010).

#### 1.4 ¿Para qué produce lacasas un hongo?

En los hongos, inicialmente se pensaba que las lacasas eran producidas sólo para degradar fuentes complejas de carbono, básicamente la lignina de los sustratos naturales en donde se desarrolla. Sin embargo, también se ha visto que están involucradas en la síntesis de melanina y otros pigmentos en *Aspergillus nidulans* (Clutterbuck, 1972), la formación del cuerpo fructífero en *Lentinus edodes* (Gary y Stahmann, 1981) y *Coprinus congregatus* (Ross, 1982), la formación de los primordios en *Schizophyllum commune* (Vries y cols., 1986), la formación de rizomorfos en *Armillaria* sp. (Worral y cols., 1986), la patogénesis hacia las plantas en *Cryptonectria parasitica* (Ringlin y Van alfen, 1991) y *Botrytis cinerea* (Viterbo y cols., 1993), la conidiación, esporulación y las respuestas hacia el estrés y procesos de detoxificación (Mayer y Staples, 2002).

Aunado a lo anterior, se ha observado que en medio líquido con una fuente de carbono de fácil asimilación (glucosa), la producción de lacasas es superior comparada con la obtenida cuando el hongo se cultiva sobre paja de trigo y sobre espuma de poliuretano (soporte inerte) embebido en un medio con glucosa (Téllez y cols., 2008), pero no cuando se utiliza un sustrato biodegradable con composición distinta a la de la paja (cáscara de uva y mandarina), en donde se encuentran actividades mayores que las obtenidas en medio líquido (Stajic y cols., 2006).

Estos hechos dejan confusa la teoría planteada del por qué el hongo produce estas enzimas, por lo que aún no es posible predecir el comportamiento de las lacasas cuando se propone un nuevo medio de cultivo para producirlas. Adicionalmente, es un hecho que la producción de esta enzima está asociada con el crecimiento, tan es así que en los distintos estudios realizados en laboratorio, la producción de biomasa es también variable en función del medio de cultivo en el que se desarrolla (Mansur, 2003), no así la actividad de sus isoenzimas y el número de ellas. Esto podría sugerir de alguna manera que las lacasas participan en el proceso de asimilación de la fuente de carbono porque el número de isoenzimas y su actividad incrementan en presencia de glucosa en comparación con la presencia de otros carbohidratos.

La reciente secuenciación de genomas ha hecho obvio que las lacasas y los genes que codifican para multicobre oxidasas son similares en basidiomicetos y ascomicetos como *Aspergillus/Emericella* spp., *Trichoderma* spp. y *Fusarium (Gibberella)* spp., organismos capaces de descomponer la ligninocelulosa de las plantas. Los basidiomicetos de pudrición blanca que mostraron tener varios genes de lacasa pertenecen al género *Trametes* (Necochea y cols., 2005) y *Pleurotus* (Soden y Dobson, 2001, Pezzella y cols., 2009).

Sorprendentemente, de los basidiomicetos que se han secuenciado por completo, el hongo degradador de lignina *P. chrysosporium* no posee genes *sensu stricto* de estas enzimas. En cambio el hongo expresa una ferredoxina y varias multicobre oxidasas desconocidas (Larrondo y cols., 2003). Por el contrario, pueden reconocerse varios genes de lacasa en basidiomicetos no degradadores de lignina como *Coprinus cinerea* y *Laccaria bicolor*, con varios perfiles de expresión y funciones desconocidas (Kilaru y cols., 2006).

Con base en lo anterior, la participación de las lacasas únicamente en la descomposición de la lignina es cuestionable y su participación en las funciones antes reconocidas, como la formación del cuerpo fructífero, la formación de esporas, la pigmentación, se vuelven fisiológicamente más importantes (Lundell y cols., 2010).

Por estas razones podemos asegurar que a todos los niveles es importante conocer el papel fisiológico que juegan este tipo de moléculas dentro de los organismos, pues este conocimiento sentará las bases para que junto con otros estudios provea los elementos para la toma de decisiones cuando se pretenden obtener los metabolitos a gran escala o para generar conocimiento básico acerca de las rutas metabólicas que participan en la producción.

### **1.5 ¿Cómo saber para qué se utiliza una enzima en el hongo que la produce?**

A través de análisis genéticos, la función de los genes es evaluada analizando organismos en los que la función de los mismos ha sido alterada. En los estudios de genética clásica se seleccionan individuos que han sido tratados con mutágenos que inducen lesiones en el ADN y se eligen los mutantes con el fenotipo de interés. Después de que el mutante es

seleccionado, el gen mutado es identificado a través de técnicas moleculares clásicas. De esta forma estudios detallados del fenotipo del mutante acoplado con análisis moleculares de los genes permite la elucidación de su función (Ahringer 2006).

En la genética inversa el estudio de los genes comienza con la secuencia del gen de interés antes que con el fenotipo de una mutante. Utilizando diversas técnicas de ingeniería genética, la función de un gen es alterada y el efecto en el desarrollo o el comportamiento del organismo es evaluado (Ahringer 2006). En los hongos, la genética inversa nos permite descifrar los mecanismos moleculares que ocurren durante el desarrollo de los organismos (la esporulación, la geminación de las esporas, la morfogénesis), la nutrición fúngica (la toma de nutrientes como el fósforo) y las interacciones entre los hongos y las plantas hospederas (Bhadauria y cols., 2009). Aunado a lo anterior estas metodologías permiten investigar la función de todos los genes de una familia génica, algo que no se hace con facilidad con genética clásica (Ahringer 2006).

El creciente interés por la investigación en hongos filamentosos ha tenido avances importantes. En primer lugar, el desarrollo de varios sistemas de transformación ha incrementado el número de hongos filamentosos y la variedad de tejidos fúngicos susceptibles de ser manipulados genéticamente. En segundo, se han desarrollado y adaptado técnicas de mutagénesis al azar y mutación genética como herramientas eficientes para investigar la función de los genes en los hongos. En tercer lugar un número importante de genomas han sido secuenciados o están en proceso de secuenciación (Weld y cols., 2006).

## **1.6 Inactivación génica**

Una estrategia para poder investigar la función de un gen es evitando su expresión y determinando como es alterado el fenotipo del organismo de estudio. Varios métodos de genética reversa han sido utilizados para este fin, algunos de ellos son: Disrupción/reemplazo del gen objetivo (Knock-out), RNA de interferencia (Knock-down), mutagénesis insercional (Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*,

integración mediada por enzimas de restricción), TILLING (Targeting induced local lesions in genomes) por mencionar algunas (Weld y cols., 2006 y Bhaduria y cols., 2009).

### **1.7 Knock-out**

Uno de los métodos más eficientes para investigar la función de los genes es evaluando el fenotipo de las mutantes en los que un locus ha sido alterado por inserción o reemplazo por un ADN heterólogo. En esta metodología el gen es transformado con un cassette de disrupción hecho con secuencias del gen blanco y un marcador de selección. Posteriormente el cassette es insertado dentro del gen blanco por recombinación homóloga. Esta técnica puede ser utilizada para reemplazar parte de un gen endógeno con secuencias exógenas, por ejemplo la sustitución del promotor. Las transformantes recuperadas pueden contener cualquiera de las dos o ambas, ADN integrado por recombinación homóloga o por integración ectópica (Weld y cols., 2006).

Los knock-outs tienen gran importancia en la investigación genética, porque cuando se desactiva completamente la función de un gen específico se puede evaluar y entender cuál es su papel en el organismo que lo contiene. En la mayoría de los trabajos, esta técnica ha servido para evaluar genes asociados con enfermedades humanas, realizando la inactivación en ratones y ha servido también como modelo para entender el mecanismo patogénico de la misma enfermedad (Janeway y cols., 2003). Sin embargo la eficiencia del método depende del tamaño de la secuencia homóloga, el grado de homología, el método de transformación y la posición genómica del gen objetivo. En hongos filamentosos generalmente se requiere 1 Kb de secuencia homóloga y en ocasiones mucho más, aunado a lo anterior la recombinación homóloga en estos organismos es muy baja por lo que es necesario evaluar muchas transformantes para encontrar una que tenga la integración (Janeway y cols., 2003).

## **1.8 RNA de interferencia iRNA**

El RNA de interferencia (iRNA) es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional en el que un RNA de doble cadena (dsRNA) origina la degradación de un mRNA homólogo, de este modo se reduce o suprime la expresión de un gen. Esta técnica está basada en la generación de moléculas de dsRNA que actúan como molde para Dicer (una Ribonucleasa III) que origina cadenas de RNA pequeños (siRNA), estos siRNAs son incorporados dentro del complejo de silenciamiento RISC y sirve como guía para la secuencia específica de mRNA que se quiere degradar. Las formas más comunes involucran la introducción de RNA antisentido, dsRNA, transgenes sentido (también llamado co-supresión en plantas o supresión en hongos). iRNA es una importante herramienta no sólo para conocer la función de los genes, también para la identificación de genes esenciales en procesos de patogénesis (Agrawal y cols 2008).

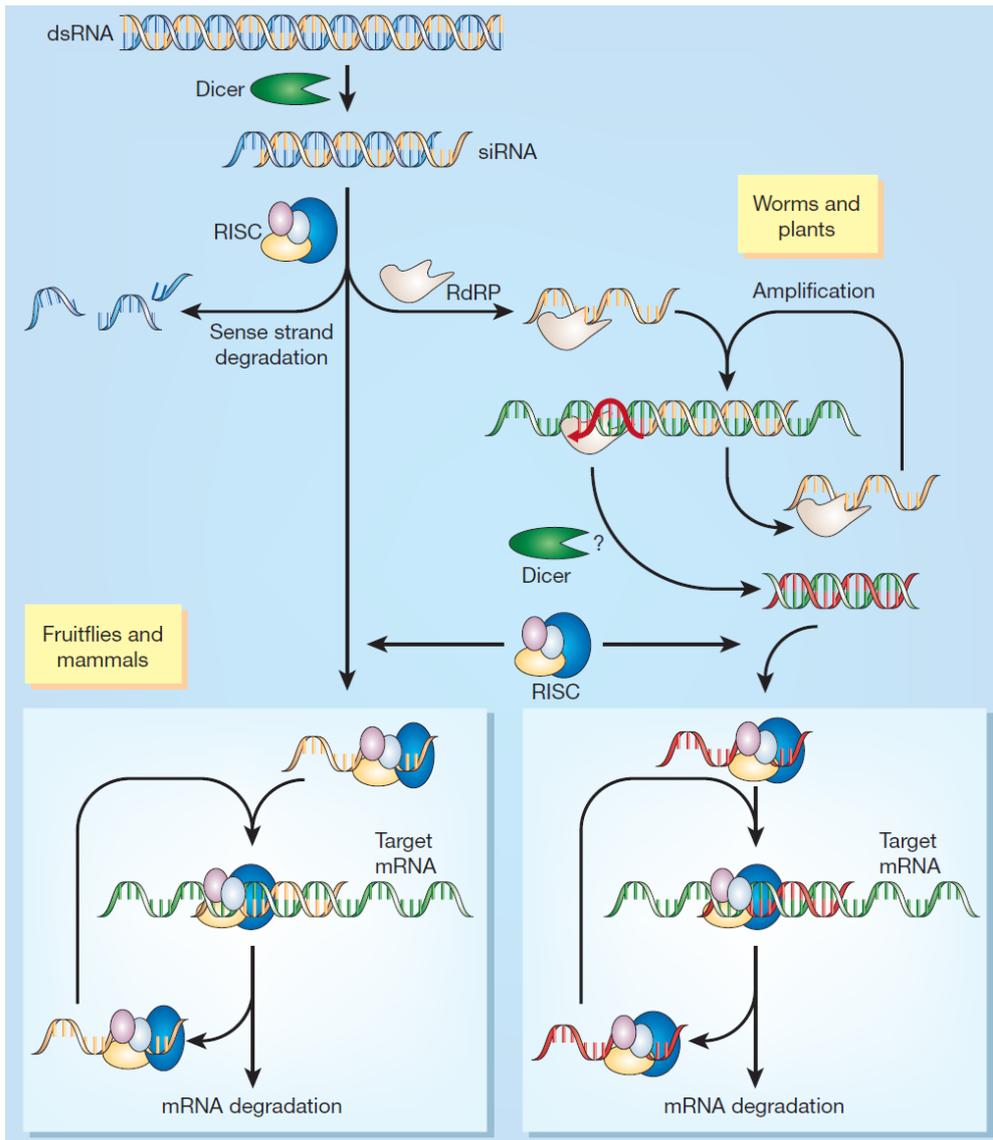
Se han identificado tres componentes fundamentales en la maquinaria de silenciamiento: Argonata, Dicer y un RNA dependiente de RNA polimerasa (RdRP); estos elementos han sido identificados en un amplio rango de hongos incluyendo ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos, en estos últimos algunas especies albergan varios componentes del silenciamiento en su genoma, mientras que algunos ascomicetos y basidiomicetos aparentemente carecen de la mayoría de los componentes de silenciamiento. Además de ser reconocido como uno de los mecanismos principales para controlar la expresión génica en eucariotes, la ocurrencia natural de este fenómeno ha sido aprovechada como una herramienta eficiente para elucidar la función génica (Agrawal y cols 2008).

### **1.8.1 Silenciamiento post-transcripcional, RNAs pequeños de interferencia (siRNA)**

La interferencia por RNA se inicia cuando una célula encuentra un dsRNA, que puede ser producido al introducir un transgen, una secuencia viral o un elemento genético. Una enzima llamada Dicer corta los dsRNA en siRNAs. Un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) distingue entre las diferentes cadenas de siRNA. La cadena sentido (azul) es degradada. La cadena antisentido (amarilla) es utilizada para el

silenciamiento de los genes objetivo, y tiene uno de varios destinos dependiendo del organismo. En las moscas de la fruta y mamíferos, la cadena antisentido es incorporada directamente dentro del complejo RISC y lo lleva directamente al mRNA complementario (verde) para su degradación. En la ausencia de siRNAs, RISC carece de una secuencia específica que pueda unirse al mRNA. Pero cuando se une a la cadena antisentido, el ahora RISC activado puede participar en repetidos ciclos para la degradación de mRNAs específicos, de manera que la proteína no se produce, por lo tanto, efectivamente el gen que origina el mRNA es silenciado. En gusanos y plantas, la cadena antisentido del siRNA puede primero ser utilizada en un proceso de amplificación (Novina y Sharp 2004).

La cadena antisentido, unida por RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP), puede unirse con un mRNA complementario (verde) y actuar como punto de inicio para la síntesis de nuevos dsRNA. Dicer después es requerida para generar siRNAs (rojo), específicos para secuencias distintas de un mismo mRNA. Nuevamente, el mRNA objetivo es degradado (Fig. 1).



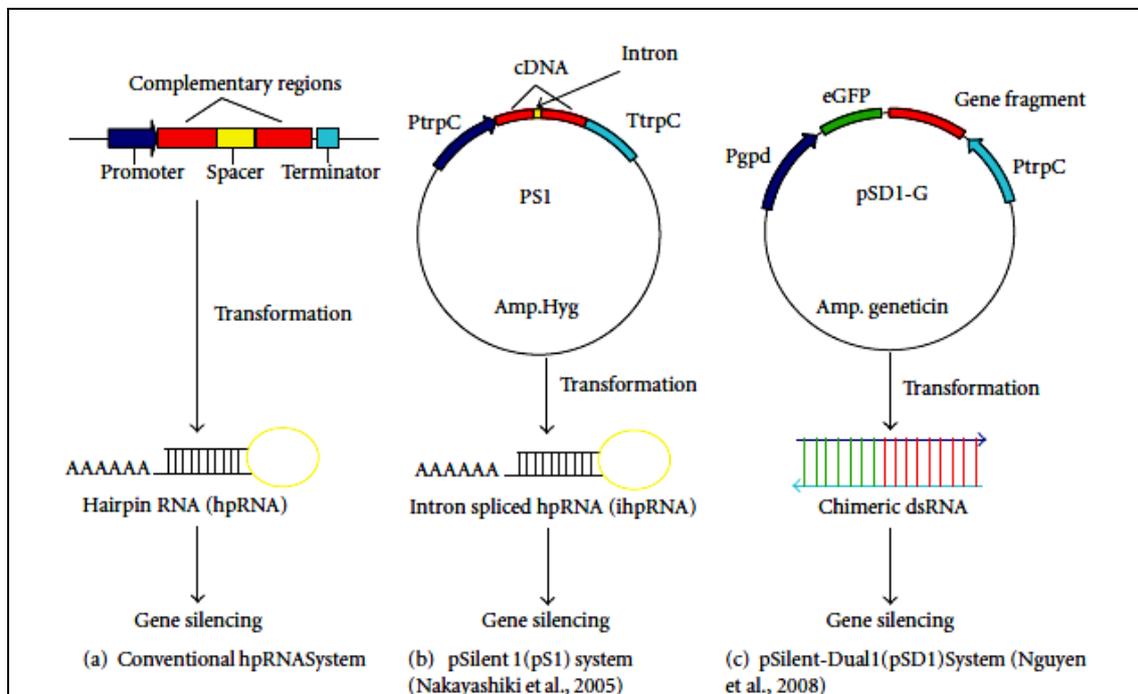
**Figura. 1** Proceso de silenciamiento post-transcripcional.

### 1.8.2 Estrategias de silenciamiento

- a) **hpRNA convencional.** Repeticiones invertidas de transcritos con bases complementarias o casi complementarias de 20-50 pb forman las horquillas con un tallo de doble cadena de RNA, estas dobles cadenas son procesadas a miRNA que intervienen la degradación del mRNA (Bhadauria y cols 2009).
- b) **pSilent1 (sistema de expresión de RNA heterólogo nuclear).** Contiene un cassette de resistencia a higromicina y una unidad transcripcional para la expresión de RNA

de horquilla con un sitio de clonación múltiple y la secuencia de un intrón como espaciador (Bhadauria y cols 2009).

- c) **pSilent-Dual system (sistema de dos promotores opuestos)** los promotores *trpC* y *gpdA* fueron clonados de manera convergente separados por un sitio de clonación múltiple. Para co-silenciamiento, un fragmento de eGFP de 0.41Kb fue insertado en pSD1, teniendo como resultado pSD1-G. Fragmentos de alrededor de 500pb pueden ser insertadas en el vector pSD1, que expresarán la correspondiente quimera de doble cadena de RNA, como templado para la degradación del mRNA homólogo (Figura 2) (Bhadauria y cols 2009).



**Figura. 2** Estrategias de silenciamiento.

### 1.8.3 Ventajas del iRNA

Comparado con las estrategias convencionales de inactivación, el silenciamiento con RNA tiene ventajas potenciales. La ventaja más grande del silenciamiento es su aplicabilidad para regular la expresión génica (Agrawal y cols 2008).

La eficiencia de la recombinación homóloga varía entre especies. La mayoría de los hongos tienen hifas multicelulares o multinucleadas y algunos de ellos tienen dos o más núcleos genéticamente diferentes en un citoplasma común (heterocariotes), esta característica hace que la inactivación del gen objetivo sea complicada e ineficiente con métodos convencionales. El silenciamiento con RNA es independiente del locus y está mediado por señales en el citoplasma, razón por la cual puede ser aplicado en hongos con baja eficiencia del gen objetivo o incluso en especies de zigomicetos que tienen hifas tubulares con varios núcleos dentro de la célula. Segundo, el silenciamiento por RNA permite flexibilidad en experimentos de inactivación génica, ya que induce la supresión de genes en una secuencia específica pero no en un locus específico. Por ejemplo, el silenciamiento de genes homólogos o incluso genes heterólogos se ha demostrado utilizando una secuencia conservada de una familia de genes o con la construcción de una secuencia quimérica derivada de varios genes. El silenciamiento con promotores inducibles o el silenciamiento transitorio por siRNA permiten la expresión de un gen en una etapa específica durante el desarrollo del organismo o como éste afecta diferentes partes del organismo. Además se ha demostrado que el silenciamiento puede ser utilizado como alternativa para degradar específicamente los mRNA con splicing alternativo en células cultivadas de *Drosophila* (Bhadauria y cols 2009).

Estudios como los mencionados anteriormente no pueden realizarse con estrategias de eliminación ya que eliminan el gen de interés de manera permanente. Por lo tanto el silenciamiento ofrece varias opciones para la inactivación de un gen. Finalmente el silenciamiento puede ser utilizado para el análisis de genes letales ya que en muchos casos sólo induce la disminución de la actividad, pero no la inactivación por completo (Schmidt 2005).

La función de varios genes esenciales en procesos biológicos de los organismos que los contienen aún se desconoce. La disminución de los niveles de expresión de un gen particular permitirá elucidar su función en diferentes fenómenos biológicos. Por tal razón consideramos que la posibilidad de incidir en la expresión génica de *Pleurotus ostreatus* por manipulación genética es una herramienta invaluable para el análisis de la funcionalidad de las lacasas en la morfología en este hongo.

## 2. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios y hay muchas revisiones acerca de las lacasas que explican muy bien la enzimología, mecanismos de transferencia de electrones, cinética, mecanismos de acción, la relación con otras enzimas, sus múltiples utilidades y su posible participación en la fisiología del organismo que las produce. Muestra de lo anterior es el trabajo realizado por Mansur (2003), que caracterizó las actividades de cuatro isoenzimas de lacasa secretadas por la cepa V-184 de *Pleurotus ostreatus* en dos medios de cultivo: medio completo y medio sintético. Los picos de actividad de lacasa en medio completo se obtuvieron en el día 5 con  $310 \text{ mUmL}^{-1}$ , después del día 5 los niveles de actividad de la enzima disminuyeron a  $30 \text{ mUmL}^{-1}$  coincidiendo con la disminución de los valores de pH de 6 a 4. En medio sintético se obtuvieron mejores actividades a pH 6.5 que a 4.5. Las isoenzimas secretadas por el hongo en los sustratos fueron distintas, en guanicol se observaron LCC1 y LCC2 con un peso molecular de 60 y 65 kDa y en ABTS LCC3 y LCC4 con peso molecular de 80 y 82 kDa. Estos resultados indican que la actividad de las lacasas y la producción de sus isoenzimas está relacionada con el pH del medio y el sustrato en el que el hongo se desarrolla, también que otro mecanismo puede gobernar la producción de la actividad de las lacasas durante la fase de crecimiento exponencial, especialmente cuando esta actividad parece estar estrechamente relacionada con la producción de biomasa.

Stajic y cols. (2005) evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (cáscara de mandarina y uva) bajo dos condiciones de cultivo, fermentación sumergida y fermentación sólida, sobre la producción de lacasas y peroxidasas en *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*. Para el caso de la cepa 493 de *P. ostreatus* los niveles más altos de actividad lacasa fueron observados en fermentación sólida sobre cáscara de uva después de 10 días de cultivo ( $2144 \pm 57.8 \text{ UL}^{-1}$ ) y el nivel más bajo se observó en fermentación sumergida con cáscara de mandarina como fuente de carbono al quinto día de cultivo ( $3.1 \pm 0.1 \text{ UL}^{-1}$ ). *Pleurotus ostreatus* 494 mostró la más alta producción de lacasas en fermentación sólida ( $378 \pm 32 \text{ UL}^{-1}$  después de 7 días de cultivo), los niveles de lacasa también fueron altos en fermentación sumergida con cáscara de

mandarina a los 5 días de cultivo ( $256 \pm 149 \text{ UL}^{-1}$ ). Esta investigación reafirma que la producción de lacasas depende de la cepa de *P. ostreatus* utilizada en el estudio, las condiciones de cultivo (fermentación sólida o fermentación líquida), la fuente de carbono y la concentración de la misma.

Tlecuitl-Beristain y cols. (2007) evaluaron la producción de lacasas durante la fase logarítmica, exponencial y estacionaria de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. En este estudio la tasa de crecimiento específico fue  $0.002 \text{ h}^{-1}$  y la cantidad más alta de biomasa en peso seco ( $7.8 \text{ gL}^{-1}$ ) se obtuvo después de las 480 h de crecimiento. Cuatro isoenzimas fueron secretadas por el hongo durante la fermentación L<sub>1</sub>1, L<sub>1</sub>2, L<sub>1</sub>3 y L<sub>1</sub>4. De ellas L<sub>1</sub>2, L<sub>1</sub>3 y L<sub>1</sub>4 fueron producidas durante la fase estacionaria (entre las 408-456 h aproximadamente). L<sub>1</sub>1 fue producida durante la fase logarítmica, exponencial y estacionaria de crecimiento. La actividad máxima de lacasa ( $12\,200 \text{ UL}^{-1}$ ) se observó en el comienzo de la fase estacionaria (a las 432 h de crecimiento).

Téllez y cols. (2008) evaluaron la actividad de lacasas y proteasas de *Pleurotus ostreatus* producidas en fermentación líquida y sólida, la actividad de lacasas se evaluó utilizando 2-6 dimetoxifenol como sustrato y la actividad de proteasas con caseína como sustrato. La biomasa máxima obtenida por FML fue 1.5 veces mayor que la obtenida por FMS ( $8.6$  y  $5.6 \text{ gL}^{-1}$  respectivamente), sin embargo, la velocidad específica de crecimiento fue 2.5 veces mayor en la FMS que en la FML ( $0.05$  y  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente). La actividad de lacasas fue de  $13,000 \text{ UL}^{-1}$  en fermentación líquida y de  $2430 \text{ UL}^{-1}$  en fermentación sólida.

Mansur y cols. (2003) mostraron que usar fructosa en vez de glucosa incrementa 100 veces la especificidad de la actividad lacasa de los basidiomicetos. De acuerdo con (Stajic y cols., 2005, las enzimas ligninolíticas son producidas durante el metabolismo secundario bajo condiciones limitadas de nitrógeno. Sin embargo en *Pleurotus ostreatus* una alta concentración de N en el medio no reprime, sino estimula la mineralización de la lignina comparado con un medio con N limitado). Estos estudios muestran que el tipo de compuesto que funge como fuente de carbono en el medio de cultivo juega un papel importante en la producción de enzimas ligninolíticas.

Otros estudios dirigidos a la comprensión de los mecanismos de degradación de la lignina por hongos han puesto de manifiesto la complejidad de los sistemas enzimáticos, porque hay más de una ruta de acceso a la degradación de la lignina y la maquinaria enzimática entre microorganismos es diferente (Mansur y cols., 2003). Sin embargo no hay suficientes datos que hablen acerca de su estructura que permitan entender los mecanismos de oxidación y especificidad (Bertrand y cols., 2002).

En este sentido, la determinación de la estructura cristalográfica es una herramienta para el estudio de la relación que hay entre la estructura y la función, sin embargo, pocas estructuras de lacasas activas han sido publicadas, una de ascomicetos *Melanocarpus albomyces* (Bertrand y cols., 2002), dos de basidiomicetos *Trametes versicolor* y *Rigidosporus lignosus*, y otras de *Bacillus subtilis*; basados en estas estructuras, en la última década la zona catalítica de cobre ha sido sujeto de mutagénesis para determinar los parámetros que definen la actividad catalítica y la  $E^\circ$  de las lacasas fúngicas (Palmer y cols., 2003). Una consecuencia del entendimiento de la función de esta estructura ha sido la generación de una colección de mutantes con perturbaciones en su estructura en el centro a cobre T1.

Recientemente, el papel de las lacasas ha sido reevaluado ya que nueva información acerca de los mecanismos de biodegradación han sido obtenidos en diferentes especies de hongos. Aún más, se ha visto que algunos géneros de basidiomicetos como *Pleurotus* spp. carecen de lignina peroxidasas, indicando que enzimas distintas están probablemente implicadas en la degradación de la lignina y que entre estas enzimas, las lacasas podrían desempeñar un papel clave. Los estudios sobre las enzimas secretadas por *Pleurotus ostreatus* han demostrado, por ejemplo, que la acción concertada de la lacasa y el aril-alcohol oxidasa produce una reducción significativa en la masa molecular de los lignosulfonatos solubles (Mansur y cols., 2003).

Una herramienta muy útil dentro de la biotecnología, que permite obtener grandes cantidades de la proteína de interés para uso industrial (por ejemplo, insulina) o para realizar estudios estructurales de la proteína, es la sobreexpresión del gen que la codifica. La sobreexpresión de genes es uno de los métodos que ayuda a determinar la función de un

gen en un organismo. El objetivo de estos experimentos, es observar cualquier cambio fenotípico asociado con el cambio de la expresión del gen de interés. Los cambios fenotípicos son interpretados y la función del gen nativo es deducida basada en las vías bioquímicas que se han alterado en los transformantes. Un requisito para llevar a cabo la sobreexpresión es conocer la secuencia o haber clonado un fragmento del gen de la proteína de interés (Lloyd, 2003). Otras posibles metodologías que permiten mejorar los niveles de expresión es mediante la utilización de sistemas de expresión homóloga o heteróloga del gen de interés Hoshida y cols., (2001). Por ejemplo muchos genes de lacasa y cADN de basidiomicetos han sido clonados en ascomicetos, algunos de ellos fueron expresados y secretados por *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus oryzae* o *Trichoderma reesei* Hoshida y cols., (2001).

Varios métodos han sido descritos con el fin de expresar de manera exitosa los genes de lacasas de basidiomicetos en hospederos fúngicos o en levaduras Rodríguez y cols. (2008). Referente a esta metodología expresaron dos genes de lacasa (pel3) de *Pleurotus eryngii* en una cepa de *Aspergillus niger* bajo distintas condiciones de cultivo, concentraciones de glucosa y PVP (polivinilpirrolidona). Las cepas transformadas mostraron bajos niveles de actividad lacasa en medio líquido con pH 6.2. Las mejores condiciones para la producción de lacasa se obtuvieron con un pH de 6.2, y cuando se agregaron 100g/L de glucosa y 20g/L de PVP. En este estudio se pudo observar nuevamente que la expresión de las lacasas está fuertemente influenciada por las condiciones del medio de cultivo. La presencia de PVP, que afecta la viscosidad del medio, y un pH inicial bajo producen cambios en el crecimiento del hongo, transformando los pellets en micelio disperso e incrementa la actividad extracelular de estas enzimas (Rodríguez y cols. 2008).

En la aplicación de técnicas que nos permitan conocer la participación de un gen en la fisiología de un organismo, la sobreexpresión si nos puede hablar acerca de la funcionalidad del gen, sin embargo, el silenciamiento del gen nos puede dar indicios más certeros de su participación al evitar que se genere el producto génico o disminuyendo su producción, por lo que es una vía más factible para realizar este tipo de evaluaciones (Herrera 2005).

Wälti y cols. (2006) probaron la aplicabilidad del silenciamiento por la expresión de horquillas de RNA homólogas en *Coprinus cinereus*. Para probar si el silenciamiento podía

ser aplicable en genes endógenos, partieron del gen *cgl2* que codifica para dos isogalactinas, *CGL1* y *CGL2*, que son altamente inducidas durante la formación del cuerpo fructífero. Diseñaron una construcción en la que el tallo de la horquilla consistía en una región con repeticiones en tándem de 9 pb en la región espaciadora del vector comercial pSilencer, ubicada río arriba de una copia invertida de toda la región codificante del gen *cgl2* (711 pb), entre el último codón y el codón de paro. La horquilla *cgl2* resultante estuvo bajo el control del promotor de gen *cgl2* endógeno que comprende la región intergénica entre *cgl1* y *cgl2* y el gen *pab1* como marcador de selección. Debido a la alta similitud en las secuencias de los genes *cgl1* y *cgl2* a nivel de ADN (87% de similitud de las regiones codificantes), esperaban tener el silenciamiento simultáneo de ambos genes con la construcción. Los resultados mostraron que los genes *cgl1* y *cgl2* fueron altamente silenciados en algunas transformantes (6) y eficientemente en una de las transformantes que estaban en la etapa de micelio fructificante. Sin embargo, en etapa de primordios 10 de los 14 transformantes analizados que tenían el cassette de silenciamiento mostraron silenciamiento eficiente de ambos genes. No se observaron cambios significativos en los niveles de proteína en algunos de los transformantes que contenían el cassette de silenciamiento. *CGL3*, una proteína que también es inducida durante la formación del cuerpo fructífero pero con sólo 53 % de similitud en su secuencia de la región codificante a *cgl2*, no fue afectada por la horquilla de RNA de *cgl2*. Al evaluar el fenotipo de las transformantes durante todo el desarrollo del cuerpo fructífero, ninguno de ellas mostró alguna diferencia morfológica ni de tiempos de desarrollo comparada con la cepa nativa. El número y viabilidad de las basidiosporas producidas por los cuerpos fructíferos de las transformantes silenciadas fueron normales, lo que sugiere que *CGL1* y *CGL2* no son necesarios, al menos en las etapas finales del desarrollo del cuerpo fructífero de *C. cinereus*. Sin embargo es posible que las galactinas estén involucradas en las primeras etapas de la formación del cuerpo fructífero, ya que sólo en una de las transformantes analizadas *cgl1* y *cgl2* fueron silenciadas eficientemente en esta etapa.

Jong y cols. (2006) determinaron si hay un mecanismo de iRNA en *Schizophyllum commune* y construyeron una horquilla de RNA con el gen *SC15*. Este gen codifica una proteína de 17-kDa involucrada en la formación de las hifas aéreas y la adhesión en ausencia de la proteína *SC3*. La construcción tiene un fragmento del cADN del gen *SC15*

que comprende la región que ese encuentra entre el 5' de inicio de la región no transcrita. El fragmento fue clonado en orientación inversa después del codón de paro de SC15 en el plásmido pSC15gspz. La construcción de la horquilla resultante, pSC15hp, codifica el mRNA de SC15 con un tallo de 334 nucleótidos y una horquilla de 333 pb y el gen de resistencia a fleomicina. De las 34 transformantes obtenidas, 27 produjeron menos proteína que la cepa silvestre. La baja cantidad secretada de SC15 por los transformantes estaba acompañada de una importante reducción en la acumulación de mRNA de SC15. Las transformantes obtenidas fueron cruzadas con la cepa FL1 que expresa una copia del gen endógeno SC15 y la fusión de SC15 y GFP. La fluorescencia de GFP en los dicariones se redujo significativamente en comparación con los dicariones formados por los núcleos de las cepas FL1 y 4-39 silvestre. La intensidad de la fluorescencia correspondió con los niveles de mRNA de la fusión SC15:GFP. No se detectó mRNA de SC15 en los dicariones que expresaron pSC15ph en uno sólo de sus núcleos parentales, debido a que el silenciamiento fue ocasionado por la introducción de múltiples copias como lo reportan otros estudios, lo que sugiere que hay dos mecanismos distintos de silenciamiento en *S. commune*.

Keiko y cols. (2010) silenciaron el gen *Lcc1* de *Lentinula edodes* SR-1 con una secuencia repetida invertida de 40 pb y fue transformada con dos vectores de expresión, pChG'-ivrL1 que contiene una secuencia homóloga repetida invertida de 40 pb del exón 1 en secuencia sentido y antisentido separados por una secuencia de 60 pb del intrón 2 del gen *Lcc1* y pChG'-cL1a que contiene una secuencia antisentido del mRNA del gen *Lcc1*. Ambos vectores tienen como promotor el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gdp*). La transformación fue realizada con el método de integración mediada por enzimas de restricción (REMI).

Los resultados mostraron que la actividad lacasa en el organismo estudiado se incrementó el día 14 y tuvo el pico de actividad el día 21 durante el cultivo en medio líquido. La actividad lacasa disminuyó en más del 95% en once cepas de ivrL1 y nueve de cL1a. En dos de las once cepas de ivrL1, la secreción de *Lcc1* disminuyó en más de 95% con relación al control. En cuatro transformantes de cL1a, la secreción disminuyó sólo en un 50% comparado con el control. Los niveles de transcripción en siete de las once

transformantes seleccionadas para *ivrL1* se redujeron menos del 50% y en dos cepas se redujo por completo comparado con el control. En seis cepas de *cL1a* los niveles de expresión disminuyeron menos del 50%, con el nivel más bajo de expresión de 20.8%.

En cuanto a los efectos sobre la morfología miceliar, en SR-1 el micelio aéreo surgió entre los 10 y 14 días y la densidad miceliar se incremento a los 20 días. Una de las transformantes que no mostró transcripción no formó micelio aéreo después de 40 días, con una densidad miceliar baja, ramificaciones muy pequeñas y diferencias en el grosor y número de capas de la pared celular, lo que sugiere que la función biológica de *Lcc1* está relacionada con la adhesión celular. La introducción de un vector de expresión con secuencias homólogas invertidas repetidas (*ivrL1*) resultó ser más efectivo para suprimir la expresión de *Lcc1* que el uso de un vector de expresión antisentido en *L. edodes*.

Tomer y cols. (2010) realizaron el silenciamiento del gen *mnp3* que codifica a una peroxidasa dependiente de manganeso en *Pleurotus ostreatus* PC15, una cepa monocariote, para evaluar su implicación en la degradación del colorante Orange II. La transformación fue realizada con el vector pTMS1. La construcción se basó en el silenciamiento de *mnp3* y fue diseñada para expresar una sola cadena de RNA que forma una horquilla, correspondiente a la cadena antisentido de 100-1 pb del cADN de *mnp3*, y un tallo de doble cadena correspondiente a 750-101 pb del cADN de *mnp3* antisentido alineado a 101-750 pb de la cadena sentido de *mnp3*. La secuencia estuvo bajo el control del promotor y terminador *sd11* y un cassette de resistencia a carboxina. Lograron aislar treinta transformantes, todas mostraron gran variabilidad en su capacidad de decoloración y crecimiento. Al determinar si la alteración en los niveles de transcripción de la familia de genes de MnP estaban relacionados con los cambios en los niveles de decoloración, se observó que la intensidad de la expresión varió en respuesta a la cantidad de  $Mn^{2+}$  agregado al medio, excepto para los genes *mnp3* y *mnp9* que no fueron afectados en el tratamiento sin  $Mn^{2+}$ , pero fuertemente inhibidos en el tratamiento con  $Mn^{2+}$  de 24 a 79 veces más alta que el control. El *mnp4* no fue afectado en el tratamiento sin  $Mn^{2+}$  (menos del doble), sin embargo en el tratamiento con  $Mn^{2+}$  fue de 8 a 24 veces más alta. Estos resultados muestran que el silenciamiento no necesariamente afecta a todos los miembros de una familia génica.

Marcial(2011) realizó la construcción del plásmido pGpdPki-RNAi y el silenciamiento de aspartato proteasas en *Amylomyces rouxii* con insertos de tamaños distintos 910pb, 455pb y 412pb clonados en dicho vector. Los resultados mostraron un mayor número de transformantes con el fragmento de 412pb (39) en comparación con el fragmento de 455 pb (23) y el de 910 pb (18). Las transformantes aparecieron a partir del séptimo día, en contraste con los protoplastos regenerados de *A. rouxii* sin plásmido, que aparecieron en el segundo día de incubación. Una de las transformantes A412-3 presentó 1.4 veces menos biomasa que el control,  $1.89 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $2.7 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente, y la actividad disminuyó de 1-5 veces en comparación con la cepa parental. Estos resultados muestran la factibilidad que tiene el uso de este plásmido en la transformación de hongos.

Como se mencionó antes, las isoenzimas con actividad lacasa en *Pleurotus ostreatus* pueden cambiar en número y actividad dependiendo de la cepa y el sistema de cultivo que se utilice, por lo que en este trabajo se determinará el perfil de isoenzimas de la cepa de *Pleurotus ostreatus* PoB.

Por otro lado, todos los trabajos de silenciamiento génico nos dan una idea acerca de la importancia del tamaño y la secuencia del fragmento que debemos utilizar para tener éxito, en nuestro caso este estudio es la base para la obtención de mutantes silenciadas con el uso del plásmido pGpdPki-RNAi, que se ha reportado requiere fragmentos de secuencia de 400-500 pb, por lo que fragmentos de este tamaño serán generados y clonados en *E. coli* para su utilización posterior.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las lacasas son producidas por varias especies de hongos e informes de su presencia en más y más especies de hongos han sido publicados. La baja especificidad de sustrato que poseen estas enzimas las hace susceptibles de ser utilizadas en diferentes industrias como la del papel y la textil, así como en la detoxificación de agua y suelo, pero su producción cambia según la cepa y el sistema de cultivo, por lo que es necesario determinar los perfiles de isoenzimas en cada cepa de estudio.

Sin embargo, la identificación de los mecanismos por los cuales los organismos pueden producir estas enzimas y la participación fisiológica que tiene en el organismo que la produce, aún no se han comprendido completamente. El descifrar los mecanismos moleculares que fundamentan su función puede conducir a propuestas mejor dirigidas a la producción a gran escala de la enzima, lo que repercutirá, en el mediano plazo, en aplicaciones tecnológicas reales.

Los métodos de genética reversa pueden ser utilizados para evaluar la función génica en un organismo. La disrupción génica por recombinación homóloga es el método preferente para analizar la función de un gen de interés. El silenciamiento por RNA permite flexibilidad en experimentos de inactivación génica, ya que induce la supresión de genes en una secuencia específica pero no en un locus específico, lo que nos permite evaluar con más detalle los cambios ocurridos en el fenotipo del organismo de estudio. Para ello es necesario contar tanto con un plásmido de silenciamiento como con los fragmentos específicos en secuencia y tamaño.

El presente trabajo contribuirá con la amplificación, identificación, digestión de un gen de lacasa y su posterior ligación a un vector comercial, que nos permitirá tener una colección de fragmentos que podrán ser evaluados en trabajos posteriores para silenciar genes de lacasa y detallar aspectos diversos en la aplicación de la técnica de silenciamiento en hongos.

## **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuántas isoenzimas de lacasa produce *Pleurotus ostreatus* cuando se cultiva en medio sólido sintético?

¿Cuántos fragmentos pueden generarse a partir de uno de los genes de lacasa producidos por *P. ostreatus* que sean potencialmente aplicables a estudios de silenciamiento génico?

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Determinar el perfil de isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* crecido en medio sólido sintético y clonar fragmentos para silenciamiento de uno de los genes codificantes.

### **5.2 Particulares**

- 1.- Determinar el perfil de isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado en un medio sólido sintético.
- 2.- Obtener y secuenciar un gen que codifica para lacasa de *Pleurotus ostreatus*
- 3.- Generar fragmentos del gen de lacasas para silenciamiento génico.
- 4.- Generar la colección de clonas con los fragmentos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material Biológico

#### 6.1.1 *Pleurotus ostreatus* PoB

El microorganismo utilizado en este trabajo es la cepa de *Pleurotus ostreatus* Po B, perteneciente a la colección del Laboratorio Institucional de Hongos Comestibles de la Universidad Autónoma de Chapingo.

La cepa utilizada fue propagada inoculando el micelio en cajas petri con agar extracto de malta e incubando a 25° C para su posterior uso en los experimentos.

#### 6.1.2 *Escherichia coli* DH5a

La cepa de *Escherichia coli* DH5a (*E.coli*), fue donada por el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

La cepa fue utilizada en los experimentos de transformación debido a la alta eficacia que puede conseguirse con ella,  $5 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN. Entre sus características destaca la de poseer un corte en el gen Z del operón *lac*, lo que permite seleccionar por color las células transformadas que contengan plásmidos que complementen dicho daño, tales como pGEM-3Zf (+) (Applied Biosystems)

Genotipo: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *recA1*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta(lacZYA-argFV169)$ ,  $f80\delta lacZ\Delta M15F\lambda^-$ .

### 6.1.3 Vectores

**Pjet1.2 Blunt:** Es un vector de clonación linear, que acepta insertos de 6 pb a 10 Kb. Tiene un grupo fosfato en el extremo 5', por lo tanto, no es necesario que los primers estén fosforilados. El vector recircularizado expresa una enzima de restricción letal después de la transformación, lo que resulta en la obtención sólo de clones recombinantes (fig. 3).

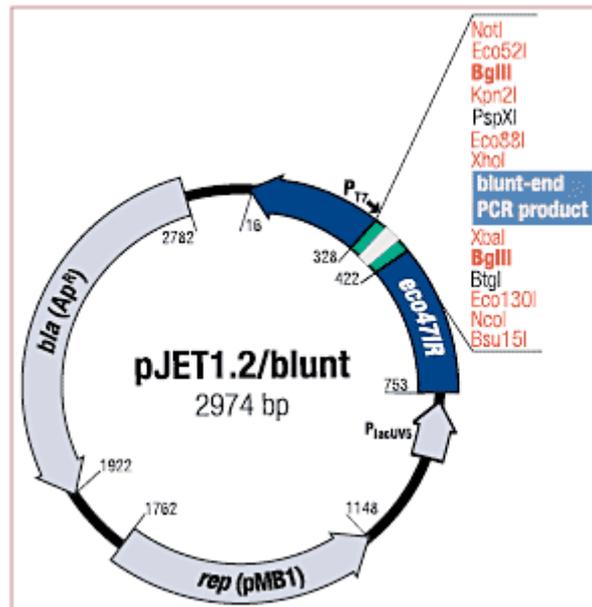


Figura. 3 pJET1.2 Blunt.

## 6.2 Medio de cultivo.

### 6.2.1 Medio agar extracto de malta (EMA)

Para la propagación y conservación de micelio de *Pleurotus ostreatus* se vertieron 30 mL<sup>-1</sup> de medio agar extracto de malta (Dibico) en cajas Petri, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

### **6.3 Crecimiento del microorganismo**

El perfil de producción de lacasas en varias cepas de este hongo ha sido determinado en trabajos previos, se sabe que la mayor actividad y la presencia de más isoenzimas sucede alrededor de los 8-13 días de cultivo tanto en medio sólido como en medio líquido. Con estos antecedentes, se realizó un cultivo de *Pleurotus ostreatus* Po B en agar extracto de malta (DIBICO) por un periodo de 20 días. El hongo fue inoculado en cajas petri colocando círculos de micelio en el centro de cada caja e incubado a 25° C. Se extrajo una muestra cada 24 h para su posterior procesamiento (evaluación del perfil enzimático y recuperación del micelio para la extracción del ADN total y la posterior obtención del gen de Lacasa).

### **6.4 Obtención de biomasa**

El micelio de cada muestra fue separado del agar con unas pinzas, colocado en tubos eppendorf estériles y almacenado a -20° C para su posterior procesamiento.

### **6.5 Obtención del extracto crudo enzimático.**

Para obtener las enzimas retenidas en el medio de cultivo, el agar se cortó con un asa bacteriológica, se agregaron 30 mL de buffer de fosfatos pH 6.5 y se agitó durante 15 min, transcurrido el tiempo la solución se separó del agar por centrifugación y se colocó en tubos falcon y eppendorf estériles. Al igual que el micelio, las muestras fueron almacenadas a -20° C hasta su procesamiento.

### **6.6 Evaluación del perfil enzimático**

Con la finalidad de conocer el número de isoenzimas de lacasa presentes a lo largo de la fermentación, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta técnica

electroforética consiste en hacer migrar las proteínas contenidas en una muestra a través de una matriz polimérica en un campo eléctrico.

Para la electroforesis se utilizó un sistema de buffers discontinuo, que consiste en dos geles con concentraciones de polímero distintas. En la parte superior se coloca un gel de empaque con un tamaño de poro mayor Concentrador 4% (Tabla 2) que sirve para alinear y concentrar las muestras antes de que ingresen al gel de separación 12% (Tabla 1). Cada uno está compuesto de un buffer distinto entre sí y a su vez distinto que el de corrida. La metodología para realizar esta técnica fue la siguiente.

**a) Gel separador (12 %)**

<b>Reactivo</b>	<b>Vol.</b>
Acrilamida 30 %	4.0 mL
Tris-HCl pH 8.8	2.5 mL
H <sub>2</sub> O MilliQ	50 µL
Persulfato de amonio 10% (p/v)	44 µL
TEMED	16.5 mL

**Tabla. 1** Reactivos para el gel de separación 12%.

1. En un matraz se agregó acrilamida, Tris-HCl y agua, la solución se mezcló hasta ser homogenizada, por último se agregó persulfato de amonio y TEMED, se mezcló rápidamente y se agregó dentro de la cámara. Inmediatamente después se adicionó etanol (100 µL) para alinear el gel.
2. Se dejó solidificar 20 min aproximadamente, transcurrido el tiempo se retiró el etanol adicionado.

### b) Gel de concentrados 4 % (Vol. 10 mL)

Reactivo	Vol
Acilamida 30 %	1.3 mL
Tris-HCl pH 8.8	2.5 mL
H <sub>2</sub> O MilliQ	50 µL
Persulfato de Amonio 10% (p/v)	12 µL
TEMED	6 mL

**Tabla. 2** Reactivos para el gel concentrador.

El método de preparación fue el mismo utilizado para el gel de separación, después de agregar la solución dentro de la cámara sobre el gel inferior se colocó un peine para la formación de los pozos en donde fueron colocadas las muestras.

Cuando el gel solidificó, el peine se retiró y las muestras fueron agregadas.

### 6.7 Preparación de las muestras.

En un tubo Eppendorf se mezclaron.

Reactivo	Vol
Buffer de muestra	5 µL
Extracto enzimático	29 µL

La mezcla se cargó en cada pocillo del gel de poliacrilamida, la migración de las muestras se realizó a 150 V durante 120 min.

Para poder conocer el peso aproximado de las proteínas obtenidas, en el primer pocillo se colocó un marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio Rad) que comprende un intervalo de peso molecular de 10 a 250 kDa.

Transcurrida la electroforesis, los geles se lavaron con agua desionizada con ayuda de un agitador orbital (80-100 rpm), para eliminar el SDS contenido y renaturalizar las proteínas.

La actividad de las enzimas se verificó colocando los geles en una solución de 2,6-dimetoxifenol (DMP por sus siglas en inglés) (ALDRICH) y buffer de fosfatos pH 6.5 por un periodo de 12 h.

Transcurrido el tiempo, los geles se lavaron nuevamente con agua desionizada para retirar el exceso de DMP y digitalizarlos con un escáner.

### **6.8 Extracción de ADN total.**

Con la finalidad de obtener el gen completo que codifica para lacasas, se realizó la extracción de ADN genómico. La técnica utilizada fue la de fenol-CIA de la siguiente manera:

De las fermentaciones realizadas, se eligieron los puntos que mostraron mayor actividad de lacasa. El micelio contenido en un tubo eppendorf fue lavado con NaCl 0.9% (p/v) con el objetivo de eliminar los componentes del medio de cultivo que pudieran haber quedado retenidos en el micelio, posteriormente se congeló con nitrógeno líquido y se maceró suavemente con ayuda de un pistilo.

1. Al micelio pulverizado se agregaron 0.5 mL de tampón de ruptura, la mezcla fue homogeneizada, se añadieron 0.5 mL de fenol y 0.5 mL de CIA, la solución se mezcló e incubó a 50° C durante 20 min. (La solución fue mezclada cada 10 min.).
2. Transcurrido el tiempo la mezcla se centrifugó a temperatura ambiente a 14 000 rpm durante 5 min y se recuperó la fase acuosa.
3. La mezcla se desproteinizó mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta que se obtuvo una interfase limpia (fueron necesarias 6 ó 7 extracciones).
4. A continuación se realizó una última extracción con CIA y el ADN se precipitó con 0.7 mL de isopropanol a 4° C durante 2-4 h.
5. Transcurrido el tiempo de precipitación, la mezcla fue centrifugada a temperatura ambiente a 14 000 rpm durante 20 min, se desechó el sobrenadante, el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% (v/v).

6. Finalmente el pellet resultante se secó en un termobloque y resuspendió en 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

### 6.9 Eliminación de RNA y desproteización de ADN

Una vez extraído el ADN con el método antes descrito, fue necesario someterlo a un proceso de limpieza antes de utilizarlo en ensayos posteriores. La metodología fue la siguiente:

1. Al ADN obtenido se agregó ARNasa (la necesaria para que la concentración final fuera de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubó a  $37^\circ \text{C}$  durante 20 min.
2. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió fenol neutro, se mezcló y centrifugó a temperatura ambiente a 14 000 rpm durante 5 min. Se retiró la fase acuosa (superior), se agregó fenol-CIA y se centrifugó nuevamente en las condiciones antes mencionadas. Este procedimiento se repitió varias veces hasta obtener una interfase limpia.
3. A continuación se hizo un último tratamiento con un volumen de CIA y se precipitó a  $-20^\circ \text{C}$  con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de alcohol absoluto frío.

### 6.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987) es una técnica de biología molecular utilizada para llevar a cabo replicaciones exponenciales de un fragmento particular de ADN *in vitro*. El ADN es enzimáticamente amplificado por ADN polimerasas, en este caso particular por la polimerasa *pfu*. Esta técnica necesita de una cadena molde de ADN que contiene la región que nos interesa amplificar y dos cebadores que se unen a las regiones que se desean flanquear en el ADN molde. En este paso se utilizó ADN total.

Para la amplificación se utilizó el par de cebadores O1'-Lac2, reportados por Giardina y cols. (1996), para este estudio la longitud del cebador O1' se aumentó en 5 nucleótidos (color rojo cuadro 5) con la finalidad de incrementar la especificidad en la reacción de

amplificación de los genes. La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL, en un volumen total de 50  $\mu$ L con los reactivos que se muestran en la tabla 3. El ciclo utilizado para la PCR se muestra en la tabla 4.

<b>Solución</b>	<b>Vol (<math>\mu</math>L)</b>
ADN molde	2
10x PCR Buffer	5
dNTPs	1
O1`	2
OLac 2	2
H <sub>2</sub> O	37.5
<i>pfu</i>	0.5

**Tabla. 3** Reactivos para PCR.

La mezcla de reacción se colocó en un termociclador MyCycler™ Thermal Cycler 170-9701 de Bio-Rad con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	4 min	96° C	1 ciclo
Desnaturalización	1 min	96° C	30 ciclos
Hibridación	1 min	55° C	
Extensión	1 min	72° C	
Extensión final	7 min	72° C	1 ciclo

**Tabla. 4** Ciclo de PCR.

Primer	Secuencia	Referencia
<b>LAC2</b>	GCGCTGCAGCTAAGCTATCCACCTTTGTC	Giardina y cols., 1996
<b>O1`</b>	5'-ATGTTTCCAGGCGCACGGATTCT-3'	Giardina y cols., 1996
<b>pJET1.2 forward</b>	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	Fermentas
<b>pJET1.2 reverse</b>	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	Fermentas

**Tabla 5** Cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa.

### 6.11 Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR.

En tubo se mezclaron 3  $\mu$ L del producto de la amplificación y 2  $\mu$ L de buffer de carga. La solución se cargó en un gel de agarosa al 1%. La migración de las muestras se llevó a cabo en Buffer TAE 1X a 85 V durante 85 min. Transcurrida la electrectroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio durante 15 min, posteriormente fue colocado dentro del fotodocumentador (Gel Doc 1000 de Bio Rad), se visualizó bajo luz ultravioleta y se digitalizó la imagen. En cada electroforesis se colocó un marcador (Gene ruler TM 100pb ADN Ladder FERMENTAS) que nos permitió determinar el peso molecular de las bandas obtenidas de cada muestra.

### 6.12 Purificación y secuenciación de las bandas obtenidas.

Las bandas obtenidas en el gel de agarosa se cortaron y purificaron con el kit Zymoclean TM gel ADN Recovery (ZYMO RESEARCH), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN fue resuspendido en 30  $\mu$ L de buffer de elución y almacenadas a -20° C.

Las muestras obtenidas se llevaron al Laboratorio Divisional de Biología Molecular, en la Universidad Autónoma Metropolitana para su secuenciación. Las secuencias resultantes fueron analizadas con las ya publicadas en el banco de datos en BLAST (Basic Local Alignment Search tool) con la finalidad de verificar que el amplicón obtenido perteneciera

una a un gen de lacasa y conocer la región que se estaba amplificando, así como la homología que se tenía con lo ya publicado en la base de datos.

### **6.13 Digestión del producto de amplificación.**

La longitud de los fragmentos utilizados para silenciamiento varía de 300 a 900 pb, debido a esto fue necesario realizar la digestión del amplicón obtenido en la PCR con distintas enzimas de restricción. El criterio de selección para las enzimas fue: que sean de corte romo, que tenga secuencia de corte en regiones codificantes del gen amplificado y que de los fragmentos resultantes de la digestión tengan una longitud entre 200 y 500 pb. Las enzimas utilizadas fueron: SmaI, KspAI, AluI, PvuII y BsuRI.

El procedimiento fue el siguiente:

En un tubo eppendorf se agregaron 15  $\mu$ L de agua, 2  $\mu$ L buffer 10X, 2  $\mu$ L del producto de PCR y 1  $\mu$ L de la enzima. La mezcla resultante se mantuvo a 37° C durante 2.5 h.

De manera paralela se realizó un análisis del gen amplificado con el programa CLC genomics Workbench, el análisis nos dio una idea del número de cortes esperados en las digestiones realizadas.

### **6.14 Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones.**

Se agregaron 2  $\mu$ L de tampón de carga a la digestión y se colocaron en baño maría a 65 °C durante 1 min. Transcurrido este tiempo, el tubo se colocó en baño con hielo durante 3 min. La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% y se corrió a 85 Volts durante 75 min en Buffer TAE 1X. Terminada la electroforesis, el gel se tiñó en bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta. Se tomó una imagen del gel con el equipo Gel Doc 1000 de Bio Rad.

En el gel se colocó un marcador (Gene ruler TM 100pb ADN Ladder FERMENTAS) para determinar la longitud de las bandas obtenidas en cada muestra.

Con base en el patrón de bandeo obtenido para cada enzima probada, se eligió la que cumpliera con los criterios de selección. Se realizó la digestión con la enzima BsuRI y la electroforesis de la misma. De las bandas obtenidas se seleccionaron las que tenían los tamaños deseados, se purificaron y confirmaron en gel de agarosa para ligarlas posteriormente en el vector de clonación.

### **6.15 Ligación de los fragmentos al vector de clonación pJET1.2 Blunt.**

Después de confirmar los insertos, se realizó la ligación en el vector pJET1.2 Blunt, un plásmido comercial con extremos romos (FERMENTAS) para su amplificación.

La enzima utilizada en la ligación fue la Ligasa T4 que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 5' fosfato y uno 3'OH en una molécula de ADN o RNA de doble cadena, con extremos romos o cohesivos. Las condiciones de la reacción de ligación se muestran en la tabla 6.

Plásmido	1 $\mu$ L
Inserto	3 $\mu$ L
Buffer	5 $\mu$ L
Ligasa	1 $\mu$ L

**Tabla. 6** Reactivos para ligación.

La mezcla fue incubada a 22° C durante 18 h

Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla fue utilizada para la transformación de las células competentes.

### **6.16 Amplificación del vector de clonación.**

El objetivo de este punto es ingresar el vector ligado con el inserto a células susceptibles de ser transformadas (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ), para multiplicar la cantidad de inserto con la que se cuenta. El procedimiento fue el siguiente:

### **6.17 Generación de células competentes**

En cajas petri con medio LA fueron sembrados 30  $\mu$ L de células, por estriado y se incubaron a 37 °C durante 14 h. Posteriormente se seleccionó una colonia y se preinoculó en 1 mL de medio LB y se incubó a 37 °C y 200 rpm durante 2h. A partir de esta solución fueron preinoculados 100 mL de medio LB, se incubó a 37 °C y 200 rpm durante 4 h. El medio se distribuye en tubos para centrifugar y se mantienen en baño con hielo a 4 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 7 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM, la suspensión se mantuvo en baño con hielo a 4 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. La suspensión de células se distribuyó en alícuotas de 400  $\mu$ L. Los tubos se conservan en el ultracongelador a -20 °C.

### **6.18 Amplificación del plásmido pJET1.2 Blunt por choque térmico**

Las células competentes obtenidas en el paso anterior fueron descongeladas en baño con hielo a 4° C durante 5 min, se colocaron 100  $\mu$ L de la suspensión de células en un tubo eppendorf y posteriormente se agregaron 3  $\mu$ L de plásmido, el tubo se mantuvo a 4° C durante 20 min, transcurrido ese tiempo el tubo se colocó en baño maría a 42° C durante 45 segundos y nuevamente a 4° C durante 3 min. Se inocularon 500  $\mu$ L de medio LB sin antibiótico con la suspensión de bacterias-plásmido y se incubó durante 45 min a 200 rpm.

Transcurrido ese tiempo se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión en medio LA con 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, se incubó a 37° C durante 14 h.

Debido a que el vector utilizado contiene un gen que le proporciona resistencia a ampicilina al organismo que lo contiene, las colonias presentes en las placas son en las que se logró ingresar el plásmido.

### **6.19 Extracción del plásmido (MINI-PREPS).**

A partir de una de las placas en las que crecieron células transformadas, se seleccionó una colonia y se inoculó un tubo eppendorf con medio LB con ampicilina, el tubo se incubó a 37° C y 200 rpm durante 18 h. transcurrido el tiempo, el tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se desechó y pellet se resuspendió en 350  $\mu\text{L}$  de STET (sacarosa, Tris HCl, EDTA, tritón), posteriormente se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de lisozima en una concentración de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y se mezcló, el tubo se colocó en un recipiente con agua en ebullición durante un minuto, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min, el pellet formado en la parte inferior del tubo se retiró del sobrenadante con un palillo estéril, se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcló e incubó durante 15 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 5 min, finalmente el sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas.

### **6.20 Electroforesis.**

Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga a la digestión y se colocó en baño maría a 65° C durante 1 min, transcurrido el tiempo el tubo se colocó en baño con hielo durante 3 min. La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% y se hizo correr a 85 V durante 75 min en buffer TAE 1X. Terminada la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta. Se tomó una imagen del gel con el equipo Gel Doc 1000 de Bio Rad. En el gel también se colocó un marcador (el fago  $\lambda$  digerido con la enzima de

restricción Pst I de FERMENTAS) para determinar la longitud de las bandas obtenidas en la muestra.

### 6.21 Amplificación del gen a partir de vector pJET1.2 Blunt.

Para la amplificación se utilizaron dos combinaciones de cebadores O1`-Lac2 y Pjet1.2 forward y Pjet1.2 reverse (cuadro 5). La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL, en un volumen total de reacción de 50 µL conteniendo. Los componentes de la reacción se muestran en la tabla 7 y el ciclo para la PCR en la tabla 8.

Solución	Vol (µL)
ADN molde	1
10x PCR Buffer	5
dNTPs	0.5
O1`	2
Lac 2	2
H <sub>2</sub> O	39.0
<i>pfu</i>	0.5

**Tabla. 7** Reactivos para amplificación del plásmido pJET1.2 Blunt.

La mezcla de reacción se colocó en un termociclador MyCycler™ Thermal Cycler 170-9701 de Bio-Rad con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	2 min	96° C	1 ciclo
Desnaturalización	1 min	96° C	30 ciclos
Hibridación	1 min	55° C	
Extensión	0.5 min	72° C	
Extensión final	7 min	72° C	1 ciclo

**Tabla. 8** Ciclo de PCR para el plásmido pJET1.2 Blunt.

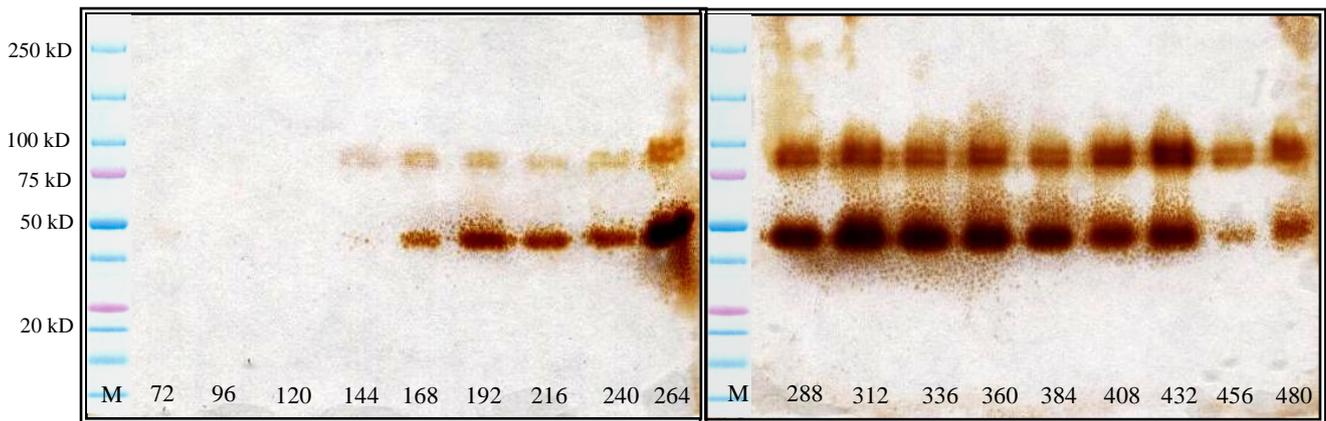
## **6 Resultados y discusión**

### **7.1 Evaluación del perfil de isoenzimas extracelulares**

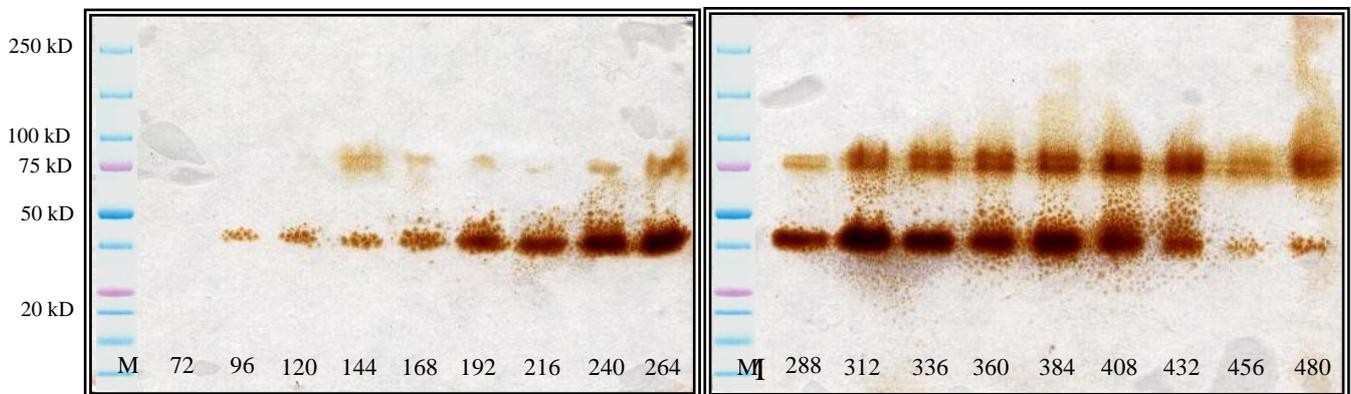
En las figuras 4 y 5 se muestra el perfil de isoenzimas obtenido en los cultivos 1 y 2.

En ambos cultivos se puede observar la presencia de tres isoenzimas una de aproximadamente 40 kDa que en el caso de el cultivo 1 se presenta a las 144 h y en el cultivo 2 a las 96 h, en ambos casos dicha isoenzima se mantiene hasta las 480 h, mostrando su mayor actividad entre las 264 y 408 h. También se pueden observar en ambos cultivos otras dos isoenzimas de 80 kDa y 90 kDa aproximadamente. En el cultivo 1 la isoenzima de 80 kDa se presenta a las 144 h de cultivo, permanece hasta las 480 h y presenta mayor actividad a las 432 h. La isoenzima de 90 kDa se puede diferenciar a las 264 h, permanece hasta las 480 h y presenta su mayor actividad a las 432 h.

Para el cultivo 2 la isorforma de 80 kDa se presenta a las 144 h, y permanece con menor intensidad desde las 160 h hasta las 240 h. A partir de las 264 h se mantiene con una actividad constante, su actividad máxima se presenta a las 432 h y disminuye en las 456 y 480 h. La isoenzima de 90 kDa se presenta a las 288 h y se mantiene hasta las 480 h, su mayor actividad se presenta a las 432 h.



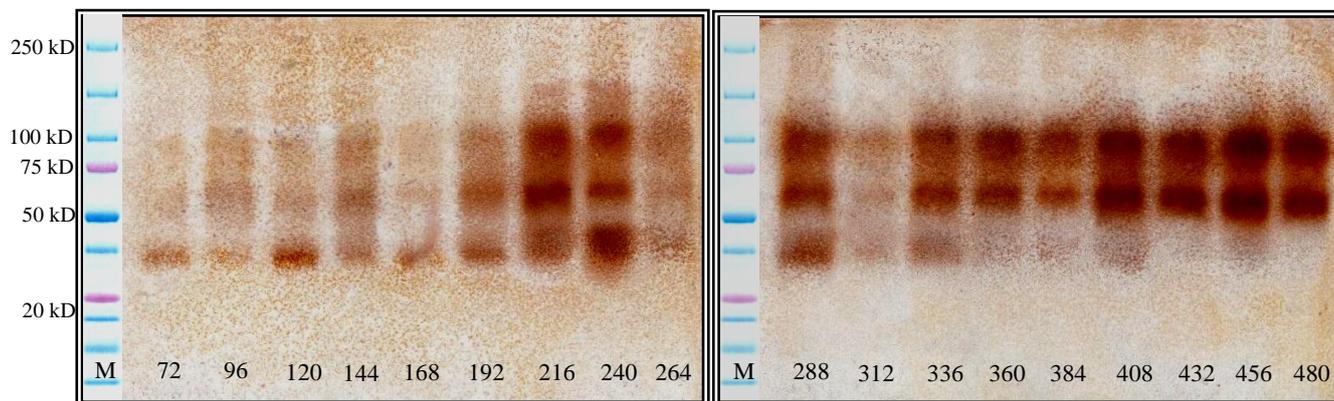
**Figura. 4** Perfil de isoenzimas del cultivo 1.



**Figura. 5** Perfil de isoenzimas del cultivo 2.

## 7.2 Perfil de isoenzimas intracelulares

En las figura 6 se muestra el perfil de isoenzimas obtenido en el cultivo 1, se puede observar la presencia de tres isoenzimas, una de aproximadamente 40 kDa presente desde las 72 h hasta las 408 h, mostrando su mayor actividad entre las 216 y 240 h, la segunda isoenzima de 70 kDa se presenta desde las 72 h y permanece durante toda la fermentación, sus mejores actividades se observaron desde las 408 hasta las 480 h. La isoenzima de 90 kDa se puede diferenciar desde las 96 h y al igual que la isoenzima de 70 Kda permanece hasta las 480 h y presenta su mejor actividad desde las 408 hasta las 480 h.

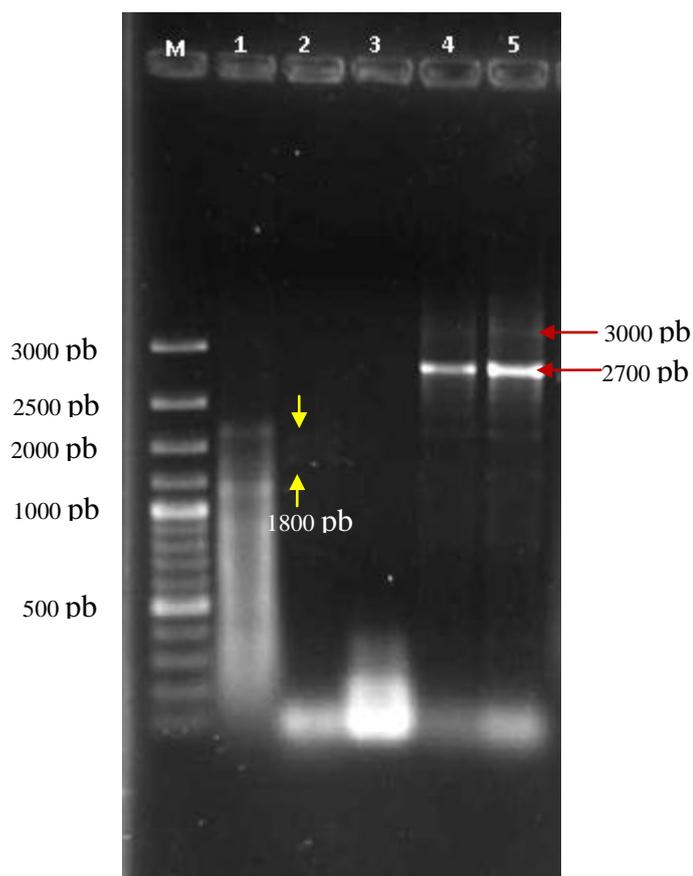


**Figura. 6** Perfil de isoenzimas del cultivo 1.

La familia de las lacasas de *P.ostreatus* representa una gran variedad de enzimas, se ha visto la presencia de diferentes patrones de expresión de las isoenzimas de lacasa dependiendo de las condiciones de crecimiento y el estado fisiológico del hongo (Giardina *et al.*, 1996). Datos obtenidos en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas por Armas (2009) y Cuatecontzi (2009) muestran la presencia de tres isoenzimas que no permanecían durante toda la fermentación, tanto en medio líquido como en sólido.

### 7.3 Amplificación a partir de ADN total.

En la figura7 se observan las bandas obtenidas como producto de la amplificación con el ADN genómico como molde. El pocillo 1 muestra el ADN total, el pocillo 2 el producto de amplificación con el par de primers Lac1-Lac2 se obtuvieron dos bandas de tamaños una de 1800 pb (flecha amarilla) y otra de 2200 pb aproximadamente, el pocillo 3 es una amplificación con los primers Lac1-Lac2, los pocillos 4 y 5 muestran los productos de amplificación con el par de primers O1' y Lac2, se logran observar cuatro bandas, la de mayor tamaño y concentración es de 2700 pb y 3000 pb aproximadamente (flechas rojas).



**Figura. 7** Productos de PCR obtenidos con los primers O1'-Lac2.

Debido a que la banda de 2700 pb amplificada con los primers O1' y Lac2 es la que se obtiene con mayor concentración en comparación con el otro par de primers probado, se decidió purificar ese fragmento a partir de gel y se envió a secuenciar para su posterior análisis y utilización en los experimentos.

#### **7.4 Análisis de la secuencia obtenida.**

La secuencia obtenida fue de 517 nucleótidos (Fig. 8) con ella se realizó una búsqueda en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con la finalidad de corroborar que el producto de la amplificación efectivamente era una lacasa y conocer su porcentaje de similitud con las secuencias de los genes ya reportados. El resultado de la búsqueda mostró que la secuencia obtenida tiene más del 90% de similitud con varias lacasas reportadas en

el banco de datos, en particular, 90% con el gen completo y 94% con el mRNA *pox1* de la cepa de *Pleurotus ostreatus* NRRL 0366 (Fig. 9).

```

1  CGTAAATAAT GAGTCGCTCA CAGTTTTCTA CATCCGATGA TCCCCATCCT ATAGCACACG
61  TTCGACCTCC TCAGGAGTGC GGGCTCTACT ACCTATAACT TCCACACCCC TCGCGGACGC
121 GATGTTGTCA ACAATGGAAC TGACGCGAAC GACAACGTCA CCATCCCGCT TTGTGACGGA
181 TAATCCAGGC CCAATGGTCC TCCACTGGGA GGGATTTCGC GCAATTCGIG CGACAGCCAT
241 AGACTGACAG CATCCCCTAG CCACATTGAC TGGCATCTCG AAATGTAGGC GACATTCTTT
301 ATTGATTCCA TTAICTCCACT CAAAGGCATT TAGCGCCCTC GCCCCCCCCC CCCCCCCCCA
361 GACGCCCCGC CTATCCCCC CCCCCCCGG CCCCCCCCC CCCCCCCCAT CCCCCGCCCC
421 TCCGTATATC AGGCTCACAC CCCCTCCCC CGCCCGGCAC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
481 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCTTCCC

```

**Figura. 8** Secuencia de nucleótidos obtenida.

Accession	Description	Max score	Total score	Max ident
<a href="#">AY686700.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase precursor ( <i>pel3</i> ) gene, complete cds	442	442	91%
<a href="#">AB514350.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>pox1</i> gene for phenol oxidase 1, partial cds	429	429	90%
<a href="#">Z32521.1</a>	<i>P.ostreatus</i> diphenol oxidase gene	429	429	90%
<a href="#">GU953215.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase gene, complete cds	248	248	90%
<a href="#">AB514561.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>pox1</i> mRNA for phenol oxidase 1, complete cds	237	237	94%
<a href="#">F332996.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> laccase-like (CHSH) mRNA, partial sequence	237	237	94%
<a href="#">Z34847.1</a>	<i>P.ostreatus</i> <i>pox1</i> mRNA for diphenol oxidase	237	237	94%
<a href="#">GU480806.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase mRNA, complete cds	231	231	94%
<a href="#">AM773999.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> mRNA for laccase ( <i>ery3</i> gene)	231	231	94%
<a href="#">AY485827.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> laccase mRNA, complete cds	231	231	94%

**Figura. 9** Resultado del análisis de la secuencia obtenida en BLAST.

Confirmada la identidad del producto de amplificación, pudo ser utilizado para las siguientes pruebas.

### 7.5 Análisis de restricción del gen *Pox1* con CLC genomics Workbench.

CLC genomics Workbench es un programa bioinformático utilizado para realizar análisis genéticos, alineación de secuencias de varios genes para hallar sitios conservados, encontrar promotores, alinear primers a secuencias génicas, análisis de restricción, entre otros.

En este punto se realizó el análisis del gen completo con distintas enzimas de restricción, con la finalidad de seleccionar la(s) que se utilizará(n) para la digestión de nuestro inserto.

Lo que se buscó fue que la enzima haga cortes romos, en regiones codificantes, que los fragmentos obtenidos con los cortes tengan un tamaño entre 400 y 900 pb. Los resultados obtenidos con las distintas enzimas evaluadas mostraron que las enzimas SmaI y KspAI no tienen sitio de corte en el gen *pox1* (fig. 10 y 11), AluI tiene 16 sitios de corte, PvuII 3 sitios y BsuRI 10 sitios de corte. Las barras amarillas indican los exones, las líneas negras entre esas barras los intrones y las flechas indican los sitios de corte de la enzima.

### SmaI y KspAI

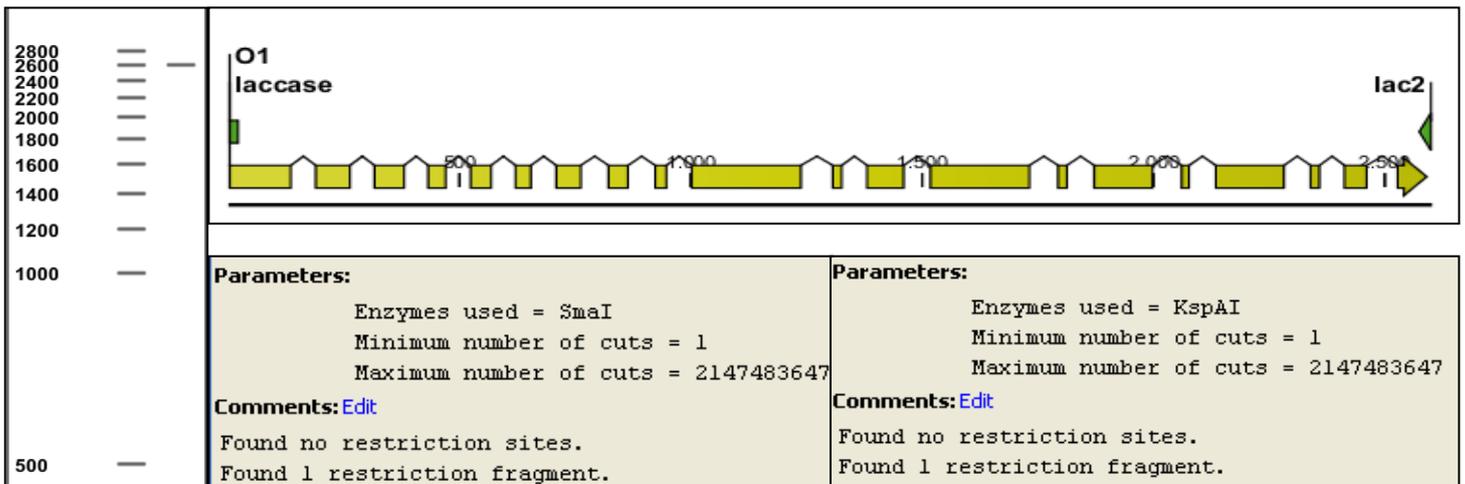


Figura. 10 Análisis de restricción SmaI.

### AluI

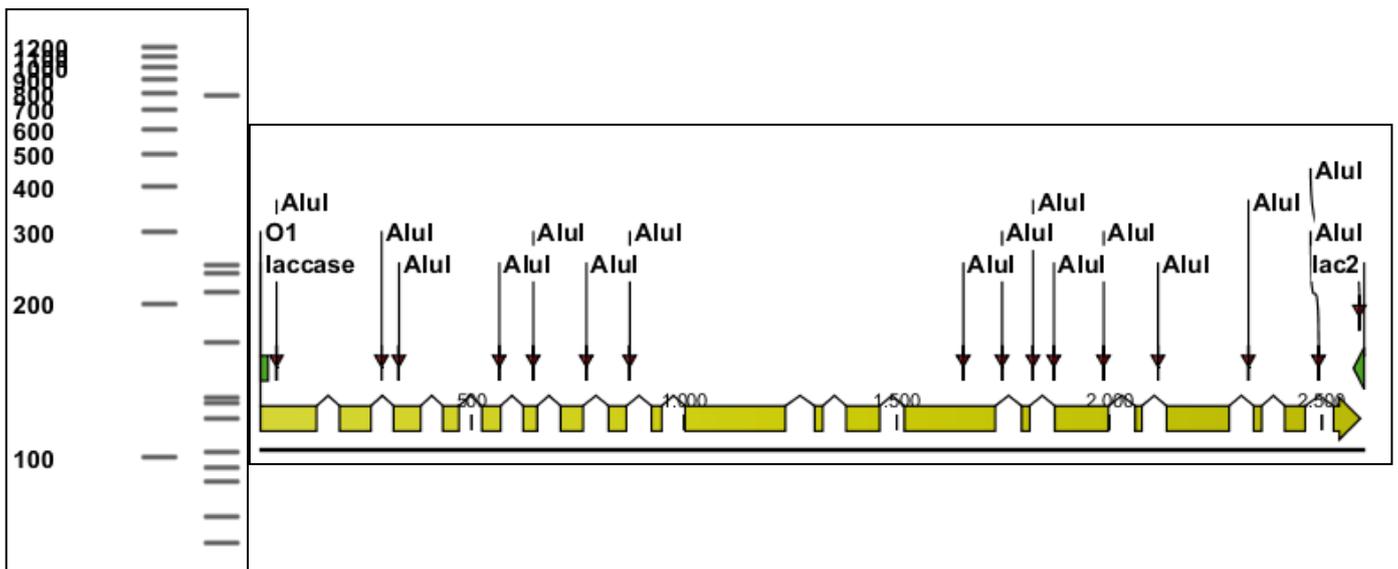


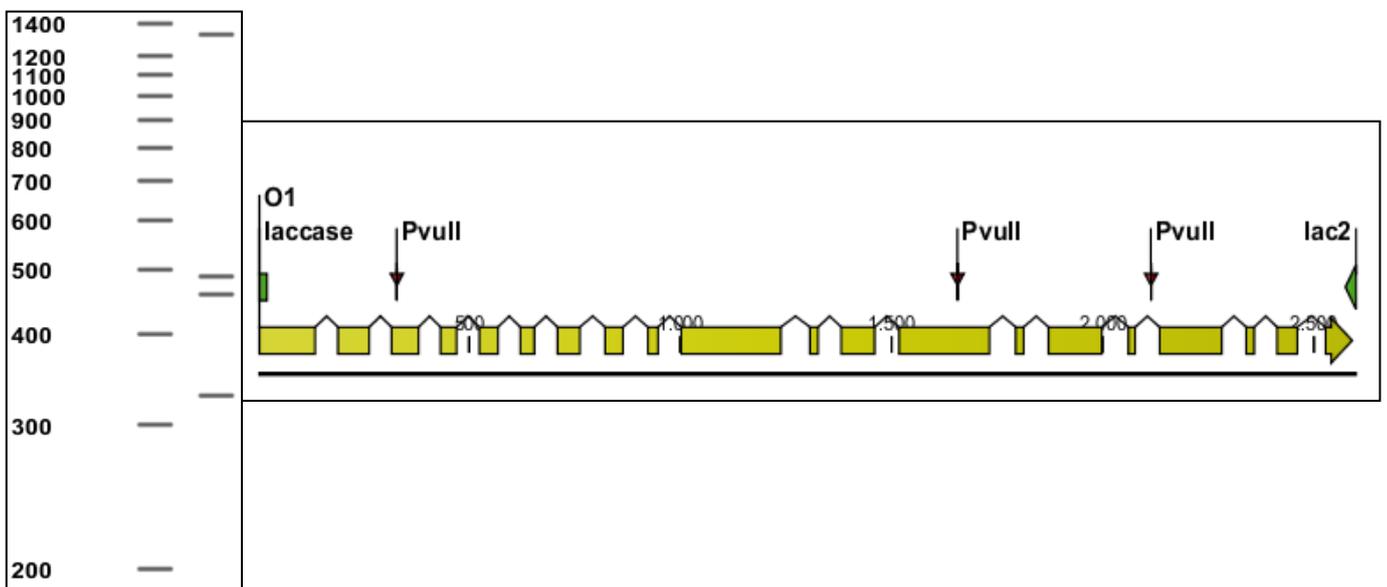
Figura. 11 Análisis de restricción AluI.

**Número de cortes presentes en el gen: 16**

**Posición del corte:** 22, 269, 310, 546, 626, 751, 853, 1638, 1729, 1802, 1851, 1968, 2096, 2309, 2474, 2570

**Tamaños de las bandas esperadas:** 40pb, 247pb, 41pb, 236pb, 80, 125, 102 785,91, 73, 49, 117, 128, 213, 165 96, 14.

### **PvuII**



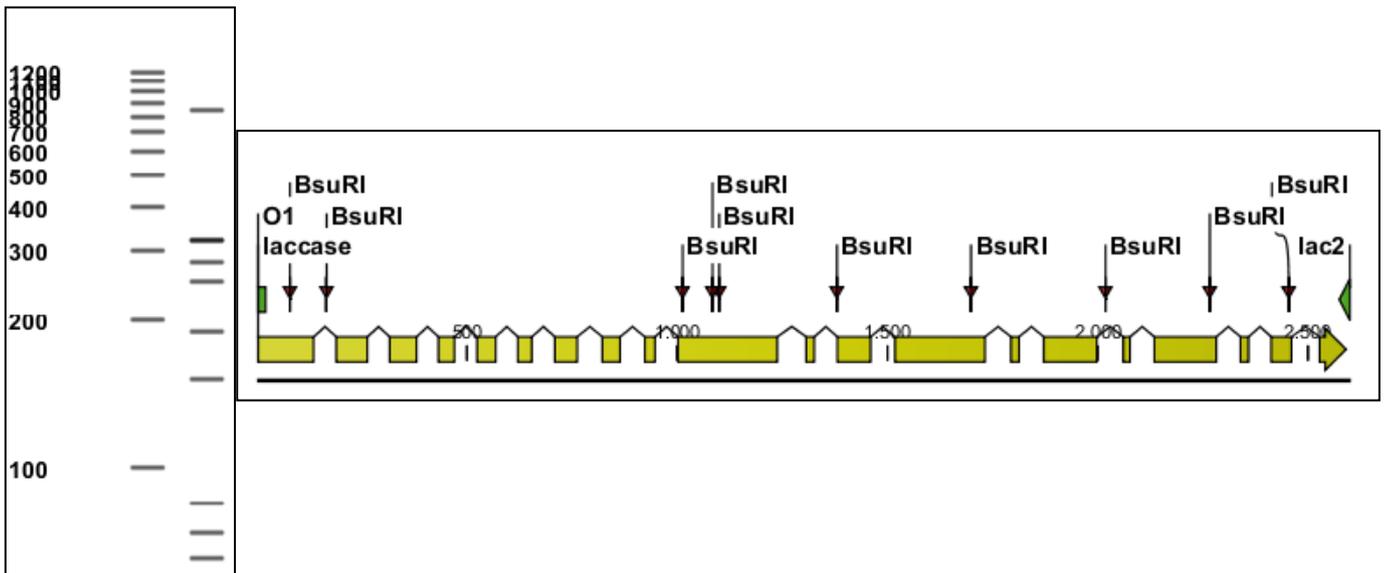
**Figura. 12** Análisis de restricción PvuII.

**Número de cortes presentes en el gen: 3**

**Posición del corte:** 310, 1638, 2096

**Tamaño de las bandas esperadas:** 328pb, 1328pb, 458pb y 488pb

## BsuRI



**Figura. 13** Análisis de restricción BsuRI.

**Número de cortes presentes:** 10

**Posición del corte:** 60, 147, 994, 1065, 1081, 1361, 1680, 2000, 2248, 2436

**Tamaño de las bandas esperadas:** 78pb, 87pb, 847pb, 71pb, 16pb, 280pb, 319pb, 320pb, 248pb, 188pb, 148pb.

### 7.6 Análisis de restricción en gel de agarosa

La figura 14 nos muestra el patrón de bandeado resultante de la restricción las enzimas probadas. Con las enzimas SmaI y KspAI, se puede observar que el gen no tuvo ningún corte, lo que nos confirma lo obtenido en el análisis del gen con el programa bioinformático.

Con AluI se obtuvieron bandas con tamaños de 1300 pb, 850 pb, 550 pb, 400 pb, 300 pb y 200 pb aproximadamente. De las bandas obtenidas, las que únicamente pueden

corresponder a las propuestas por el programa son la de 850pb, 300pb y 200pb, esto puede deberse a cambios en la secuencias de reconocimiento para corte por esta enzima.

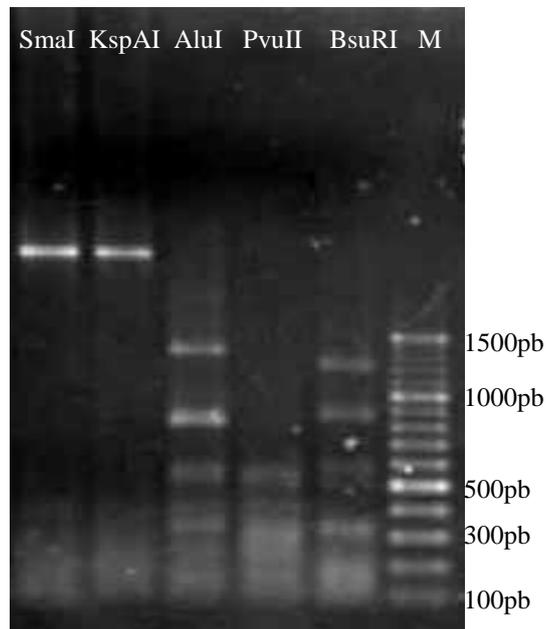
El patrón de bandeo para PvuII dio como resultado una banda de 550pb, una de 400pb, una de 300pb, una de más de 200pb y varias de menos de 200pb, para este caso las bandas que muestran correspondencia con el análisis bioinformático son la de 400 y 300pb.

Por último, el patrón de bandeo de BsuRI mostró bandas de 1300pb, 900pb, 600pb, 500pb, 300pb y varias menores de 200pb, las bandas que muestran correspondencia son las de 900pb y la de 300pb.

En todos los casos, se obtuvieron varios fragmentos con tamaños menores a 200pb, debido a que la diferencia en tamaño entre algunas de esas bandas es de menos de 30pb, y al tipo de gel que se está utilizando, no es posible que las bandas se separen de manera clara y se observen como un “barrido” en la parte inferior del gel. Este mismo caso ocurre con las bandas con tamaños menores a 100pb.

La razón principal por la que los fragmentos resultantes de la digestión del gen *in vitro* no son los mismos que los que nos propone el programa, puede deberse a que a pesar del alto porcentaje de similitud entre las secuencias del gen obtenido y el de las bases de datos, la secuencia del gen que se amplificó no es igual que la del *pox1*, lo que es posible, ya que la cepa con la que se está trabajando es distinta a la cepa de la que caracterizaron el gen reportado en la base de datos, la única manera de corroborarlo es secuenciando el gen completo.

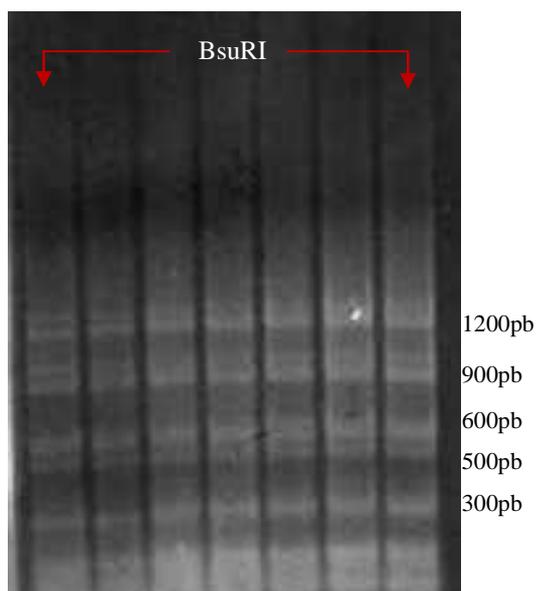
Como se puede observar en el gel, con todas las enzimas se logra tener un fragmento entre 300pb y 500pb aproximadamente, estas bandas son las que pueden utilizarse potencialmente como fragmentos para silenciamiento, sin embargo, la enzima que presenta bandas mejor definidas y concentradas en esos tamaños es BsuRI, es por eso que se decidió utilizar dicha enzima para la obtención de los fragmentos a ingresar en el vector de clonación.



**Figura. 14** Análisis de Restricción con distinta endonucleasas.

### 7.7 Restricción para la purificación de las bandas a clonar

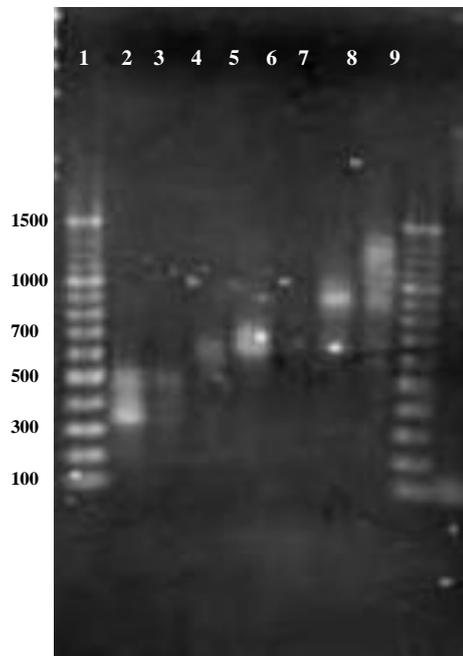
La figura 15 muestra las bandas obtenidas como producto de la digestión *in vitro* del gen amplificado, en él se logran ver con más claridad las bandas obtenidas con la enzima BsuRI. Los números anotados en el lado derecho de la imagen señalan el tamaño aproximado de los fragmentos resultantes. Como se puede observar, hay dos bandas más, una de 1000 pb y una de 1300 pb que no se observan en el patrón de bandeado de la figura 14 con BsuRI.



**Figura. 15** Restricción con BsuRI.

Para la purificación de los fragmentos se requiere que las bandas estén bien delimitadas, lo que se logra aumentando el porcentaje de agarosa en el gel y el tiempo de la electroforesis, esto permite una mejor separación de las bandas, sobre todo cuando la diferencia de tamaño entre ellas no es grande. Es por esto que en la figura 15, aunque se mantiene el patrón de bandeo, se muestra un mayor número de bandas que en la figura 14.

## 7.8 Purificación de las bandas a clonar



**Figura. 16** Purificación de las bandas a clonar.

Purificación restricción BsuRI	
Carril	Pares de bases (pb)
1	Marcador
2	300 y 500
3	500
4	600
5	>600
6	-----
7	900
8	1300
9	Marcador

**Tabla. 9** Bandas obtenidas en la purificación.

La figura 16 muestra las bandas obtenidas en la purificación, en tanto el cuadro 9 los tamaños aproximados de dichas bandas. Como se puede observar, se lograron recuperar todas las bandas cortadas. En el carril 2 se ven dos bandas, y en el resto de los carriles, aunque no bien delimitadas, se logran distinguir las bandas, lo anterior se debe como en el gel anterior a la concentración del gel, el tiempo de corrida y a la cantidad de muestra agregada a cada pozo.

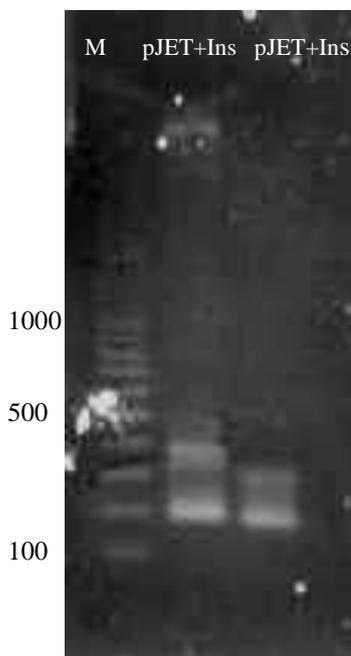
## 7.9 Amplificación del plásmido con los insertos

La ligación de los insertos al vector de clonación se realizó de dos maneras distintas. En la primera se seleccionaron fragmentos purificados (500 y 300pb) y se ligaron al vector de clonación. En la segunda, la digestión total se purificó y a la solución se le agregó el vector y la ligasa.

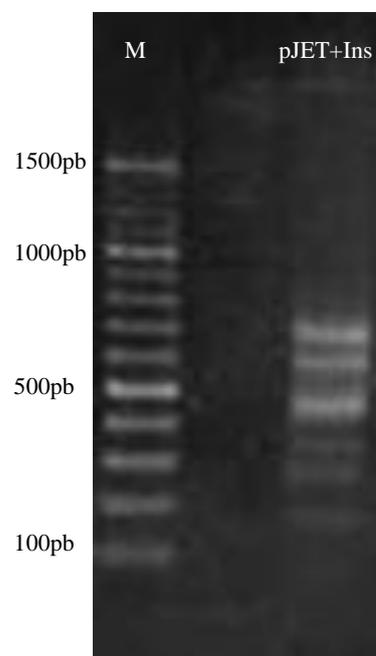
Las dos ligaciones se amplificaron con primers para el plásmido. Los resultados se muestran en las figuras 17 y 18.

La figura 17 muestra las bandas obtenidas de la amplificación del vector con fragmentos seleccionados y purificados (500 pb y 300 pb). Como puede observarse se lograron amplificar los fragmentos insertados, y una banda de 200 pb adicional, cuya presencia podría deberse a que cuando se corrió el gel las bandas no se separaron lo suficiente y al cortar el gel se incluyó esa banda.

La figura 18 muestra las bandas obtenidas en la amplificación del vector ligado a la digestión total. Como era de esperarse, se obtiene un mayor número de bandas, desde 200 pb hasta 700 pb, las bandas se muestran bien definidas y en concentraciones suficientes evaluadas sólo mediante la intensidad que presentan. De esta manera corroboramos que se logró en ambos casos se logró por ambos procedimientos insertar distintos fragmentos del gen en un plásmido de selección.



**Figura 18** Productos de la amplificación con fragmentos seleccionados



**Figura 17** Producto de la amplificación con la digestión total

## 6 Conclusiones

- En este trabajo se logró realizar la evaluación del perfil de isoformas de *Pleurotus ostreatus* PoB, intra y extracelulares. El número de isoformas presentes en esta cepa son tres y se encuentran ubicadas a la altura de las bandas de 40 KDa, 80 kDa y 90 KDa del marcador de peso molecular, aproximadamente en ambos casos, coincidiendo con los perfiles reportados para esta especie.
- Se lograron estandarizar las condiciones de reacción para la amplificación de un gen de lacasa de la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus*, con primers modificados a partir de los diseñados de las regiones conservadas de los genes de lacasa ya reportados.
- Se logró amplificar un gen de lacasa con una longitud de 2700 pb y que tiene 90% de similitud con el gen completo *pox1* de la cepa NRRL0366 de *Pleurotus ostreatus* y 94% de similitud con el RNAm del mismo gen y de la misma cepa.
- La enzima de restricción BsuRI fue la que produjo un fragmento de 517pb a partir del gen amplificado, de este fragmento se obtuvo también la secuencia. La secuencia y el tamaño de este fragmento lo hacen potencialmente utilizable para estudios exitosos de silenciamiento.
- Adicionalmente se obtuvo una colección de fragmentos de distintos tamaños del gen amplificado, ligados a un vector de clonación para su posterior amplificación e inserción en un vector de silenciamiento, para evaluar su impacto en el abatimiento de la expresión de la actividad lacasa.

- 

## **7 Perspectivas**

La generación de los plásmidos con distintos fragmentos del gen son de gran utilidad, ya que se podría secuenciar cada banda resultante en la amplificación hasta tener el gen completo y caracterizarlo, o bien seleccionar alguno de los fragmentos con tamaños entre 200pb y 500pb y ligarlos a un vector de silenciamiento para evaluar la función de estas enzimas en el hongo.

## 8 Literatura citada

1. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malotra P, Bhatnagar RK y Mukherjee. 2008. RNA interference, biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol R* 67:657-685.
2. Baldrian P, Vendula V, Vera M, Jiri G. 2005. Degradation of ligninocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Res Microbiol* 156: 670-676.
3. Baldrian P. 2003 Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol* 32: 78–91.
4. Bertrand TC, Jolivald C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C y Mouglin C. 2002. Crystal structure of four-copper laccase complexed with an arylamin: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41: 7325-7333.
5. Bhaduria V, Banniza S, Wei Y, y You-Liang P. 2009. Reverse genetics for functional genomics of Phytopathogenic fungi and Oomycetes. *Compar Funct Genom* 2009: 1-11.
6. Clutterbuck AJ. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 70: 423-435.
7. Faraco V y Giardina PG. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149: 2155–2162
8. Galhaup C y Haltrich D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl Microbiol Biot* 56: 225–32.
9. Gao D, Du L, Yang J, Wu WM y Liang H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Crit Rev Biotechnol* 30: 70-77
10. Giardina P, Aurilla V, Cannino R, Marzullo L, Amoresano A, Siciliano R, Pucci P y Sanna G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem* 235: 508-515
11. Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G y Sanna G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 61: 2408–2413.
12. Herrera AM. 2005. Principios básicos y simples de la tecnología transgénica y Knockout. *Rev. CESMed.* 19: 43-51.

13. Janeway CA, Travers PJr, Mark W, Shlomchik MJ. Edit. Masson M. 2003. Inmunobiología del sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad) 2ª edición, España.
14. Jong JF, Deelstra HJ, Wösten HAB y Lugones LG. 2006. RNA-mediated gene silencing in monocaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. Appl environ microb 72: 1267–1269.
15. Kilaru S, Hoegger PJ y Kües U. 2006. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. Curr Genet 50: 45–60.
16. Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A y Alcalde M. 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. Microl Cell Fact 32: 1-17.
17. Larrondo LF, Salas L, Melo F y Vicuna R. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. Appl Environ Microbiol 69: 6257–6263.
18. Lloyd A. 2002. Vector construction for gene overexpression as a tool to elucidate gene function. En: Methods in Molecular Biology, Plant functional genomics. Erich Grotewold (Ed) Editorial Humana press Unites States of America. Pp. 329-344.
19. Lundell TK, Mäkelä MR. y Hildén K. 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes-ecological, functional and phylogenetic review. J Basic Microb 50: 5–20.
20. Mansur M, Arias M, Copa-Patiño GA y Fardh M. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. Mycologia 95: 1013–1020.
21. Mayer MA y Staples CR. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme Phytochemistry. 60: 551–565.
22. Meyer V. 2008. Genetic engineering of filamentous fungi- Progress, obstacles and future trends. Biotechnol Adv 26: 177–185.
23. Muñoz C, Guillen F, Martínez TA y Martínez JM. 1997) Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Curr Microbiol 34: 1-5.

24. Nakayashiki H. 2005. RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS Lett* 579: 5950–5957.
25. Necochea R, Valderrama B, Díaz-Sandoval S y Folch-Mallol JL. 2005. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiol Lett* 244: 235–241.
26. Novina CD y Sharp PA. 2004. The RNA revolution. *Nature* 430: 161-164
27. Palmer AE, Szilagyi RK, Cherry JR, Jones A, Xu F y Solomon EI. 2003. Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: Effect of increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type 1 Cu site. *Inorg Chem* 42: 4006-4017.
28. Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G y Faraco V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet* 55: 45–57.
29. Prescott ML-1, Harley PJ y Klein AD. 2002. *Microbiología*. 5ª Ed. Mc Graw Hill. España.
30. Rajarathnam S y Bano Z. 1989. *Pleurotus* mushrooms. Part. III. Biotransformations of natural ligninocellulosic wastes: commercial applications and implications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 31-113.
31. Ringlin D y Van Alfen NK. 1991. Regulation of laccase biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. *J Bacteriol* 173: 8000-8003.
32. Rodríguez E, Ruíz Dueñas FJ, Kooistra R, Ram A, Martínez AT y Martínez MJ. 2008. Isolation of two laccases from the white root *Pleurotus eriingy* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. *J Biotechnol* 134: 9-19.
33. Rodríguez RF. 2006. Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavidio-alba*: caracterización del gen y regulación por fenoles y metales. Tesis Doctoral. Granada España.
34. Sambrook J y Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
35. Schmidt FR. 2005. About the nature of RNA interference. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 429-435.
36. Soden DM y Dobson ADW. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajorcaju*. *Microbiology* 147: 1755–1763.

37. Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Solomon PW, Nevo E y Vukojevic J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme microb tech* 38: 65-73.
38. Téllez TM, Fernández FJ, Montiel GAM, Sánchez C y Díaz GG. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Appl microbiol biot* 81: 675-679.
39. Tlecuitl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD y Díaz GG. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycol res* 112: 1018-1084.
40. Tomer MS, Oded Y, Yitzahak H. 2010. *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange II. *Microb Biotechnol* 3: 93–
41. Wälti MA, Villalba C, Buser MR, Grünler A, Aebi M y Künzler M. 2006 Targete gen silencing in the model mushroom *Coprinopsis cinérea* (*Coprinus cinereus*) by expression of homologous hairpin RNAs. *Eukariot Cell*. 5: 732–744.
42. Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA y Ridgway HJ. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res* 16: 31-44.
43. Worrall JJ, Chet I y Hüttermann A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria sp.* *J Gen Microbiol* 132: 2527-2533.
44. Yaver. DS, Xu F, Golightly EJ y Brown KM. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol* 62: 834–841.

## 9 Anexos

### Soluciones utilizadas:

#### 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

##### a) Solución de acrilamida/Bis 30 %

Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	0.8 g

Aforar a 100 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ.

##### b) Buffer Tris-HCL 8.8

Tris-HCL	18.2 g
SDS	2 g

Se disuelve el Tris-HCl se ajusta el pH a 8.8 y se afora a 100 mL, posteriormente se adiciona el SDS y agita hasta que se disuelva. La solución se conserva a 4° C

##### c) Buffer Tris-HCL 0.5 M pH 6.8

Tris-HCL	6.05 g
SDS	0.4 g

Se disuelve el Tris-HCl se ajusta el pH a 6.8 y se afora a 100 mL, posteriormente se adiciona el SDS y agita hasta que se disuelva. La solución se conserva a 4° C

**d) Buffer tanque 10x (concentrado)**

Tris-base	15 g
Glicina	70 g
SDS	5 g

Se disuelven los primeros dos reactivos y al final se le agrega el SDS).

**e) Buffer tanque 1x (de corrida)**

60 mL de buffer tanque 10x y aforar 600 mL

**f) Buffer de muestra**

Tris-HCl pH 6.8	0.312 mL
Glicerol	0.625 mL
Azul de bromofenol	0.25 mg
SDS	50 mg
H <sub>2</sub> O	1.3890 mL

\*Para hacer geles desnaturalizantes se les adiciona  $\beta$ -mercaptoetanol.

**h) Persulfato de Amonio 10% (prepararlo al momento de realizar el gel)**

**i) TEMED (Sigma)**

**j) Buffer de Fosfatos pH 6.5**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11.3891
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.8472

Ajustar el pH a 6.5 y aforar a 1L.

## 2. Soluciones para Extracción de ADN

### a) Tampón de lisis

Reactivo
Tris-HCl 0,2 M pH 8.0
EDTA 100 mM pH 8.0
SDS 1% (p/v)

### b) Fenol Neutro:

Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase superior acuosa y la inferior fenólica. El fenol así preparado se conserva a 4° C en un recipiente opaco, manteniéndose durante al menos un mes.

### c) CIA:

Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

### d) Fenol-CIA:

Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y CIA.

### e) TE:

Reactivo
Tris-HCl 0,2 M pH 8.0
EDTA 100 mM pH 8.0

**f) Etanol 70%**

**g) Etanol absoluto**

**h) Isopropanol**

### **3. Soluciones para células competentes**

**a) Cloruro de calcio 50 mM**

**b) Cloruro de calcio 100 mM**

### **4. Soluciones para la extracción de ADN plasmídico**

**a) STET**

Tris-HCl 10 mM pH 8.0

Sacarosa 8%

tritón X-100 0.5 %

EDTA 50 mM, pH 8.0.

**b) Lisozima en una concentración de 10 µg/mL**

**c) Acetato de sodio 3M a pH 5.2**

**d) Isopropanol**

### **Medio de cultivo utilizado para bacterias**

**Medio Luria–Bertani (LB):** Medio de cultivo utilizado para la propagación y conservación de las cepas de *Escherichia coli*.

Bacto-triptona            10.0 g

NaCl                        10.0 g

Extracto de levadura   5.0 g

Agua destilada c.s.p.   1L

Se ajustó el pH a 7.5 con KOH 0.1 M.

Cuando fue necesario utilizarlo como medio sólido (Medio LA) se adicionó agar bacteriológico 2 % (p/v), se esterilizó y se vertieron 30 mL de medio en cajas Petri.

Para la selección de las bacterias transformantes se agregó ampicilina a una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$ .