

CONTENIDO

1.1	INTRODUCCIÓN	3
1.2	ANTECEDENTES	6
1.2.1	Tintes sintéticos	6
1.2.2	Efluentes de la industria textil	7
1.2.3	Tratamientos para la remoción de tintes textiles	8
1.2.4	Hongos de la podredumbre blanca (HPB)	9
1.2.5	Enzimas ligninolíticas: Lacasas	10
1.2.5.1	Propiedades bioquímicas de las lacasas	11
1.2.5.2	Mecanismo catalítico de las lacasas	14
1.2.6	Biología molecular de las lacasas	15
1.2.6.1	Análisis de las secuencias de genes lacasas	17
1.2.6.2	Regulación por las regiones no traducidas (UTRs) del ARNm	19
1.2.7	Aplicación de las lacasas y hongos de la podredumbre blanca en procesos de bioremediación	21
1.2.8	Ingeniería genética aplicada a la biorremediación	25
1.2.9	Estrategias para el aislamiento de genes	27
1.2.9.1	RACE-PCR	27
1.2.9.2	ADN walking	28
1.2.10	<i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	29
1.3	REFERENCIAS	31
1.4	JUSTIFICACIÓN	50
1.5	OBJETIVOS	51
1.5.1	Objetivo general	51
1.5.2	Objetivos específicos	51
1.6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	52
CAPITULO 2 Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 and analysis of the 5' untranslated region (5' UTR)		53
2.1	Abstract	54
2.2	Introduction	54
2.3	Materials and methods	56
2.3.1	Fungal strain, media and culture conditions	56
2.3.2	Extraction of total RNA	57
2.3.3	Cloning of full length cDNA of laccase gene by 5'/3' RACE	57
2.3.4	Bioinformatics Analysis	57
2.4	Results and discussion	58
2.5	Conclusions	68
2.6	References	69
CAPITULO 3 Análisis de la expresión diferencial de los genes lacasa <i>lac-B</i> y <i>lac-T</i> de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en un efluente textil		74
3.1	Introducción	74
3.2	Materiales y métodos	77
3.2.1	Preparación del residuo de toronja	77
3.2.2	Efluente textil	77
3.2.3	Cepa y medios de cultivo	77
3.2.4	Cuantificación de lacasas	78
3.2.5	Remoción de color del tinte y efluente por absorbancia	78

3.2.6 Aislamiento de ARN total de micelio y cuantificación por espectrometría.....	79
3.2.7 Diseño de cebadores y análisis de la expresión de lacasas por PCR tiempo real.....	79
3.3 Resultados y discusión	81
3.3.1 Producción de lacasas y decoloración de un tinte y efluente textil.....	81
3.3.2 Expresión de los genes lacasa por qPCR.....	86
3.4 Conclusiones	90
3.5 Referencias.....	91
CAPITULO 4 Aislamiento y caracterización de los genes lacasa <i>lac-B</i> y <i>lac-T</i> por medio de la técnica ADN walking	98
4.1 Introducción	98
4.2 Materiales y métodos	100
4.2.1 Microorganismo.....	100
4.2.2 Medio de propagación.....	100
4.2.3 Medio para la producción de inóculo	100
4.2.4 Preparación de la toronja como residuo lignocelulósico	100
4.2.5 Medio basal o salino.....	101
4.2.6 Medio con cáscara de toronja	101
4.2.7 Aislamiento de ADN genómico	101
4.2.8 Amplificación del gen lacasa mediante la técnica genome walking	102
4.2.9 Análisis bioinformático.....	102
4.3 Resultados y discusión	103
4.4 Conclusiones	115
4.5 Referencias.....	116
CAPITULO 5.....	121
5.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	121
5.2 Perspectivas.....	122
5.3 Anexos.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Sitios de cobre de las lacasas.....	12
Figura 1.2 Estructura tridimensional de lacasas de <i>Coprinus cinereus</i> . Region amino terminal (azul), carboxilo terminal (rojo). Las esferas representan los átomos de cobre, tipo 1 en azul y el par tipo 3 amarillo	13
Figura 1.3 Mecanismo catalítico de las lacasas.....	14
Figura 1.4 Motivos reguladores dentro de la región 5' UTR.	20
Figura 2.1 Nucleotide and amino acid sequence of the <i>lac-B</i> gene. The secretion peptide is double underlined, the potential sites of N-glycosylation are shown in boxes, and the four-conserved laccase domains are underlined. An asterisk shows the stop codon. The nucleotides are differentiated with respect to the sequence of the <i>lac-T</i> gene.	59
Figura 2.2 Nucleotide and amino acid sequence of the <i>lac-T</i> gene. The secretion peptide is double underlined, the potential sites of N-glycosylation are shown in boxes, and the four-conserved laccase domains are underlined. An asterisk indicates the stop codon. Highlights show the different nucleotides with respect to the sequence of the <i>lac-B</i> gene.	60
Figura 2.3 Alignment of the amino acid sequence of laccase genes of <i>T. hirsuta</i> Bm-2 and other ligninolytic fungi. The identical residuals are shown with asterisks. The four-conserved laccase domains are indicated in boxes.....	63
Figura 2.4 Phylogenetic relationship of laccase genes of <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 with other laccase genes. The MEGA 7.0 program and the Likelihood method with 1000 bootstrap were used to construct the tree from cDNA sequences obtained from the database within the NCBI. The <i>lac-B</i> and <i>lac-T</i> genes of <i>T. hirsuta</i> Bm-2 are shown with circle symbols.	64
Figura 2.5 Predicted secondary structure of 5'UTR regions in <i>lac-B</i>	65
Figura 2.6 Predicted secondary structure of 5'UTR regions in <i>lac-T</i>	66
Figura 3.1 Decoloración del índigo carmín y actividad de lacasas durante el cultivo de <i>T. hirsuta</i> en medio basal y medio basal con tinte. a) actividad lacasa y decoloración, b) color antes y después del tratamiento.....	82
Figura 3.2 Decoloración del índigo carmín y actividad de lacasas durante el cultivo de <i>T. hirsuta</i> suplementado con cáscara de toronja y cáscara de toronja con tinte. a) actividad lacasa y decoloración, b) color antes y después del tratamiento.....	83
Figura 3.3 Decoloración y actividad de lacasas durante el cultivo de <i>T. hirsuta</i> en un efluente textil con medio basal. a) actividad lacasa y decoloración, b) color antes y después del tratamiento.	84
Figura 3.4 Decoloración y actividad de lacasas durante el cultivo de <i>T. hirsuta</i> en un efluente textil suplementado con cáscara de toronja. a) actividad lacasa y decoloración, b) colorantes y después del tratamiento.....	85
Figura 3.5 PCR punto final con los cebadores diseñados para PCR tiempo real. M: Marcador molecular de 1kb. 1: Primer par de cebadores para amplificar <i>lac-B</i> (FB1 y RB1), 2: Segundo par de cebadores para amplificar <i>lac-B</i> (FB2 y RBT2), 3: Primer par de cebadores para amplificar <i>lac-T</i> (FT1 y RT1), 4: Segundo par de cebadores para amplificar <i>lac-T</i> (FT2 y RBT2), 5: Control negativo, 6: Control positivo (actina).....	87

Figura 3.6 Niveles transcripcionales de genes lacasa de *T. hirsuta* Bm-2 en diferentes tiempos y cultivos. a) tinte y medio basal, b) tinte y cáscara de toronja, c) efluente y medio basal, d) efluente y cáscara de toronja. Las barras negras corresponden a *lac-T* y las blancas a *lac-B*. 88

Figura 4.1 PCR primaria de la técnica ADN walking con el ADNg de *T. hirsuta* Bm-2 en medio a) basal y con b) cáscara de toronja. M: Marcador molecular de 1kb. 1A: templado de ADN DL-1 (*DraI*), 2A: templado de ADN DL-2 (*EcoRV*), 3A: templado de ADN DL-3 (*PvuII*), 4A: templado de ADN DL-4 (*StuI*), 5A: Control negativo, 6A: Biblioteca control de humano (*PvuII*), 7A: Control negativo y 8A: biblioteca de control humano preconstruída. 104

Figura 4.2 PCR secundaria de la técnica ADN walking con el producto de la PCR primaria del hongo en medio a) basal y con b) cáscara de toronja. M: Marcador molecular de 1kb. 1B: Templado PCR primaria 1A, 2B: Templado PCR primaria 2A, 3B: Templado PCR primaria 3A, 4B: Templado PCR primaria 4A, 5B: Templado PCR primaria 5A, 6B: Templado PCR primaria 6A, 7B: Templado PCR primaria 7A y 8B: Templado PCR primaria 8A. En cuadros rojos se muestran los productos de PCR que fueron cortados y purificados. 105

Figura 4.3 Purificación de los productos de la PCR secundaria del hongo en medio a) basal y con b) cáscara de toronja. M: Marcador molecular de 1kb. 1B: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL1 (*DraI*). 2B: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL2 (*EcoRV*). 3B: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL3 (*PvuII*) 4B: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL4 (*StuI*). En cuadros rojos se muestran los productos de PCR purificados que fueron enviados a secuenciar..... 106

Figura 4.4 PCR primaria de la técnica ADN walking con el ADNg de *T. hirsuta* Bm-2 en medio a) basal y con b) cáscara de toronja. M: Marcador molecular de 1kb. 1A: templado de ADN DL-1 (*DraI*), 2A: templado de ADN DL-2 (*EcoRV*), 3A: templado de ADN DL-3 (*PvuII*), 4A: templado de ADN DL-4 (*StuI*), 5A: Control negativo, 6A: Biblioteca control de humano (*PvuII*)..... 107

Figura 4.5 PCR secundaria de la técnica ADN walking con el producto de la PCR primaria del hongo en medio a) basal y con b) cáscara de toronja. M: Marcador molecular de 1kb. 1B: Templado PCR primaria 1A, 2B: Templado PCR primaria 2A, 3B: Templado PCR primaria 3A, 4B: Templado PCR primaria 4A, 5B: Templado PCR primaria 5A, 6B: Templado PCR primaria 6A. En cuadros rojos se muestran los productos de PCR que fueron cortados y purificados. 108

Figura 4.6 Purificación de los productos de la PCR secundaria del hongo en medio basal (1.1- 4.2) y con cáscara de toronja (5.1- 8.2).M: Marcador molecular de 1kb. 1.1, 1.2, 5.1 y 5.2: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL1 (*DraI*). 2.1, 2.2 y 6: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL2 (*EcoRV*). 3.1, 3.2 y 7: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL3 (*PvuII*). 4.1, 4.2, 8.1 y 8.2: Producto proveniente de la PCR secundaria con el templado DL4 (*StuI*). En cuadros rojos se muestran los productos de PCR purificados que fueron enviados a secuenciar..... 109

Figura 4.7 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *lac-B*. El péptido de secreción está doblemente subrayado, los sitios potenciales de N- glicosilación se muestran en cajas, los cuatro dominios conservados de lacasas se encuentran subrayados. El codón de paro se muestra con un asterisco. En minúsculas se muestran los intrones. Resaltado en azul se encuentra la región 5' UTR y resaltado en amarillo la región 3'UTR..... 113

Figura 4.8 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *lac-T*. El péptido de secreción está doblemente subrayado, los sitios potenciales de N- glicosilación se muestran en cajas, los cuatro dominios conservados de lacasas se encuentran subrayados. El codón de paro se muestra con un

asterisco. En minúsculas se muestran los intrones. Resaltado en azul se encuentra la región 5' UTR y resaltado en amarillo la región 3'UTR..... 114

RESUMEN

En este trabajo se aislaron mediante la técnica RACE-PCR dos genes de *Trametes hirsuta* Bm-2, que fueron denominados *lac-B* proveniente del cultivo en medio no inducido (medio basal) y *lac-T* en un medio inducido (cáscara de toronja). Ambos genes mostraron características estructurales típicas de lacasas, como los 4 dominios de unión a cobre, 5 sitios potenciales de glicosilación y un péptido señal conteniendo 23 aminoácidos. Se identificaron 47 mutaciones puntuales silenciosas que no cambiaron la secuencia de la proteína lacasa. La región 3' UTR de ambos genes fue de 268 pb. Sin embargo, las regiones 5'UTR de los genes *lac-B* y *lac-T* mostraron claras diferencias en el largo y número de motivos reguladores que afectan la expresión de lacasas a nivel transcripcional y traduccional. Durante el tratamiento del hongo en el tinte y un efluente textil se observó una expresión diferencial de *lac-B* y *lac-T*. La expresión de *lac-B* fue constitutiva, mientras que los transcritos de *lac-T* variaron en función de las condiciones de cultivo. En el efluente con medio basal, *lac-T* fue sobreexpresado (de 50 a 140 veces con respecto a *lac-B*). Sin embargo, la expresión de *lac-T* disminuyó (a nivel basal) cuando el efluente fue suplementado con cáscara de toronja, lo que sugirió un efecto represor. Estas diferencias podrían ser relacionadas a la inducción por metales y fenoles del efluente y la represión ocasionada por el incremento en la concentración de fenoles cuando la cáscara de toronja fue adicionada. *T. hirsuta* logró decolorar entre el 70-100 % el índigo carmín y el efluente por adsorción al micelio en las primeras etapas de cultivo y posteriormente las lacasas removieron el color en el micelio fúngico. En el medio con efluente y cáscara de toronja se incrementó drásticamente la actividad de lacasas (16,000 U/ml) pero la expresión de *lac-B* y *lac-T* fue baja, lo que sugiere que otras lacasas pudieron ser expresadas. Con la técnica de ADN walking se obtuvo la secuencia de ADN genómico de ambos genes. El análisis de las secuencias mostró la presencia de tres intrones en *lac-B* y cuatro en *lac-T*. Se extendió la región "upstream" de *lac-B*, sin embargo, no se lograron identificar elementos promotores, ni otras secuencias relevantes para la expresión de genes, por lo que será necesario realizar otros estudios. Los resultados obtenidos en este

trabajo permitieron avanzar en el conocimiento de los genes lacasas de *T. hirsuta* Bm-2 y corroboraron el potencial de estas enzimas en el tratamiento de efluentes textiles.

SUMMARY

In this work, two genes of *Trametes hirsuta* Bm-2 were isolated by the RACE-PCR technique, which were called *lac-B* from the culture in uninduced medium (basal medium) and *lac-T* in an induced medium (grapefruit peel). Both genes showed typical structural characteristics of lacases, such as the 4 copper binding domains, 5 potential glycosylation sites and a signal peptide containing 23 amino acids. 47 silent point mutations were identified that did not change the sequence of the lacase protein. The 3'UTR region of both genes was 268 bp. However, the 5'UTR regions of the *lac-B* and *lac-T* genes showed clear differences in the length and number of regulatory motifs that affect the expression of lacases at the transcriptional and translational levels. During the treatment of the fungus in the dye and a textile effluent a differential expression of *lac-B* and *lac-T* was observed. *Lac-B* expression was constitutive, while *lac-T* transcripts varied depending on culture conditions. In the effluent with basal medium, *lac-T* was overexpressed (50 to 140 times with respect *lac-B*). However, *lac-T* expression decreased (at baseline) when the effluent was supplemented with grapefruit peel, which suggested a repressive effect. These differences could be related to the induction by metals and phenols of the effluent and the repression caused by the increase in the concentration of phenols when the grapefruit peel was added. *T. hirsuta* was able to discolor between 70-100% the indigo carmine and the effluent by adsorption to the mycelium in the early stages of cultivation and subsequently the lacquers removed the color in the fungal mycelium. In the medium with effluent and grapefruit peel, the activity of lacases (16,000 U/ml) was drastically increased but the expression of *lac-B* and *lac-T* was low, suggesting that other laccases could be expressed. With the DNA walking technique, the genomic DNA sequence of both genes was obtained. Sequence analysis showed the presence of three introns in *lac-B* and four in *lac-T*. The "upstream" region of *lac-B* was extended, however, it was not possible to identify promoter elements, or other sequences relevant to gene expression, so other studies will be necessary. The results obtained in this work allowed us to advance in the knowledge of the lacquer genes of *T. hirsuta*

Bm-2 and corroborated the potential of these enzymes in the treatment of textile effluents.