



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## **Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas**

### **Centro de Investigación en Dinámica Celular**

**"Expresión y caracterización de hidrofobinas aisladas del  
hongo halófilo obligado Wallemia ichthyophaga"**

## **T e s i s**

para obtener el título de

**Licenciado en Ciencias en el área terminal en Bioquímica  
y Biología Molecular**

**Presenta**

**Karla Cecilia Luna Galicia**

**Director de Tesis**

**Dra. Maria Del Rayo Sanchez Carbente**

**Cuernavaca, Morelos, 05 de diciembre de 2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, no solo por brindarme un lugar en el laboratorio de Biología Molecular de Hongos y convertirse en una guía en este trayecto (FORDECYT-PRONACES/263954/2020) que no ha sido fácil. Si no también por soportarme en todos los aspectos que tengo que mejorar tanto como alumna y como persona, y gracias por su paciencia a lo largo de este tiempo.

A mis compañeros del laboratorio y al Doctor Yordanis Pérez Llano y al Maestro Jasiel Quintero García, por los consejos, las risas y la convivencia, que gracias a todo eso es que personalmente he salido adelante.

A mis amigos, a los que traigo conmigo desde hace años y a los que encontré en el camino. A ti Juan y a ti Enrique, mi hermano y mi profe, que sin ustedes sin lugar a dudas hubiera sucumbido a la desesperación de la carrera y de la vida durante este tiempo. A Catalina por ser mi ancla durante la carrera completa.

A mi familia que siempre ha estado a mi lado incondicionalmente, aun si no sabían cómo se llamaba mi carrera y me dijeran que era la "rara de la familia".

A mi mamá y mi papá por ser todo y más. Por apoyarme, soportarme, alentarme y regañarme cuando no lo estaba haciendo bien. No se me olvida nunca que jugamos para el mismo equipo.

*“Carpe diem. Aprovechen el día. Hagan sus vidas extraordinarias”*  
-Sociedad de los poetas muertos

## INDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCION.....	10
1- MARCO TEÓRICO.....	12
1.1 Extremófilos.....	12
1.2 Halófilos.....	14
1.3 Estrategias de halófilia.....	15
1.4 Hongos halófilos.....	16
1.5 Transcriptoma de <i>Wallemia ichthyophaga</i> en condición de salinidad...	16
1.6 Hidrofobinas.....	17
1.6.1 Características.....	17
1.6.2 Funciones biológicas.....	19
1.6.3 Análisis del ensamble de películas de hidrofobinas en salinidad.....	20
1.7 Expresión heteróloga.....	21
2. ANTECEDENTES.....	23
3.JUSTIFICACIÓN.....	24
4.HIPOTESIS.....	25
5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.....	25
6. METODOLOGIA.....	26
• EXPRESIÓN HETEROLÓGA DE LAS HIDROFOBINAS DE <i>W. ICHTHYOPHAGA</i> .....	26
○ Corrección de las hidrofobinas.....	26
○ Transformación de <i>E. coli</i> .....	31

○ Extracción por el metodo de Fenol/Cloroformo.....	33
○ Electroforesis en geles de agarosa.....	33
○ Transformación de <i>P. pastoris</i> .....	34
○ Selección de células transformadas.....	34
○ Colony Blot.....	35
○ Determinación del tiempo de inducción de las hidrofobinas.....	36
○ Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción de Coomassie....	37
○ Purificación de las hidrofobinas.....	37
7. RESULTADOS.....	38
○ Generación de fragmentos de las hidrofobinas sin el péptido señal.....	38
○ Transformación de las construcciones en <i>E.coli</i> .....	43
○ Transformación de las construcciones en <i>P. pastoris</i> .....	47
○ Pruebas preliminares de expresión de colonias con metanol .....	49
8. DISCUSIÓN .....	53
9. CONCLUSIONES.....	54
10.PERSPECTIVAS.....	54
11. BIBLIOGRAFIA.....	55
12. ANEXOS.....	60



## RESUMEN

La mayoría de los organismos que habitan la Tierra crecen de manera óptima en condiciones fisicoquímicas que el hombre considera estándar, pero también existen otros organismos que se han adaptado a ambientes cuyas condiciones fisicoquímicas son extremas. Estos organismos no solo son capaces de sobrevivir en condiciones adversas, sino que pueden crecer de manera óptima en ellas, por lo que se denominan extremófilos “amantes de lo extremo” (Ramírez *et al.* 2004). Entre ellos se encuentran los halófilos: aquellos cuyo óptimo crecimiento se da en presencia de cloruro de sodio ( $\geq 1\%$ ), y los halotolerantes; que tienen su óptimo crecimiento en ausencia de sal, pero son capaces de crecer en medios salinos. Los halófilos se clasifican de acuerdo a sus requerimientos de NaCl en: débiles, moderados y extremos. Entre los microorganismos halófilos se han encontrado una variedad de arqueas, bacterias y eucariotas (DasSarma & Arora, 2001).

Un microorganismo halófilo que ha sido de gran importancia es *Wallemia ichthyophaga* ya que sus respuestas de adaptación a ambientes hipersalinos, han resultado diferentes de las que se han encontrado en otros hongos. El análisis del genoma de *W. ichthyophaga* ha revelado una expansión significativa de 7 familias de proteínas y una contracción de otras 19. Dentro de las familias expandidas más importantes se encuentra la de las hidrofobinas, de las que se identificaron 26 genes que muestran una clara expresión diferencial de los transcritos que codifican para las hidrofobinas, en dependencia de la salinidad del medio. Donde, se observó que 8 genes se sobre expresaban a concentraciones moderadas de NaCl (10%), y 4 más se sobre expresaban a altas concentraciones de NaCl (30%) (Zajc *et al.* 2013).

Las hidrofobinas son un grupo de proteínas pequeñas (20-30 kDa) producidas por hongos filamentosos (ascomicetos y basidiomicetos). Estas proteínas se auto ensamblan en estructuras hidrofílicas-hidrofóbicas formando películas anfipáticas que disminuyen la tensión superficial del agua, permitiendo que las estructuras aéreas de los hongos crezcan en el aire (Szilvay, Nakari-Stelala & Linder, 2006). Actualmente, no se ha explorado cómo la salinidad podría afectar estas propiedades. Llevar a cabo este tipo de estudios es fundamental para entender si el ensamblado o la estabilidad de estas cambia bajo distintas concentraciones de sal y si esto está relacionado con el papel fisiológico de la respuesta a la halófila en los hongos. Es por ello que en este proyecto se tuvo como objetivo expresar tres hidrofobinas del halófilo obligado *W. ichthyophaga*, en el sistema de expresión heterólogo *P. pastoris*, para comprender como la salinidad podría estar generando cambios estructurales en las mismas y llevar a cabo un estudio de las propiedades biofísicas de estas en presencia de distintas concentraciones de NaCl.

Donde, finalmente se obtuvieron las construcciones del vector PICZa con las secuencias que codifican para las hidrofobinas maduras de *W. ichthyophaga* sin el péptido señal nativo, y en marco con el péptido señal del factor de apareamiento de la levadura, expresadas en *P. pastoris*. Además se plantea dentro de las perspectivas llevar a cabo una purificación y caracterización biofísica de las hidrofobinas obtenidas, en presencia de NaCl, para generar hipótesis respecto a su papel en la fisiología del hongo así como comparar el efecto de las distintas condiciones de salinidad (0, 0.5, 1, 2 y 3M) en la dimerización, hidrofobicidad-hidrofilicidad y formación de películas de las hidrofobinas.

## ABSTRACT

Most of the organisms that inhabit the Earth grow optimally in physicochemical conditions that man considers standard, but there are also other organisms that have adapted to environments whose physicochemical conditions are extreme. These organisms are not only capable of surviving in adverse conditions, but can grow optimally in them, which is why they are called "extreme-loving" extremophiles (Ramírez et al. 2004). Among them are the halophiles: those whose optimum growth occurs in the presence of sodium chloride ( $\geq 1\%$ ), and the halotolerant; they have their optimal growth in the absence of salt, but are capable of growing in saline media. Halophiles are classified according to their NaCl requirements as weak, moderate, and extreme. Among the halophilic microorganisms, a variety of archaea, bacteria and eukaryotes have been found (DasSarma & Arora, 2001).

A halophilic microorganism that has been of great importance is *Wallemia ichthyophaga*, since its adaptation responses to hypersaline environments have been different from those found in other fungi. Analysis of the *W. ichthyophaga* genome has revealed a significant expansion of 7 protein families and a contraction of another 19. Among the most important expanded families is that of hydrophobins, of which 26 genes were identified that show a clear differential expression of the transcripts encoding hydrophobins, depending on the salinity of the medium. Where, it was observed that 8 genes were overexpressed at moderate concentrations of NaCl (10%), and 4 more were overexpressed at high concentrations of NaCl (30%) (Zajc et al. 2013).

Hydrophobins are a group of small proteins (20-30 kDa) produced by filamentous fungi (ascomycetes and basidiomycetes). These proteins self-assemble into hydrophilic-hydrophobic structures, forming amphipathic films that lower the surface tension of water, allowing the aerial structures of fungi to grow in the air (Szilvay, Nakari-Stelala, & Linder, 2006). Currently, it has not been explored how salinity might affect these properties. Carrying out this type of study is essential to understand if the assembly or stability of these changes under different salt concentrations and if this is related to the physiological role of the halophile response in fungi. That is why in this project the objective was to express three hydrophobins of the obligate halophile *W. ichthyophaga*, in the heterologous expression system *P. pastoris*, to understand how salinity could be generating structural changes in them and carry out a study of the biophysical properties of these in the presence of different concentrations of NaCl.

Where, finally, the PICZa vector constructions were obtained with the sequences that code for the mature hydrophobins of *W. ichthyophaga* without the native signal

peptide, and in frame with the yeast mating factor signal peptide, expressed in *P. pastoris*. In addition, it is considered within the perspectives to carry out a purification and biophysical characterization of the hydrophobins obtained, in the presence of NaCl, to generate hypotheses regarding their role in the physiology of the fungus as well as to compare the effect of the different salinity conditions (0 , 0.5, 1, 2 and 3M) in the dimerization, hydrophobicity-hydrophilicity and film formation of hydrophobins.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**HFB** - Hidrofobina

**PS**- Péptido señal

**PSN** – Péptido señal nativo

**OEC** – Oligonucleótidos Específicos Cortos

**OEL** – Oligonucleótidos Específicos Largos

**BMG (BMGY)** – Medio con glicerol tamponado (suplementado con extracto de levadura y peptona)

**BMM (BMMY)** – Medio con metanol tamponado (suplementado con extracto de levadura y peptona)

**PCR** – Reacción en cadena de la polimerasa

## INTRODUCCIÓN

Anteriormente se pensaba que la vida no era compatible con ambientes extremos; como lo son; lugares con altas concentraciones de sal, con un pH elevado o muy bajo o bien altas temperaturas, o presiones elevadas, etc. Sin embargo, se han encontrado organismos que pueden vivir en este tipo de ambientes. A estos se les conoce como Extremófilos “amantes de lo extremo”, los cuales prefieren estos ambientes donde la mayoría de los organismos no podrían desarrollarse exitosamente en todos los aspectos (Ramírez, Sandoval, & Serrano, 2004).

Dentro de los extremófilos un grupo particularmente interesante son los Halófilos; organismos cuyo óptimo de crecimiento se encuentra en altas concentraciones de sal (mayores a 1M de NaCl) y cuya clasificación se menciona más adelante. Por otra parte también podemos encontrar a los halotolerantes, cuyo óptimo de crecimiento se encuentra sin presencia de sal, pero pueden llegar a desarrollarse en este tipo de ambientes, aunque no son capaces de reproducirse y realizar funciones metabólicas de una manera eficaz en presencia de altas concentraciones de sal (Gonzales-Hernández, Peña 2002). Estos organismos son de gran importancia para la investigación debido a la gran cantidad de enzimas y biomoléculas de interés biotecnológico que poseen y que podrían aplicarse en campos como la biotecnología alimentaria o de productos fermentados, producción de medicinas, en la biorremediación, entre otros (Ramírez, Sandoval, & Serrano, 2004).

Recientemente, se ha descrito en hongos halófilos como *Wallemia ichthyophaga* y *Aspergillus sydowii* genes que codifican para unas moléculas anfipáticas llamadas hidrofobinas, que se expresan de forma diferencial de acuerdo a la salinidad presente en el medio en el que se desarrollan, y que podrían estar relacionadas con los mecanismos de halófila de dichos hongos, aunque esto no se ha comprobado metodológicamente (Zajc et al., 2013; Pérez-Llano et al., 2020). *W. ichthyophaga* es un hongo único, es un halófilo obligado que crece sólo en concentraciones mayores al 10% (peso/vol) de NaCl llegando a la saturación. En un estudio previo en el modelo de *W. ichthyophaga* se mostró que las hidrofobinas, un grupo de proteínas, se expresan diferencialmente en respuesta a salinidad y los autores sugirieron que estas proteínas pudieran ser un mecanismo novedoso de halófila (Zajc et al., 2013).

Las hidrofobinas son proteínas producidas y secretadas exclusivamente por hongos filamentosos, de tamaño molecular pequeño (20 a 30 kDa) que tienen la capacidad de autoensamblarse en una interfaz hidrofílica-hidrofóbica, que facilita

el contacto del hongo con una superficie, o la ruptura de la tensión superficial, permitiendo la formación de estructuras aéreas (Plemenitaš et al., 2014).

Además, se ha propuesto que forman parte de otras funciones importantes para el desarrollo y crecimiento de los hongos y es probable que estas funciones estén relacionadas con la capacidad para desarrollarse en ambientes hipersalinos. No obstante, el gran número de genes de hidrofobinas presentes en algunos géneros de hongos y los escasos estudios sobre su importancia para la fisiología fúngica permiten suponer que estas proteínas pudieran cumplir muchas otras funciones, además de las conocidas actualmente.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Extremófilos

La mayor parte de los organismos crece de manera óptima en condiciones fisicoquímicas que el hombre considera estándar, como temperaturas entre los 10 y 40°C, pH cercano a la neutralidad (pH 7), con una presión atmosférica estándar de 1 (atm), y un valor cercano a 1 en actividad de agua (aw) (Seckbach & Oren, 2004). Existen otros organismos que se han adaptado a ambientes cuyas condiciones fisicoquímicas son extremas comparadas con el estándar mencionado, como temperaturas superiores a los 60°C, o menores a los 10°C, presión atmosférica mayor o menor a 1, pH ácidos (<3) o alcalinos (>9) a alta incidencia de radiación ultravioleta, poca presencia de agua y medios con alta concentración de sales. Estos organismos no solo son capaces de sobrevivir en condiciones adversas, sino que pueden crecer de manera óptima en ellos, por lo que se denominan extremófilos “amantes de lo extremo” (Ramírez *et al.* 2004).

Los extremófilos que se han descrito hasta el momento pertenecen a los dominios Archaea y Eubacteria. Aunque en las últimas 2 décadas también se ha estudiado a diversos eucariontes con estas características. Se ha descrito que algunos de estos microorganismos presentan adaptaciones particulares, como por ejemplo las proteínas de los halófilos, las cuales presentan un número mayor de aminoácidos ácidos en su composición y/o otros mecanismos de halófila que se mencionan más adelante. (Ramírez *et al.* 2004; Gupta *et al.* 2014).

Los extremófilos se clasifican de acuerdo con sus requerimientos fisicoquímicos. En la tabla 1 se muestran los distintos tipos de extremófilos y las condiciones en las que tienen su óptimo de crecimiento:

Tabla 1. Clasificación de organismos extremófilos (Seckbach & Oren, 2004; Madigan, 2005; Gupta *et al.* 2014).

Factores ambientales	Término	Parámetros	Ejemplo:
<b>Temperaturas altas</b>	Termófilos moderados	50 – 60°C	<i>Chloroflexus auranticus</i>
	Termófilos	60 - 80°C	<i>Thermus acuaticus</i>
	Hipertermófilos	>80°C	<i>Pyrolobus fumari</i>



<b>Temperaturas bajas</b>	Psicrófilos	<15°C	<i>Polaromonas vacuolata</i>
	Psicrófilos facultativos	20-30°C	<i>Heteromita</i>
<b>pH bajo</b>	Acidófilos	pH <2-3	<i>Picrophilus oshimae</i>
<b>pH alto</b>	Alcalófilos	pH >9	<i>Natronobacterium greoryi</i>
<b>Radiación ionizante</b>	Radiotolerantes	Altos niveles de radiación	<i>Deinococcus radiodurans</i>
<b>Presión</b>	Barófilos tolerantes	3, 947.68 atm	<i>Moritella sp</i>
	Barófilos	4,934.61 -5,921.54atm	<i>Metanococcus sp</i>
	Barófilos extremo	9,869.23 atm	MT 41
<b>Actividad de agua</b>	Xerófilos	Baja actividad de agua, >9.85 aw	<i>Ceratonia siliqua</i>
<b>Metales</b>	Metalotolerantes	Altas concentración de metales pesados Zn, Cd, Co, Pb, Cu, Ni, Cr.	<i>Ralstonia metallidurans</i>
<b>Hipersalinidad</b>	Halófilos tolerantes	<5%	<i>Aspergillus</i>
	Halófilos débiles	5 – 10%	<i>Actinopolyspora halophila</i>
	Halófilos fuertes	10-20%	<i>Sterptim onspora</i>
	Halófilos extremos	>20%	<i>Nocardiopsis halophila</i>

También en los ambientes extremos se encuentran organismos denominados “extremo tolerantes” los cuales pueden crecer en condiciones extremas, pero cuyo crecimiento óptimo está en condiciones estándar (Madigan, 2005). En años

recientes los halófilos y los halotolerantes se han convertido en un grupo de interés fisiológico y biotecnológico, debido a que poseen enzimas que toleran alta fuerza iónica, que está relacionada con la concentración de todos los iones presentes en la disolución en la que habitan.

## 1.2 Halófilos

El término halófilo se deriva del griego “halo” que significa sal y “filo” amante, es decir “amante de la sal”. Por lo tanto, aquellos organismos cuyo crecimiento óptimo se encuentra en concentraciones de sal  $\geq 1\%$ , se les denomina halófilos, estos pueden ser clasificados dependiendo de sus requerimientos en: halófilos débiles; que crecen entre 0.2-0.85 M de NaCl (1%-4.96%), halófilos moderados; que crecen entre 0.85-3.4M de NaCl (4.96%-19.86%) y los halófilos extremos; que crecen por arriba de 3.4 hasta 5.1M de NaCl (19.86%-29.8%). Por otro lado los halotolerantes tienen su óptimo crecimiento en ausencia de sal, pero pueden crecer en medios salinos, inclusive a muy altas concentraciones, como *Hortaea werneckii*, que tolera hasta 5M de NaCl. Entre los microorganismos halófilos que han estudiado se encuentra, una amplia variedad de arqueas, bacterias y eucariotas (DasSarma & Arora, 2001). Estos microorganismos halófilos, han aislados de diversos entornos; desde salinas solares artificiales, salmueras naturales en piscinas costeras y submarinas, así como en minas de sal entre otras (DasSarma & DasSarma, 2017). Su habituación en estos entornos posiblemente se deba a que, a lo largo de la evolución los organismos han ido desarrollando diversas propiedades o mecanismos de adaptación a estos ambientes, que ha vuelto su afinidad a la sal en una dependencia por la misma (Meseguer, 2004).

En estos entornos los halófilos tienen que contender con factores como la presión osmótica y la toxicidad iónica, lo cual requiere en algunos casos mantener a los iones internos en baja concentración a pesar de la alta salinidad en el medio. Es debido a esto que los microorganismos han tenido que desarrollar adaptaciones moleculares y celulares que les permiten crecer en estos ambientes salinos a pesar del estrés iónico y osmótico que el entorno les genera (Plemenitas et al., 2014).

Las adaptaciones moleculares que han desarrollado para poder vivir en estos entornos podrían ser una fuente de biomoléculas, como enzimas estables en alta fuerza iónica, biopolímeros y solutos compatibles de importancia biotecnológica y en la industria. También pueden ser valiosos para procesos de biorremediación y biofermentación, además de otras aplicaciones novedosas en la agricultura y la medicina (DasSarma & DasSarma, 2015).

### 1.3 Estrategias de halófilia

En los ambientes hipersalinos la alta concentración de NaCl en el espacio extracelular produce en las células tanto un estrés osmótico como un estrés iónico. El estrés osmótico es causado por la alta concentración de solutos en el exterior, lo que provoca el movimiento del agua desde el interior celular hacia el medio extracelular, llevando a la disminución de la turgencia y la deshidratación de la célula. Por otra parte, el estrés iónico es ocasionado por el aumento de iones de Na<sup>+</sup> en el interior de la célula por encima de los valores tolerables (Serrano, 1996). Debido a esta condición los organismos que viven en estos ambientes han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación que les permite mantener la homeostasis.

Tal como algunas arqueas, que utilizan el mecanismo “Salt in”, en el que la célula permite la entrada de iones de K<sup>+</sup> para igualar la concentración de iones de Na<sup>+</sup> en el exterior (DasSarma & DasSarma, 2015). Otro mecanismo observado es a través de la expresión de transportadores de membrana, los cuales a través de un gradiente químico de protones mantienen en constante funcionamiento la expulsión de Na<sup>+</sup> y la acumulación de K<sup>+</sup>. Por otra parte también existen algunos con la capacidad de establecer un gradiente de Na<sup>+</sup> vía anti-transportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que permite mantener la cantidad de Na<sup>+</sup> por debajo de la del exterior (Gonzales-Hernandez & Peña, 2002).

Por el contrario, la mayoría de las bacterias y organismos eucariontes utilizan la estrategia de “Salt out”, mecanismo donde se excluye el sodio de la célula y donde se regulan la presión osmótica del interior de la célula mediante la acumulación de metabolitos osmóticamente activos, llamados osmolitos o “solutos compatibles” los cuales no tienen efecto negativo en los procesos celulares (Saito & Posas, 2012). Estos pueden ser sintetizados por la célula o bien transportados del espacio extracelular hacia el interior de la misma. Estos compuestos son solubles en agua, sin carga y tienen distintas composiciones como: azúcares (sacarosa, trehalosa), aminoácidos (molécula zwitterionica) (prolina, alanina, glutamina) y polialcoholes (manitol, arabitol, glicerol, y eritritol, entre otros) (Ramirez *et al.* 2004; Madigan, 2005).

Otra adaptación que presentan los hongos que crecen en condiciones de salinidad es la modificación de la estructura de la pared celular (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). Esto podría deberse al recubrimiento generado por unas proteínas estructurales anfipáticas llamadas hidrofobinas, que podrían actuar evitando la entrada de NaCl exterior a la célula. Se ha observado que se estas proteínas se expresan de manera diferencial en condiciones de alta salinidad como se describirá posteriormente.

#### 1.4 Hongos halófilos- *Wallemia ichthyophaga*

Los estudios moleculares de la tolerancia a la sal de los microorganismos halófilos se habían limitado a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas otras levaduras moderadamente halotolerantes. El descubrimiento del hongo extremadamente halotolerante *H. werneckii* y del halófilo obligado *W. ichthyophaga* introdujo dos nuevos organismos modelo para estudiar los mecanismos de tolerancia a la sal en eucariotas (Gunde-Cimerman, 2014; Zalar *et al.* 2015; Plemenitas *et al.* 2014).

*Wallemia* es un género que incluye a 3 especies: *W. ichthyophaga*, *W. muriae* y *W. sebi*. Estos son hongos xerófilos (crecimiento en baja actividad de agua), se encuentran frecuentemente involucrados en el deterioro de alimentos y a menudo son aislados del aire, el suelo y la sal marina (Zacj *et al.* 2013). Debido a que *W. ichthyophaga* crece de manera óptima en presencia de 1.5M de NaCl, tolerando hasta 5M (cercano a la saturación), es considerado un halófilo obligado y el hongo más halófilo conocido hasta la fecha (Zacj *et al.* 2013; Plemenitas *et al.* 2014).

En estudios previos se han descrito diversos mecanismos que podrían estar relacionados la tolerancia al medio salino y alta osmolaridad del hongo *W. ichthyophaga* donde se ha observado que induce la síntesis de solutos compatibles como el arabitol y el glicerol. También mantiene los niveles de K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> intracelular, a través de transportadores de membrana que regulan la entrada y expulsión de estos cationes (Plemenitas *et al.* 2014). Además, este hongo ha mostrado un cambio importante en la pared celular, logrando un engrosamiento de hasta 1.6 veces cuando se encuentra en presencia de una alta concentración de NaCl (2.6M vs 4.3M) (Kuncic *et al.* 2010). Esta estrategia se ha observado también en el halófilo moderado *A. sydowii* (Pérez-Llano *et al.* 2020).

#### 1.5. Transcriptoma de *W. ichthyophaga* en condición de salinidad

Los estudios genómicos y transcriptómicos se han utilizado para poder diferenciar entre grupos de genes que podrían estar participando en ciertas vías que lleven a modificaciones en la estructura y el metabolismo celular. El estudio genómico de *W. ichthyophaga* mostró que tiene un genoma inusualmente compacto de 9.6 Mb de tamaño donde se identificaron 4884 genes que codifican para proteínas. De estos a través de un análisis transcriptómico se determinó que 639 se expresan diferencialmente en dependencia de la concentración de NaCl, 425 se expresan a baja salinidad (al 10% vs 30% de NaCl) y 214 en alta salinidad. (Zacj *et al.* 2013).

A sí mismo, no se encontraron genes relacionados a la reproducción sexual. Esta observación permitió a los autores sugerir que el hongo tiene una estrategia de sobrevivencia altamente especializada debido a que su hábitat hipersalino es “estable”, y no tendría competencia con otras especies (Zacj *et al.* 2013).

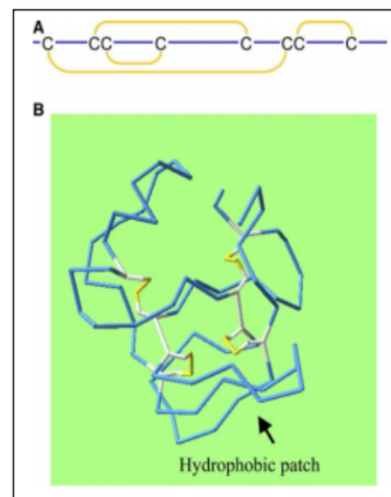
Por otro lado, hubo una notable expansión significativa de 7 familias de proteínas entre los que se encuentran; los transportadores de cationes, transportadores para aminoácidos y particularmente la familia de hidrofobinas, donde se identificaron 26 genes diferentes de esta familia. Además, se ha reportado una expresión diferencial de transcritos de genes que codifican para estas proteínas, dependientes de la salinidad del medio. Del total de genes de hidrofobinas se observó que, 8 genes se sobre-expresaron en la condición con 10% NaCl, y 4 en la condición de 30% NaCl (Zajc *et al.* 2013). Los autores sugieren que la expresión diferencial de estas proteínas podría estar relacionado con la protección al hongo, debido a las características estructurales de estas. Se especula que la presencia de aminoácidos ácidos permite su interacción con el ion Na<sup>+</sup>, evitando su entrada a la célula, estas características particulares podrían brindar protección al hongo contra las condiciones salinas; sin embargo, esto no se ha demostrado experimentalmente. Tampoco se sabe si las hidrofobinas expresadas en alta salinidad podrían cambiar su estructura en dependencia de la concentración de NaCl.

## 1.6 Hidrofobinas

### 1.6.1 Características

Las hidrofobinas son un grupo de proteínas pequeñas (20 a 30kDa) secretadas por hongos filamentosos (Kwan *et al.*, 2006). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de 8 residuos de cisteínas, altamente conservadas que forman 4 puentes disulfuro (Figura 1), los cuales les brindan estabilidad en medios acuosos ya que mantienen su plegamiento y permiten el autoensamblaje en las interfaces hidrofílicas-hidrofóbicas, confiriéndoles una cualidad anfipática (Figura 2) (Szilvay *et al.* 2006).

De manera tradicional, las hidrofobinas se han clasificado en dos grupos, Clase I (HCl) y Clase II



**Figura 1. Estructura de las hidrofobinas de acuerdo a sus Cys (Linder, *et al.*, 2005)**

(HCII), de acuerdo con 3 criterios: el espacio entre cisteínas, la solubilidad y el tipo de película que forman (Bayry et al., 2012).

Entre las características de las Hidrofobinas de clase I se ha observado que, forman una monocapa altamente estable e insoluble por lo que es necesario utilizar ácidos fuertes o reductores de puentes disulfuro para disociarla, como el ácido fórmico, o ditioneitol (DTT). También, los espacios entre cisteínas son variables (siguiendo un patrón: X? – C – X5-7 – C – C – X19-39 – C – X8-23 – C – X5 – C – C – X 6-18 – C – – X 2-13); y finalmente la película en la que se acomodan este grupo de proteínas tiene forma de bastones, los llamados “rodlet” (Figura 3) (Bayry et al., 2012; Prylucka et al., 2017).

En cuanto a las Hidrofobinas de Clase II forman así mismo monocapas, pero son menos estables que las de tipo I y pueden disociarse con alcoholes y detergentes, como etanol al 60% o SDS (Prylucka et al., 2017; Linder et al. 2005); Entre sus características estructurales se sabe que el espacio entre cisteínas en esta clase presenta un patrón conservado (siguiendo el patrón: X? – C – X 9-10 – C – C – X 11 – C – X 16 – C – X 8-9 – C – C – X 10 – C – – X 6-7); la forma de su ensamblaje carece de la formación de “rodlet” en comparación con las de tipo I (Przylucka et al., 2017; Kershaw & Talbot, 1998; Linder et al. 2005).

Por otra parte, existen hidrofobinas que exhiben características de solubilidad intermedia entre ambas clases (Wessels, 1996). Se ha propuesto que podría existir otra clase, Hidrofobinas de Clase III, basado en el criterio de la separación entre cisteínas sin embargo no se ha llegado a una clasificación adicional hasta el momento. (Littlejohn et al., 2012).

A si mismo, como se mencionó, una de las características más importantes de las Hidrofobinas es la capacidad que tienen de autoenzamblarse, en estructuras hidrofílicas-hidrofóbicas que forman películas anfipáticas que disminuyen la tensión superficial del agua permitiendo que las estructuras de los hongos crezcan en el aire (Szilvay, Nakari-Stelala & Linder, 2006). En la figura 3 por ejemplo, se muestran las estructuras que pueden llegar a formarse por la HFBII de *T. reesei*, donde se observan las agrupaciones de hidrofobinas de Clase II, así como el

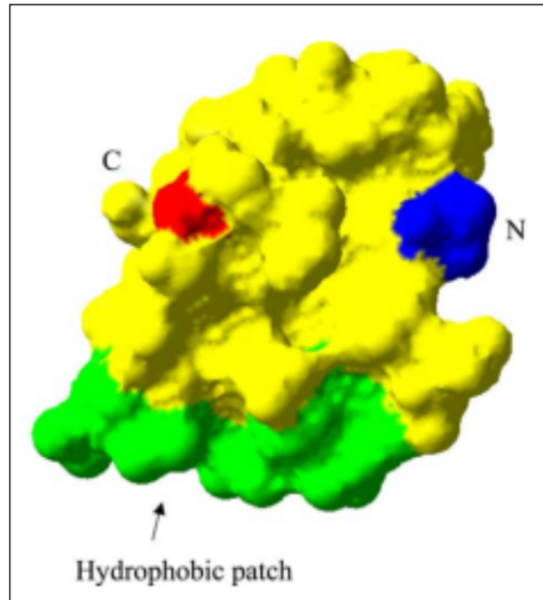
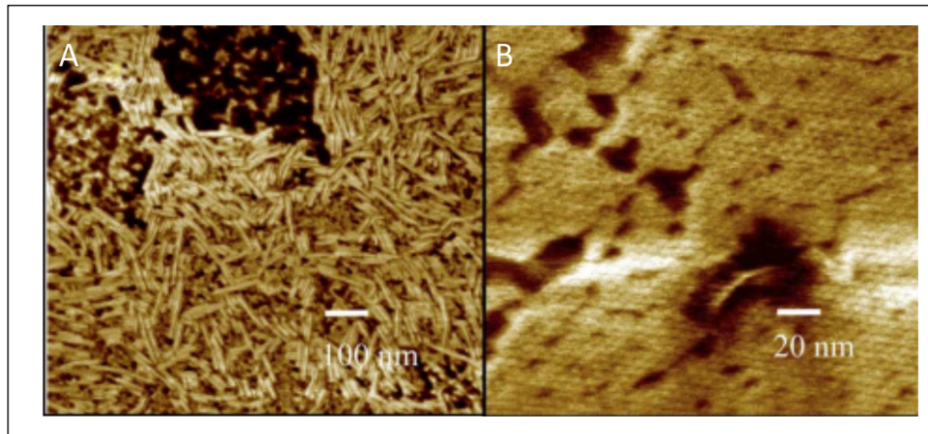


Figura 2. Se muestra el parche hidrofóbico en verde, el resto de la superficie en amarillo sería la parte hidrofílica; la forma anfipática de la proteína (Linder, et al., 2005)

parche hidrofóbico proteico que estaría orientado hacia las superficies hidrofóbicas. Por el contrario en el caso de la adhesión de hifas a superficies hidrofílicas, la cara hidrofóbica se volvería hacia el exterior. También se muestra la formación de “rodlet” de las hidrofobinas SC3 de *S. commune*, que pertenece a la Clase I (Figura 3A) ( Linder et al., 2005).



**Figura 3. Morfología de las hidrofobinas. A) Microscopía de fuerza atómica (AFM) de SC3 de *S. commune* que muestra la forma de rodlets. B) Microscopía de fuerza atómica (AFM) de una película ordenada de HFBI de *T. reesei* en el interfase aire/agua (M.B Linder et al (2005)**

Finalmente, las hidrofobinas en hongos halófilos tienen un mayor porcentaje de residuos ácidos que sus homólogos en hongos no halófilos, una característica típica de proteínas de las arqueas extremófilas (Zajc *et al.* 2013). Esto sugiere que las hidrofobinas podrían tener un papel relevante en el crecimiento micelial en condiciones salinas, razón por la cual se acuñó el término "hidrofobinas halofilas" (Zajc *et al.* 2013; Perez-Llano 2017).

### 1.6.2 Funciones biológicas

La presencia de múltiples genes que codifican para hidrofobinas sugiere que estas pueden expresarse en diferentes etapas del desarrollo del organismo y bajo distintas condiciones ambientales para cumplir diferentes roles funcionales (Plemenitas *et al.* 2014).

Las hidrofobinas participan activamente en el ciclo biológico de los hongos. Generalmente se encuentran recubriendo la pared celular de las hifas aéreas y conidios, que les brinda ciertas propiedades como; resistencia a la humedad, capacidad para generar una interacción con el aire y otras superficies hidrofóbicas. En la Figura 5 se observa la participación de estas proteínas en el recubrimiento de los hongos (Wosten, 2001).

Las hidrofobinas evitan además la permeabilidad al agua mientras mantienen la permeabilidad a los gases, y dan fortaleza y rigidez a la pared celular, a la vez que



modifican el movimiento de solutos a través de esta, esto sugiere que posiblemente estas proteínas estén relacionadas con la capacidad de vivir en ambientes hipersalinos (Wösten *et al.* 2001; Zacj *et al.* 2013).

En cuanto a su ensamblaje se ha observado que forman estructuras complejas como biopelículas. Según Harding (2009), en los hongos esto ocurre en diferentes fases: 1) la unión activa del hongo a una superficie; 2) la formación de colonias etapa I – en esta fase hay un crecimiento de los hongos y las ramificaciones de las hifas se da en forma de monocapa – 3) la formación de colonias etapa II – donde las hifas compactadas se disponen en forma de red y ocurre una adhesión hifa-hifa, así como la formación de canales de agua a través de la estructura (Catrillon *et al.*, 2003).

Se hipotetiza que las hidrofobinas podrían facilitar un empaquetamiento denso del micelio al aumentar su hidrofobicidad, protegiendo así las células de los daños externos.

Además, se sugiere que estas propiedades permiten a las hifas o esporas hidrófilicas extenderse de manera más eficiente en medios acuosos, lo que podría constituir una estrategia ecológica para evadir condiciones estresantes del medio.

Sin embargo estos escenarios no explican el hecho de que el hongo *W. ichthyophaga* exprese diferentes hidrofobinas en diferentes condiciones de salinidad, dejando preguntas sobre la función de las hidrofobinas en el desarrollo de hifas y su relación con la respuesta al estrés salino (Zacj *et al.* 2013; Plemenitas *et al.* 2014).

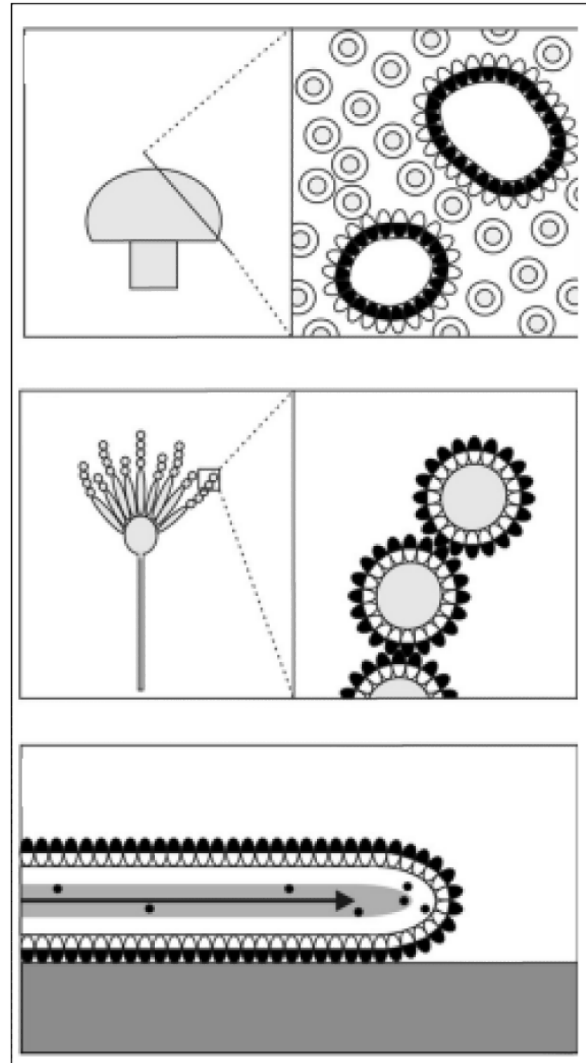


Figura 5. Funciones básicas biológicas de las hidrofobinas (Wosten, 2001).



### 1.6.3 Análisis del ensamble de películas de hidrofobinas en salinidad

Como se mencionó, las Hidrofobinas son capaces de crear estructuras complejas de ensamblaje, existen diversos estudios en los que estos se han analizado como es el caso de Hahl y colaboradores que, en 2019 analizaron la influencia de la fuerza iónica sobre el ensamblado de las hidrofobinas HFBI y HFBII de *T. reseei*, utilizando distintas concentraciones de NaCl. Los resultados obtenidos mostraron que, a mayor fuerza iónica (500 mM NaCl) el ensamblado se logra en menor tiempo, también observaron por microscopía de fuerza atómica que, a mayor concentración de NaCl las agrupaciones eran de mayor tamaño (Figura 4).

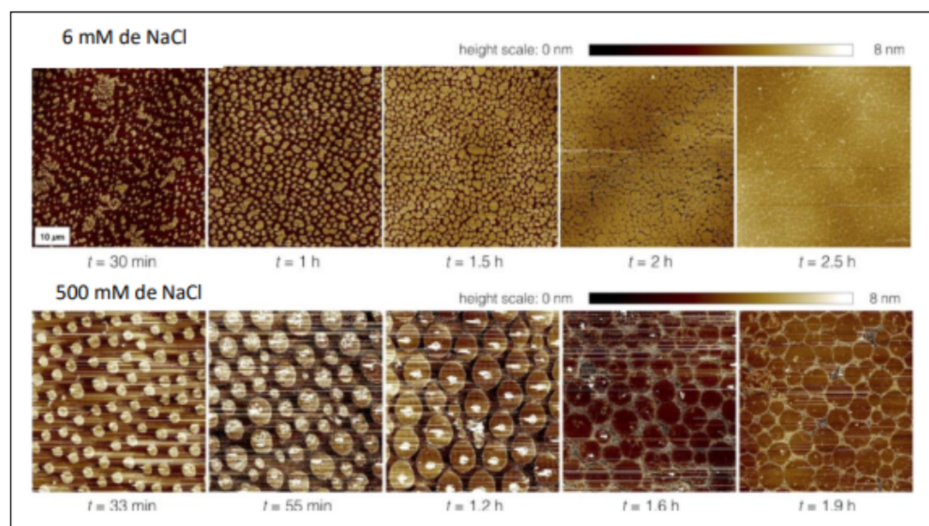


Figura 4. . Efecto de la fuerza iónica en HFBI y HFBII. A) Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) de agrupaciones de HFBI en una fuerza iónica de 6mM y a B) 500 mM (Hähl et al., 2019).

En otro estudio se evaluó la influencia de la fuerza iónica en el tamaño de los “rodlets” de la hidrofobina SC3, en solución, a 3 concentraciones diferentes de NaCl: 0.5 mM, 5 mM, y 10 mM. Donde obtuvieron que a bajas concentraciones de NaCl, los rodlets eran de un tamaño de 134 a 22nm, más largos en comparación con los que se formaron en ausencia de sal (66 a 19 nm). En cambio, a mayor concentración de NaCl (5 y 10mM) se vio una disminución en la longitud de las estructuras (Zywinska et al, 2014). Estos estudios sugieren que la fuerza iónica estaría influenciado el ensamblado de las películas formadas por hidrofobinas (Zacj et al,2013).

A pesar de estos estudios, hasta el momento no se ha comparado la expresión diferencial de las hidrofobinas de hongos halófilos, en baja y alta salinidad así como sus diferencias estructurales, estos estudios podrían dilucidar el papel de las mismas de manera importante y podrían ser desarrollados mediante la

metodología de expresión en sistemas heterólogos de la que se habla a continuación.

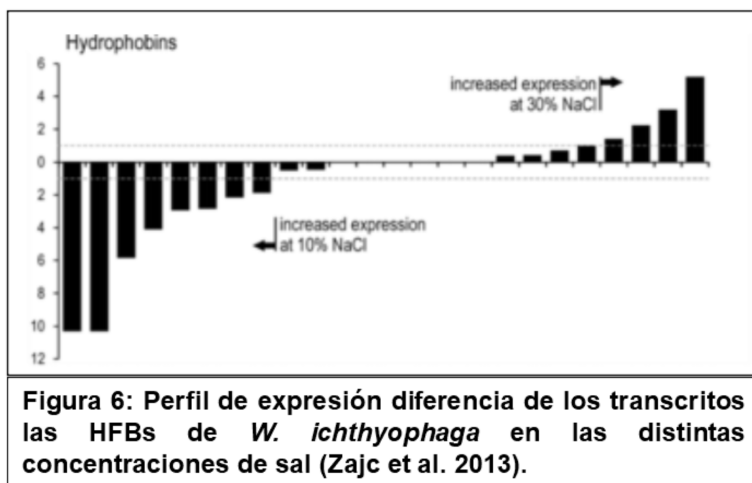
### 1.7 Expresión heteróloga

Los sistemas de expresión heteróloga se basan en la expresión de un gen específico en un organismo que no contiene dicho gen de manera natural. Para esto se utiliza la tecnología de ADN recombinante, donde a partir de una secuencia que codifica para una proteína de interés, se realiza una inserción de la misma en un vector de expresión, que porta promotores constitutivos o inducibles, posteriormente se integra esta construcción en el ADN de una célula hospedera, que se encargará de producirla de manera heteróloga. Este mecanismo de expresión se puede realizar en varios organismos tales como bacterias (*E. coli*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), en células animales (ovocitos de anfibios) o vegetales, que se conocen como Sistemas de Expresión. La elección del organismo en cual se llevara a cabo dicha expresión es fundamental para que la proteína expresada tenga los cambios conformacionales o modificaciones postraduccionales adecuados que aseguren su actividad proteica (Carpeta et al. 2009).

Entre los sistemas de expresión más utilizados en eucariontes, destacan las levaduras: *S. cerevisiae*, *P. pastoris* y *Candida boidinii*, que permiten la producción de proteínas con modificaciones post-traduccionales (Bromme et al., 2004). En estudios previos en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos (UAEM) se ha utilizado exitosamente la cepa de *P. pastoris*, cepa KM71H para realizar expresión heteróloga de genes de interés específicos de hongos. Esta es una levadura metilotrófica que contiene a los genes que codifican para las enzimas alcohol oxidasa, AOX1 y AOX2. El promotor AOX1, regula la expresión de la proteína heteróloga (García – Suarez et al. 2021; Daly & Hearn, 2005). Otros aspectos positivos de esta cepa para su uso en expresión heteróloga son: 1) su capacidad para secretar al medio extracelular las proteínas heterólogas producidas, 2) el bajo costo de los medios en los que se produce, 3) su capacidad de efectuar modificaciones post traduccionales 4) secreta un número reducido de proteínas propias por lo que la purificación de la proteína requerida es más eficiente (Trejo et al., 2009). (García – Suarez et al. 2021) (Cregg et al., 2009)

## 2. ANTECEDENTES

En estudios previos, se reportó que el hongo halófilo *W. ichthyophaga* tiene un número inusualmente grande de genes que codifican para hidrofobinas (HFBs) 26 en total, mientras que *W. sebi* solo tiene 15 genes, y en los hongos del género *Aspergillus* se estiman entre 6 y 10 genes (Pérez-Llano et al., 2020). Algunos de estos se expresan de manera diferencial en respuesta a distintas concentraciones de NaCl. La Figura 6 muestra el perfil de expresión de las HFBs de *W. ichthyophaga*. Los autores sugirieron que las hidrofobinas pueden cumplir una función importante para el crecimiento de los hongos en condiciones de salinidad. Sin embargo, no existen estudios *in vitro* o *in vivo* que prueben el comportamiento de estas proteínas en presencia de distintas concentraciones de sal, así como su expresión diferencial de acuerdo con la salinidad, y si las mismas tienen una relación que favorezca el desarrollo del hongo en estas condiciones.



En el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB-UAEM se realizó un estudio transcriptómico del hongo halófilo moderado *A. sydowii*, a partir de su crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl. Este análisis mostró que, de 5 genes que codifican para hidrofobinas, 3 se expresan de manera diferencial de acuerdo a la salinidad del medio (Pérez-Llano et al 2020). Estos reportes sugieren que posiblemente la presencia diferencial de hidrofobinas permite al hongo adaptarse a una condición de estrés salino. También llevaron a cabo experimentos para intentar expresar de manera heteróloga 3 hidrofobinas de *W. ichthyophaga* y comprender como la salinidad podría estar generando cambios estructurales en estas3. Donde seleccionaron; una hidrofobina que se expresaba en altas concentraciones de sal (30%) (*wiHFB1*), una a concentraciones bajas (10%) (*wiHFB6*) y una cuya expresión no cambiaba en las condiciones mencionadas (*wiHFB3*). Esto tuvo como objetivo de caracterizar y comparar el efecto de las

distintas condiciones de salinidad (0, 0.5, 1, 2 y 3M) en la dimerización, hidrofobicidad-hidrofilicidad y formación de películas de las hidrofobinas.

Las construcciones de estas hidrofobinas fueron donadas por el laboratorio de la Dra. Nina Gunde Cimmerman de la Universidad de Lubjiana en Eslovenia, cuyos marcos abiertos de lectura se clonaron en el vector de expresión para *P. pastoris* pPICZa. Durante la expresión de estas, solo la WiHFB6 se expresaba de manera adecuada, mientras que la wiHFB1 y wiHFB3 tenían baja o nula expresión (Figura 7) (Perez-Llano, 2017). Después de este resultado re-secuenciaron las construcciones y se encontraron que estas contenían la secuencia que codifica para sus respectivos péptido señal, sugieren que probablemente esto impidió la expresión adecuada de wiHFB1 y wiHFB3 de forma heteróloga. Aun hacen falta más estudios para poder realizar la caracterización biofísica de las hidrofobinas en presencia de NaCl.

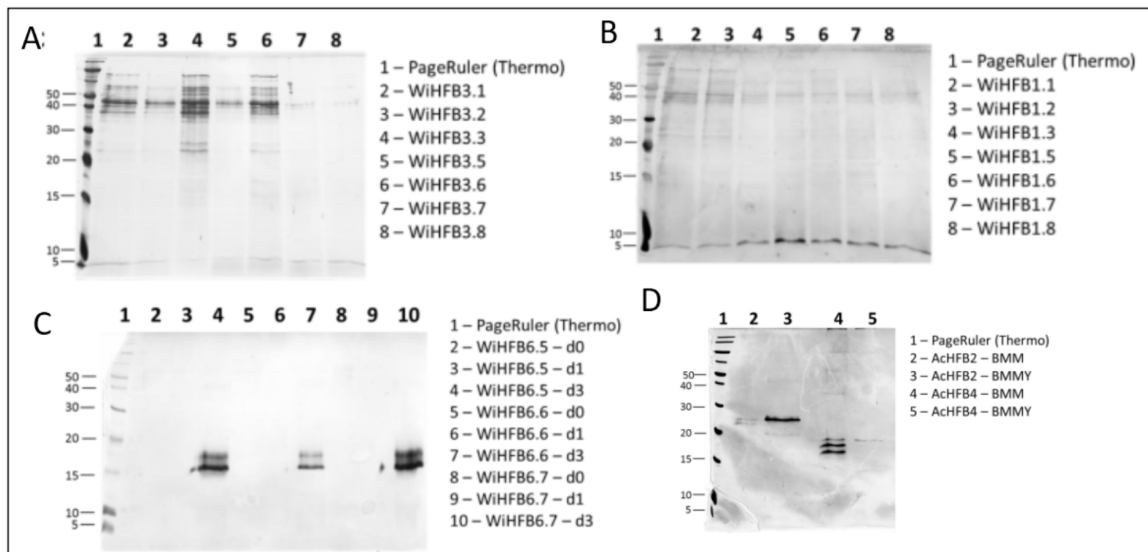


Figura 7. Tamizado de colonias de *P. pastoris* que expresan *WiHFB 1*, *WiHFB 3* y *WiHFB 6* de la tesis de Pérez-Llano. En los geles de poliacrilamida, teñidos con azul de Coomassie se observa que *WiHFB 1*, *WiHFB 3* (A y B) presentaron una baja o nula expresión de la proteína a diferencia de *WiHFB* (C) y de las hidrofobinas *AcHFB2* y *AcHFB4* (D), también evaluadas en el proyecto, donde se ve la presencia de las proteínas en las bandas del tamaño esperado (Tesis de Maestría Yordanis Pérez-Llano, 2017)

### 3.JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de moléculas bioactivas que funcionen bajo estrés salino y altas concentraciones de solutos, es fundamental para generar alternativas en los procesos de la industria biotecnológica haciendo que sean más eficientes y

amigables con el medio ambiente, es por ello que en esta investigación se pretende entender el funcionamiento de las hidrofobinas y su papel biológico ya que en estudios previos se ha observado una clara expresión diferencial de estas proteínas a diferentes concentraciones de sal. Particularmente en *W. ichthyophaga*, sin embargo aún se desconoce la función específica de estas en relación a la adaptación a condiciones hipersalinas. Por ello es importante caracterizar como la salinidad afecta la estructura secundaria y terciaria de estas proteínas y si estos cambios tienen influencia en su papel biológico. Como se mencionó en los antecedentes existen construcciones previas que contienen el péptido señal nativo, que no han sido eficientes en la producción de las hidrofobinas, debido a esto dentro de este proyecto se planteará removerlo para generar nuevas construcciones que sean adecuadas para ser expresadas en el sistema de *P. pastoris*, y así poder estudiar cómo se comportan estas proteínas, biológica y estructuralmente a diferentes concentraciones salinas, para en un futuro poderlas utilizar como herramientas biotecnológicas.

#### 4. HIPOTESIS

El intercambio de péptido señal en las construcciones de las hidrofobinas *WiHFB1*, *WiHFB3* y *WiHFB6* de *W. ichthyophaga* en el vector pPICZa permitirá la expresión adecuada de estas en *P. pastoris*.

#### 5. OBJETIVOS

##### GENERAL

Expresar a las hidrofobinas *WiHFB1*, *WiHFB2* y *WiHFB3* del halófilo obligado *W. ichthyophaga*, en el sistema de expresión heterólogo *P.pastoris*.

##### ESPECIFICOS

- 1) Generar las construcciones que contengan las secuencias codificantes para las hidrofobinas maduras *WiHFB1*, *WiHFB2* y *WiHFB3* de *W. ichthyophaga*, en el vector de expresión pPICZ sin sus péptidos señal nativos.
- 2) Obtener las transformantes de *P. pastoris* con las construcciones pPICZa::*WiHFB1*, pPICZa::*WiHFB2* y pPICZa::*WiHFB3*.
- 3) Determinar el tiempo de inducción para la expresión de las hidrofobinas arriba mencionadas.

## 6. METODOLOGÍA

### EXPRESIÓN HETEROLÓGICA DE LAS HIDROFOBINAS DE *W. ICHTHYOPHAGA*

- CORRECCIÓN DE LAS HIDROFOBINAS

Como se mencionó, las construcciones donadas por el laboratorio de la Doctora Gunde Cimmerman: pPICZa::WiHFB1, pPICZa::WiHFB3 y pPICZa::WiHFB6 de *W. ichthyophaga* contenían a su péptido señal nativo (PSN). Como se muestra en la Figura 8 este fue el vector utilizado previamente en estudios realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos, para las construcciones. En la Tabla 2 se describen las características del vector.

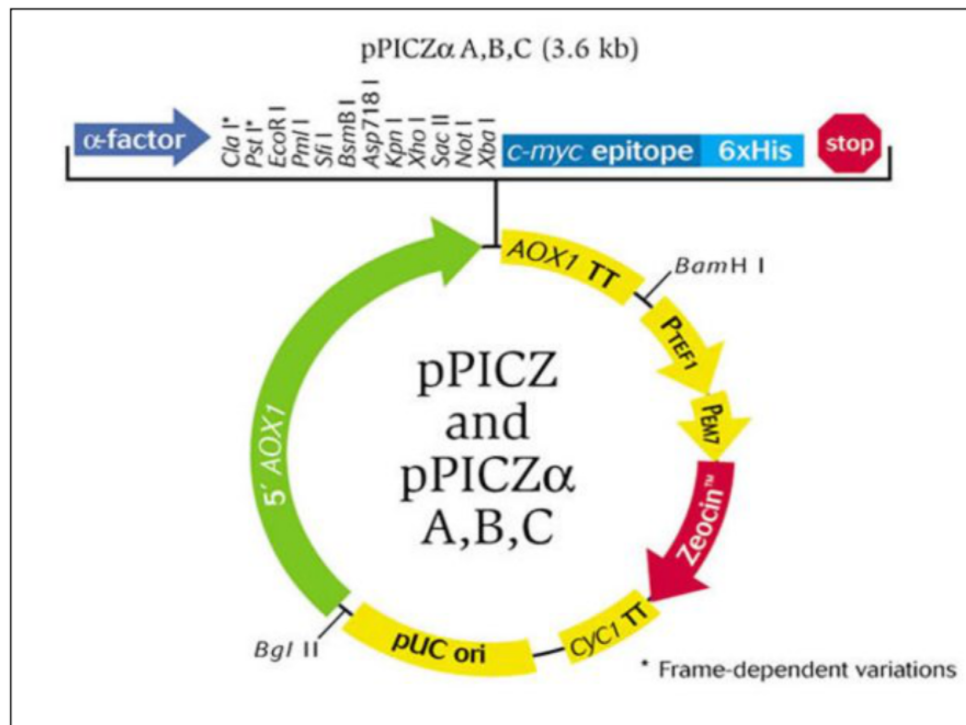


Figura 8. Vector pPICZ utilizado para la expresión heteróloga en *Pichia pastoris*

Tabla 2. Características del vector de expresión pPICZa

Característica	Función
Promotor 5' AOX1	Un fragmento de 942 pb que contiene el promotor AOX1 que permite la expresión inducible por metanol del gen clonado en <i>Pichia pastoris</i> .
Señal de secreción del factor $\alpha$	Permite la secreción eficiente de las proteínas en <i>Pichia pastoris</i> .
Sitio de clonación múltiple	Permite la inserción del gen de interés en el vector de expresión.
Epítotope c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu)	Permite la detección de la proteína de fusión con el Anticuerpo Anti-myc (Evans et al., 1985)
Etiqueta de polihistidina C-terminal (6xHis)	Permite la purificación de la proteína
Región de terminación de la transcripción AOX1 (TT)	Señal nativa de terminación de la transcripción y poliadenilación del gen AOX1 (~ 260 pb) que permite un procesamiento eficaz del ARNm 3', incluida la poliadenilación, para aumentar la estabilidad del ARNm.
Promotor TEF1	Promotor del gen del factor de elongación de la transcripción 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que dirige la expresión del gen de resistencia a Zeocina™ en <i>Pichia pastoris</i> .
Promotor EM7	Promotor procarionte sintético que induce la expresión constitutiva del gen de resistencia Zeocina™ en <i>E. coli</i> .
Gen de resistencia a Zeocina™	Permite la selección de transformantes en <i>E. coli</i> y <i>Pichia pastoris</i> .
Región de terminación de la transcripción CYC1	Extremo 3' del gen CYC1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que permite un procesamiento eficaz del ARNm 3' del gen de resistencia Zeocina™ para aumentar la estabilidad.
Origen pUC	Permite la replicación y el mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i> .

En la Figura 9 se muestra el esquema de la construcción del cDNA de las hidrofobinas, que contenía el PSN, para poder omitirlo se siguió la siguiente metodología; Se diseñaron Oligonucleótidos específicos cortos o OEC-*W*/HFBx, que permitieron amplificar la secuencia posterior al PSN en el 5' y en el 3' a partir del codón de paro, que contenía además la secuencia de reconocimiento para XbaI de tal manera que se obtuvo solo la secuencia de la hidrofobina madura. La secuencia de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3.



Figura 9. Esquema de las construcciones originales de las hidrofobinas dadas por el laboratorio de la Dra. Nina Gunde Cimmerman

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para obtener el fragmento sin el Péptido Señal Nativo de las hidrofobinas, esto se nombraron como: Oligonucleótidos específicos Cortos (OEC).

Clave	Secuencia 5' – 3'
wHFB1 Fw_short	GGCTGGGAGCCAAAGACTGG
wHFB1 Rv	GCTCTAGATTAGATGATT <u>GGGAGAGCGTCA</u>
wHFB3 Fw short	GGCTGGGAATCCAAGACCGG
wHFB3 Rv	GCTCTAGACTAGACGATT <u>GGGAGAGCGTCA</u>
wHFB6 Fw short	GGCTGGGAAGACAAGAGCGAG
wHFB6 Rv	GCTCTAGTTAGACGATT <u>GGGAGAGGGGTA</u>

También se diseñó un segundo par de oligonucleótidos; Oligonucleótidos Específicos Largos o OEL, cuyas características se explicarán más adelante. Estos oligonucleótidos específicos, OEC y OEL, se utilizaron para dos PCR's consecutivas (las condiciones que se detallan en la Tabla 4); el primer par de cebadores permitieron amplificar la secuencia que codifica para la hidrofobina madura sin el PSN. Este producto se utilizó como templado una segunda reacción que permite adicionar en el lado 5' la secuencia de corte para EcoRI y las



secuencias codificantes para el epítipo de Myc y del factor Xa, (las condiciones específicas se mencionan en la Tabla 5).

Tabla 4. Mezclas y condiciones utilizadas para las reacciones de PCR para amplificar los segmentos de hidrofobinas sin PS y para el segmento que contiene las secuencias de myc y XFa en el 5'

Componentes del PCR	Cantidad por reacción	Condiciones del PCR
Buffer (10x)	2.5ul (1x)	95°C-10min 95°C-30" 56°C-30" 72°C-1min } 35 ciclos
Taq pol (5U/ul)	0.2ul (1U)	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.6ul (1.6mM)	
Oligo Fw específico (10uM)	1ul (0.4uM)	
Oligo Rv específico (10uM)	1ul (0.4uM)	
dNTP (2mM)	1ul (0.08mM)	
DNA molde	2ul (~10ng)	
H <sub>2</sub> O	15.7ul	
Total	25ul	

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos Diseñados para adicionar los sitios de restricción, una etiqueta Myc y un sitio de corte Factor Xa.

Clave	Secuencia 5' – 3'	Características
wHFB1 Fw + TAG	CTGAATTCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTG ATCGAAGCTCGTGGCTGGGAGCCAAAGACTGGCTCTT GCAACACTGGCTCTATTCAA...	Sitio EcoRI Etiqueta Myc Sitio de corte Factor Xa Región complementaria a wHFB1
wHFB1 Rv	TCTAGATTAGATGATTGGGAGAGCGTCACAGCCAAGAC CGATTGCAGACT...	Sitio XbaI Región complementaria a wHFB1
wHFB3 Fw + TAG	CTGAATTCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTG ATCGAAGCTCGTGGCTGGGAATCCAAGACCGGCTCCT GTAACACTGGCTCT...	Sitio EcoRI Etiqueta Myc Sitio de corte Factor Xa Región complementaria a wHFB3
wHFB3 Rv	TCTAGAGACGATTGGGAGAGCGTCACAGCCCAAACCG CTGGCGGACTCATCGT...	Sitio XbaI Región complementaria a wHFB3
wHFB6 Fw + TAG	CTGAATTCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTG ATCGAAGCTCGTGGCTGGGAAGACAAGAGCGAGACTG GCTCATGCAACACCGGCAAAG...	Sitio EcoRI Etiqueta Myc Sitio de corte Factor Xa Región complementaria a wHFB6
wHFB6 Rv	TCTAGATTAGACGATTGGGAGAGGGGTACAACCCAAAC CAATAGGCCGTCTGA...	Sitio XbaI Región complementaria a wHFB6

En la Figura 10 se esquematiza el templado que se corrigió y el resultado del primer PCR cuyas condiciones que se mencionan en la Tabla 4.

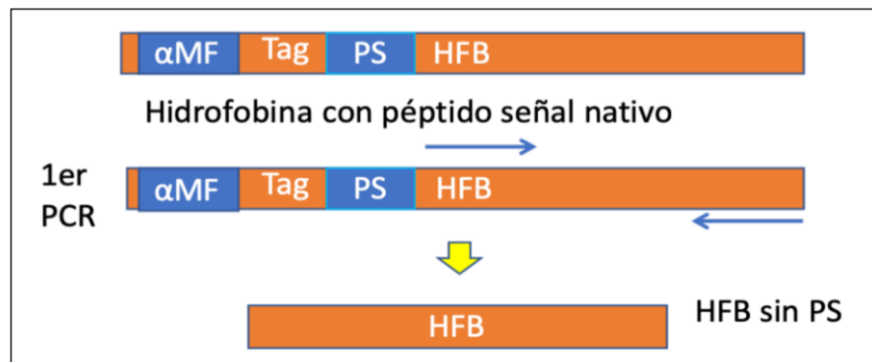


Figura 10. Esquema de la amplificación con los Oligonucleótidos específicos cortos y la hidrofobina Primera sin el PS.

En la figura 11 se esquematiza el resultado obtenido a partir de la segunda amplificación y el amplicón resultante que contiene la etiqueta de myc y el sitio de corte para el factor Xa del lado 5'. Se decidió añadir este epítope en la región amino de la proteína debido a que se ha observado mediante análisis de alineamiento de distintas hidrofobinas que después de la última cisteína hasta el codón de paro se presentan en promedio 10 aminoácidos variables. Esto sugiere que posiblemente sea necesario tener el lado carboxilo corto por alguna razón estructural o de ensamble de la proteína. Además, se añadió la secuencia de corte para la proteasa denominada Factor Xa, con el fin de remover la etiqueta Myc de ser necesario.

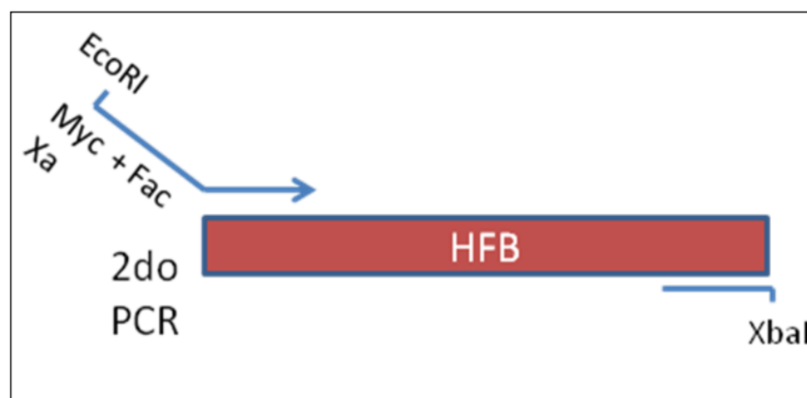


Figura 11. Esquema de la segunda amplificación donde se le adicionan a la secuencia de hidrofobina los sitios de restricción, una etiqueta Myc y un sitio de corte Factor Xa.

Posterior a este procedimiento, se enviaron a secuenciar los resultados analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Con el objetivo de verificar la presencia de las características añadidas en la secuencia. En la Figura 12, se esquematizan las construcciones esperadas para expresar hidrofobinas una vez terminado este proceso.



**Figura 12. Representación grafica de cómo deberían estar las hidrofobinas ahora que se le han insertado las características diseñadas.**

Los productos de PCR se clonaron con el vector de expresión heteróloga pPICZa para *P. pastoris* (Figura 8 y Tabla 2). Tanto el vector como el inserto fueron digeridos con las enzimas EcoRI y XbaI y se ligaron con el kit Thermo Scientific T4 DNA Ligase, para generar células transformadas en *E. coli* cepa DMS1116, mediante electroporación. Las células transformadas se cultivaron en medio LB bajo en sales con Zeocina (25ul/ml) como antibiótico de selección.

Posteriormente, se ajustó la metodología donde, se mandaron a sintetizar las construcciones después de un re-análisis de los datos del transcriptoma para determinar la expresión diferencial de las HFBs, sin el PSN. A partir de esto la metodología fue hecha con las hidrofobinas *WiHFB1*, *WiHFB2* y *WiHFB3*.

- TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* DMS 1116

*Todos los medios y soluciones utilizados se encuentran en la sección de Anexos*

El producto de ligación de cada secuencia de hidrofobinas y el vector, se llevaron a electroporación en el siguiente orden: se tomó una concentración de 100ng totales de las construcciones, se adicionaron 30ul de células electrocompetentes y posteriormente la mezcla se incubó en hielo por 30 min. Una vez pasado este tiempo se transfirieron a cubetas para electroporar y se les dio un choque eléctrico

**Tabla 6. Oligos utilizados durante las reacciones de PCR**

Oligos	Secuencia	Tm °C
Fw- $\alpha$ -Factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	59.0
Rv-3' AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	59.2

de 2000V por 5ms. Finalmente resuspendieron en medio LB (1ml) y se incubaron por 1hr a 37°C. Posteriormente las células se plaquearon en medio LB sólido con Zeocina (25ug/ml) y se dejaron incubando durante toda la noche a 37°C.

Para verificar que colonias obtenidas contenían el inserto se realizó una PCR de colonia con los oligonucleótidos Fw-alfa Factor Rv- 3' AOX. Las condiciones de reacción se describen en la Tabla 6 y los flaqueantes de PCR se pueden observar en la Figura 13. Este PCR se llevó a cabo de la siguiente manera; se tomaron

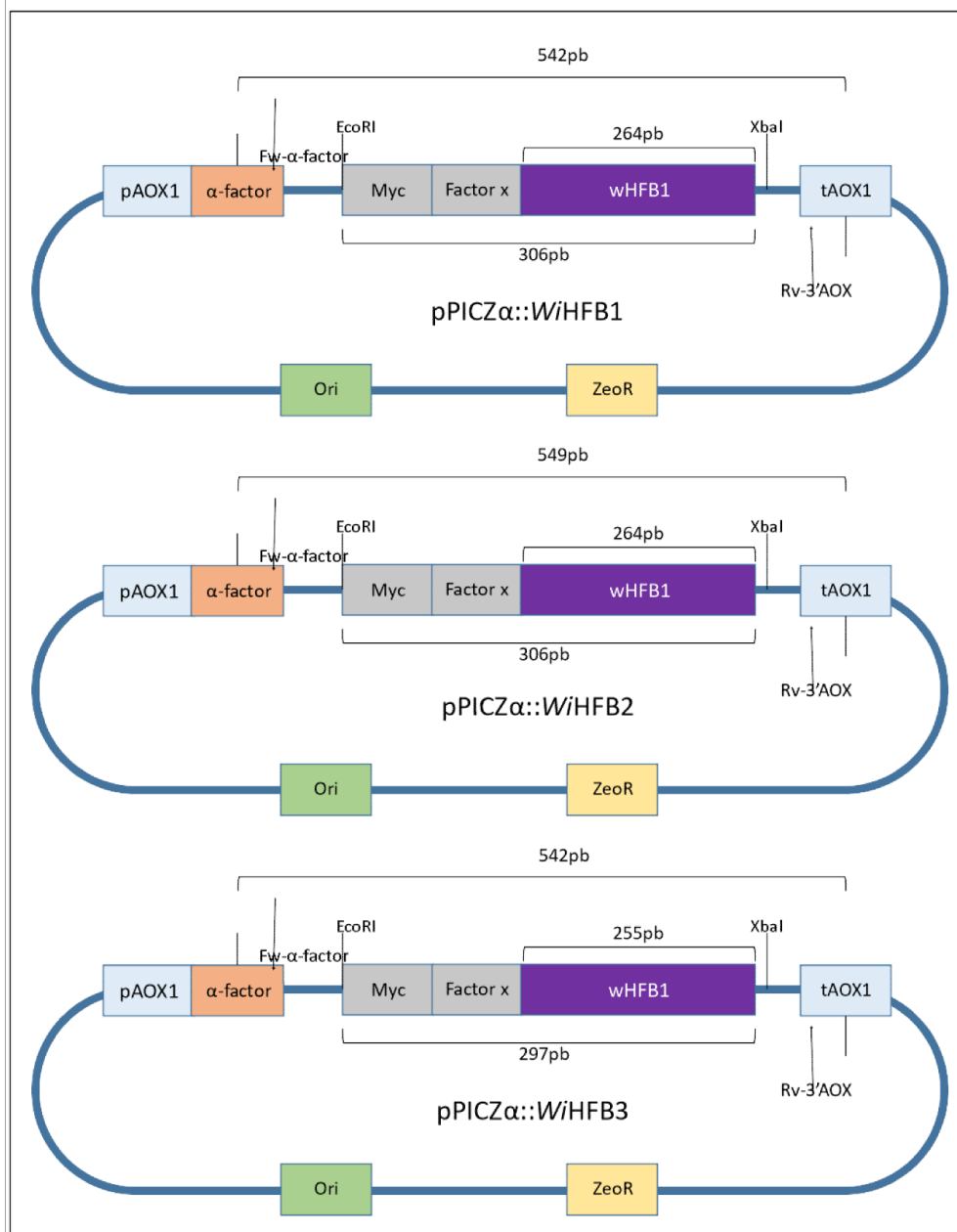


Figura 13: Representación de las construcciones de los vectores de expresión en *P. pastoris* para las hidrofobinas. (A) pPICZα::W/HFB1, (B) pPICZα::W/HFB2 y (C) pPICZα::W/HFB3. Donde vemos con las flechas a los oligonucleótidos Fw-alfa Factor y Rv- 3' AOX utilizados para el PCR de colonia

células de las colonias crecidas previamente con una micropipeta y fueron resuspendidas en 5ul de agua, se incubaron a 95°C por 30 min para liberar el ADN de la célula, y los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Una vez elegidas las colonias, se purificaron las construcciones a partir de un cultivo líquido de 50 ml de LB bajo en sales, adicionado con Zeocina, utilizando dos métodos diferentes; el kit GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific), GeneElute Plasmid Midiprep Kit de Sigma-Aldrich o en su defecto el método de Fenol/Cloroformo de “Molecular Cloning: A laboratory manual” (Cold Spring Harbor Laboratory Presss. 2001), que se describe a continuación.

- EXTRACCION POR METODO DE FENOL/CLOROFORMO

*Todos los medios y soluciones utilizados se encuentran en la sección de Anexos*

Se llevó a cabo la inoculación de una colonia de bacteria transformada, en 50 ml de medio rico (LB) adicionado con antibiótico (Zeocina) y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación constante a 150 rpm. Posteriormente se transfirió el cultivo a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, y se obtuvo una pastilla de células. Estas se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis alcalina I, con vortex y se transfirió a un tubo de microcentrifuga. Se añadieron 400 µl de solución de lisis alcalina II y se resuspendió el contenido invirtiendo el tubo suavemente. Después se añadieron 300 µl de solución de lisis alcalina III, invirtiendo el tubo varias veces. Se Centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos en una microcentrífuga y se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf de 2ml. Posteriormente se agregó un volumen igual de fenol:cloroformo y se mezclaron las dos fases (orgánica y acuosa) mediante agitación con vortex, en seguida se centrifugó a velocidad máxima durante 2 minutos. Después se transfirió la fase acuosa, a tubos Eppendorf limpios y se realizó la precipitación de ácidos nucleicos añadiendo un volumen de isopropanol, se mezcló con vortex y se dejó reposar la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el precipitado por centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Para los lavados de la muestra obtenida se añadió 1 ml de etanol al 70% al precipitado y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se permitió la evaporación del etanol restante. Finalmente, se resuspendió el ADN en 100 µl de agua libre de nucleasas, y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Las muestras de ADN de las diferentes etapas (purificación, digestión y amplificación) se visualizaron en geles de agarosa al 1% de agarosa en buffer TAE 1x, para confirmar la integridad del ADN. La corrida del gel se llevó a cabo en una cámara de electroforesis a 100v durante 40 min.

- TRANSFORMACIÓN DE *P. pastoris* KM71H

Para la obtención de células electrocompetentes se utilizó la cepa de *P. pastoris* – KM71H-. Estas células se prepararon a partir de un cultivo en YPD que se creció durante toda la noche hasta alcanzar la fase exponencial o una O.D entre 1.2 y 1.4. Estas células se lavaron de la siguiente manera; se incubaron durante 20 minutos con una solución de sorbitol estéril, y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min. Esto se realizó para poder almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  manteniendo su integridad y eficiencia de transformación hasta su utilización. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó 3 veces con sorbitol a 1M, finalmente se resuspendieron las células en 1ml de sorbitol 1M.

Por otro lado, se linearizaron entre 11 a 18ug de plásmido con SmaI (Thermo Scientific), y el producto se precipitó con etanol, de la siguiente manera: se añadió 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 7) y 2.5 volúmenes de etanol frío al 100%, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante; se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se volvió a descartar el sobrenadante y se dejó que el etanol se evaporara a temperatura ambiente.

La electroporación se realizó añadiendo 10ug de plásmido lineal a 30ul de células electrocompetentes. Se incubaron por 30 min en hielo y posteriormente se transfirieron a cubetas de electroporación y se les dio un choque eléctrico de 2000 V. Se resuspendieron en YPD con Zeocina (100ug/ml), y se esparcieron en placas de medio sólido YPD +Zeocina. Finalmente se dejaron en una incubadora por 2 días a  $30^{\circ}$ .

- SELECCIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMANTES de *P. pastoris*

*Todos los medios y soluciones utilizados se encuentran en la sección de Anexos*

Se realizó una PCR de colonia de *P. pastoris*, para verificar la presencia del inserto. Para esta PCR se tomaron células de cada colonia con un palillo estéril.

Estas, se resuspendieron en 10ul de agua y se incubaron a 95°C por 10 min para que el ADN sea liberado de la célula. Para esta PCR se volvieron a utilizar los oligonucleótidos Fw-alfa Factor y Rv- 3' AOX (descritos en la Tabla 6 y Figura 13, antes presentadas) y se verificaron los productos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

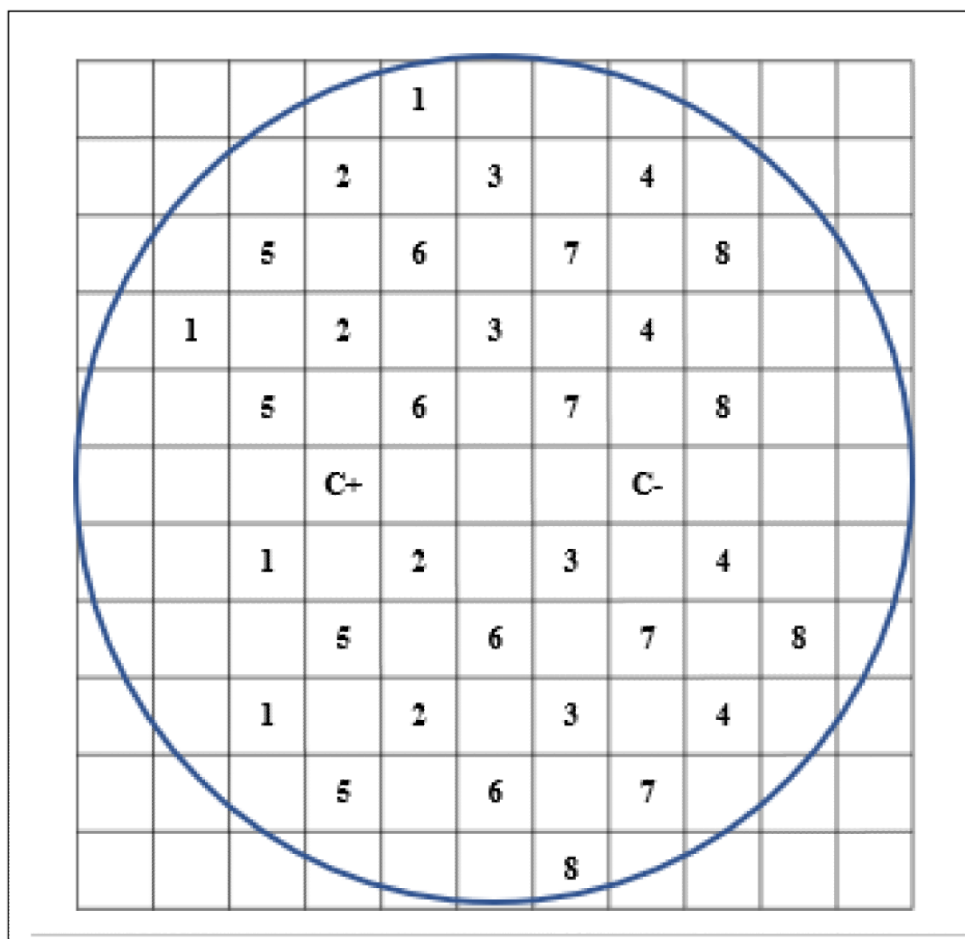


Figura 14. Patron en rejilla utilizado en la siembra de colonias para elegir la que expresa mejor la proteína y el tiempo estimado de inducción. C- es el control negativo, C+ el control positivo y la numeración (1 a 8) corresponde para cada colonia de las diferentes construcciones

- COLONY BLOT - SELECCIÓN DE COLONIAS QUE EXPRESAN A LAS HIDROFOBINAS

*Todos los medios y soluciones utilizados se encuentran en la sección de Anexos*

Se sembraron las colonias en placas con medio BMM (BMMY) en un patrón de rejilla (Figura 14) y se dejaron creciendo por 2 días a 28°C. Se crecieron 4 repeticiones y se midieron a diferentes tiempos; 24, 48, 72 y 96 hrs, adicionando metanol cada día para probar la expresión de las colonias en medio solido con el metanol como inductor. El metanol se colocó en la tapa de la caja petrí y las cajas se colocaron de cabeza en la incubadora de 28°C.

Posteriormente se colocó una membrana de nitrocelulosa (de 0.45mm) sobre los parches celulares y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 2hrs. La membrana se lavó 3 veces con agua estéril por 10 min en agitación a T.A., para eliminar los desechos celulares. Después se lavaron con TBST 3 veces por 5 min, y se dejaron incubando por 1hr 30min con agitación. Se transfirió inmediatamente después a Buffer de bloqueo adicionado con anticuerpo primario (Anti-Cmyc de ratón) en una dilución 1:3,500 y se dejó incubando de 2 hrs. 30 min a 16hrs en agitación a temperatura ambiente.

Para la detección colorimétrica transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron con TBST 3 veces por 10 min y se incubaron nuevamente con el ab secundario, diluido en buffer de bloqueo (anti-mouse IgG- Fosfatasa alcalina marca Sigma Aldrich #A3562) y el aanti-mouse IgG HRP (Cell Signaling Technology #7076). Para la prueba quimioluminiscente se realizó usando una dilución de 1:4,000 durante 1hr 30min en agitación se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBST y se adicionó el sustrato que generó la reacción para visualizar los resultados, en el caso de la prueba colorimetrica fue el sustrato de TR/Naphtho siguiendo las indicaciones del fabricante y para la prueba quimioluminicente se utilizó Chemiluminescent Western Blot Reagents siguiendo las indicaciones del fabricante para su uso.

- DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INDUCCIÓN DE LAS HIDROFOBINAS

*Todos los medios y soluciones utilizados se encuentran en la sección de Anexos*

Para determinar el tiempo ideal de inducción para producir hidrofobinas, se realizaron cultivos de *P. pastoris* en medio BMG. Cuando se alcanzó una OD=2-6, las células se centrifugaron a máxima velocidad por 5 min para separar a las células. Después se pasaron a 5-10mL de medio BMM y se adicionó 1% de metanol cada día, durante 5, días para compensar la pérdida por evaporación.

El cultivo se realizó a 28°C con agitación de 250 rpm y se tomó una muestra del sobrenadante a las: 0hrs, a las 24hrs (1 día), 48hrs (2 días), 72hrs (3 días) y 120



hrs (5 días) del medio BMM. La muestra de los cultivos se analizó mediante SDS-PAGE (al 15%) el cual se tiñó con el azul de Coomassie, para verificar la inducción proteica. Los tamaños esperados de las hidrofobinas con y sin el marcador Myc y el factor Xa se muestran a continuación:

Tabla 7. Tamaños esperados de las hidrofobinas con y sin el marcador Myc y el factor Xa

Hidrofobina	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína (aa)	PM (KDa)	PM con Myc y Fx (KDa)
wHFB1	264	88	9.2	11.5
wHFB2	264	88	9.3	11.6
wHFB3	255	85	9	11.3

- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y TINCIÓN DE COOMASSIE.

*Todos los medios y soluciones utilizados se encuentran en la sección de Anexos*

Los geles se preparan en vidrios para electroforesis vertical. Una vez que los vidrios se colocaron en el soporte de la cámara, se vertió la solución de gel separador entre las placas de vidrio y se dejó reposar en posición vertical hasta que solidificó (10 a 15 min). Posteriormente se vierte la solución del gel concentrador y se coló el peine para formar los pozos, se dejó solidificar entre 10 a 15 min, para poder retirar el peine.

Las muestras fueron preparadas añadiendo buffer 6X, llevándolas a una concentración final de 2X, se calentaron a 95°C por 5 min y se centrifugaron. Posteriormente se cargaron en los pozos y se llevaron a electroforesis, en una cámara vertical a 80 V hasta que la muestra migró casi por completo. Una vez terminada la electroforesis el gel se sacó de los vidrios para su tinción por coomassie, plata o W. B.

La tinción por Coomassie se llevó a cabo de la siguiente manera; se sumergió el gel en un recipiente con solución de tinción y se dejó en agitación constante de 1hr a 16 hrs. Pasado este tiempo se retiró la solución de tinción y se destiñó el gel con agua o solución desteñidora, a temperatura ambiente en agitación suave. La distinción se completó cuando el color de fondo se tornó claro y las bandas de las proteínas contrastaban con el fondo del gel.

- PURIFICACIÓN DE LAS HIDROFOBINAS

*Todos los medios y soluciones utilizados se encuentran en la sección de Anexos*

Una vez identificadas las colonias que expresaban mayor proporción de proteínas, se realizó una fermentación en 100 ml en medio BMG (o BMGY) durante 24 hrs, para generar suficiente masa celular. Posteriormente se indujo la expresión de la proteína. Las levaduras se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 10 ml de medio BMM (o BMMY) a y se incubaron a 28°C a 250 rpm.

La purificación se realizó tomando 25 ml del sobrenadante del medio en tubos Falcon de 50 ml, recolectando la espuma del matraz tras una agitación manual vigorosa durante 4 min. Estos tubos, con la espuma, se almacenaron por 2hr en refrigeración, la espuma estable se recolecto y se lavó dos veces con 5ml de agua destilada. (Lohrasbi et al., 2016). Las hidrofobinas podrían ser separadas por columna de 35 kDa, al ser de un tamaño aproximado a 13 kDa. Este resultado será pasado por una segunda columna de poro más pequeño, 5kDa, así tendría que quedar un concentrado de las proteínas. Se comprobará mediante un gel SDS-PAGE (15%) teñido con azul de Coomassie para verificar la presencia de las hidrofobinas.

## 7. RESULTADOS

Generación de fragmentos de las hidrofobinas sin el péptido señal

Para comprobar la construcción del plásmido con las hidrofobinas; WiHFB1, WiHFB3 y WiHFB6, se realizó una digestión de los mismos con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI. Los fragmentos obtenidos se observaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que se muestra en la Fig. 15.

**Tabla 8. Tamaño de las seuencias que codifican para las hidrofobinas de interés con y sin el péptido señal nativo.**

<b>Clave</b>	<b>Tamaño del Vector</b>	<b>Tamaño del Inserto con vector</b>	<b>Tamaño con PSN</b>	<b>Tamaño sin PSN</b>
WiHFB1	3527pb	3845pb	318pb	267pb
WiHFB3	2527pb	3845pb	318pb	267pb
WiHFB6	3527pb	3851pb	324pb	273pb

En la Tabla 8, se muestran los tamaños del vector utilizado (pares de bases), y se indica el tamaño del fragmento de las hidrofobinas con PSN y sin el PSN que se esperaba obtener después de la primera y segunda amplificación.

En la Figura 15 se observan las bandas obtenidas de la digestión de las construcciones pPicZ::*WiHFB1*, pPicZ::*WiHFB3* y pPicZ::*WiHFB6*, donde se observa que no hubo digestión de ninguno de los plásmidos. Dentro del laboratorio de investigación se comprobó el correcto funcionamiento de las enzimas con otras construcciones en otros proyectos, sin embargo no se logró obtener una digestión adecuada.

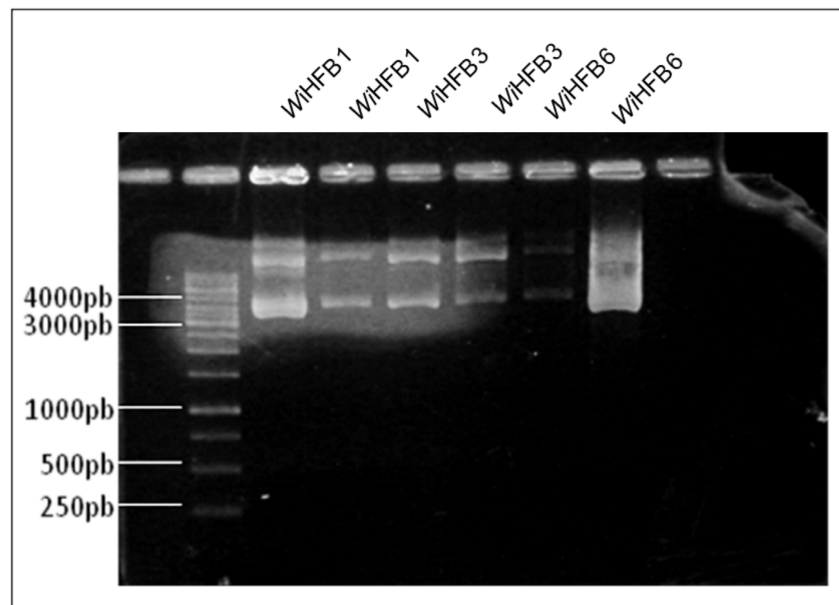


Figura 15. Patrón de digestión de las construcciones pPICZ::*WiHFB1*, pPICZ::*WiHFB3* y pPICZ::*WiHFB6*. Hechas con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. Donde no se observa ninguna banda en el tamaño esperado En gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Con marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb (300 ng)

Posteriormente, se realizó una PCR para obtener el primer amplicón esperado para *WiHFB1* y *WiHFB3*, sin la presencia del PSN, donde se observaron los fragmentos correspondientes a los amplicones (267pb) en el gel de electroforesis, es decir se obtuvo una amplificación esperada. Por otro lado, para la PCR de la *WiHFB6* no se obtuvo ningún resultado, como se puede ver en la Figura 16.

Debido a que la *WiHFB6* no presento amplificación, se mandaron a secuenciar las tres construcciones *WiHFB1*, *WiHFB3* y *WiHFB6*. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias esperadas para cada construcción. Después de este análisis se llegó a la conclusión de que la hidrofobina *WiHFB6* en las muestras correspondía a *WiHFB3*, esto sugiere que esta muestra se etiquetó erróneamente. En la Figura 17 se puede observar la secuencia obtenida y su

comparación con las tres hidrofobinas antes mencionadas, esto se realizó por medio de un alineamiento múltiple (realizado en la plataforma de internet T-coffee).

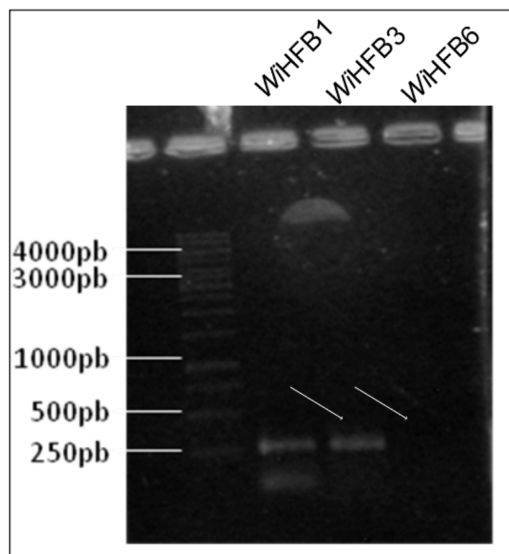


Figura 16: Amplificación de *W/HFB1* , *W/HFB3* y *W/HFB6* con los oligonucleótidos específicos cortos (OEC). Los amplicones observados están en el rango del tamaño (267pb) para *W/HFB1* y *W/HFB3*; pero en el carril de *W/HFB6* no vemos presencia de banda . En gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Con marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 kb (300 ng)

De manera simultánea se realizó la segunda amplificación con los oligonucleótidos OEL. En la Figura 18, se observan los fragmentos obtenidos con el tamaño esperado (314 pb). Estos fragmentos corresponden a *W/HFB1* y *W/HFB3* sin el PSN, que se utilizarían para la transformación en el vector Ppicz.

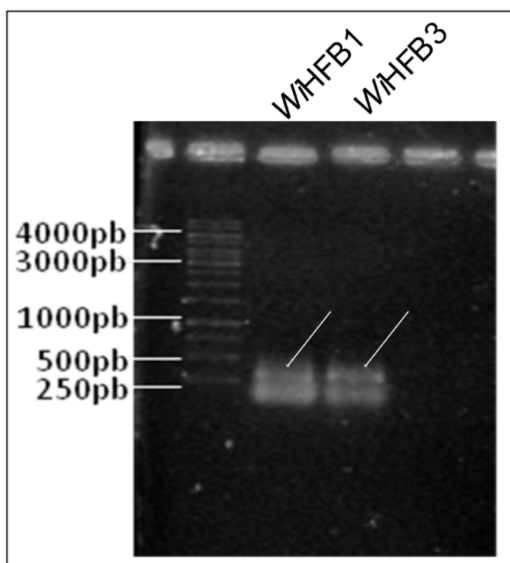


Figura 18. Amplificación de *W/HFB1*, *W/HFB3* y *W/HFB6* con los oligonucleótidos Específicos Largos (OEL). Carril 1: Marcador de peso Molecular, Carril 2 y 3: Ampliaciones esperados de *W/HFB1* y *W/HFB3* (314pb). Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.



condición de 10% de NaCl y la HFB3 cuya expresión es similar en ambas condiciones (Figura 19).

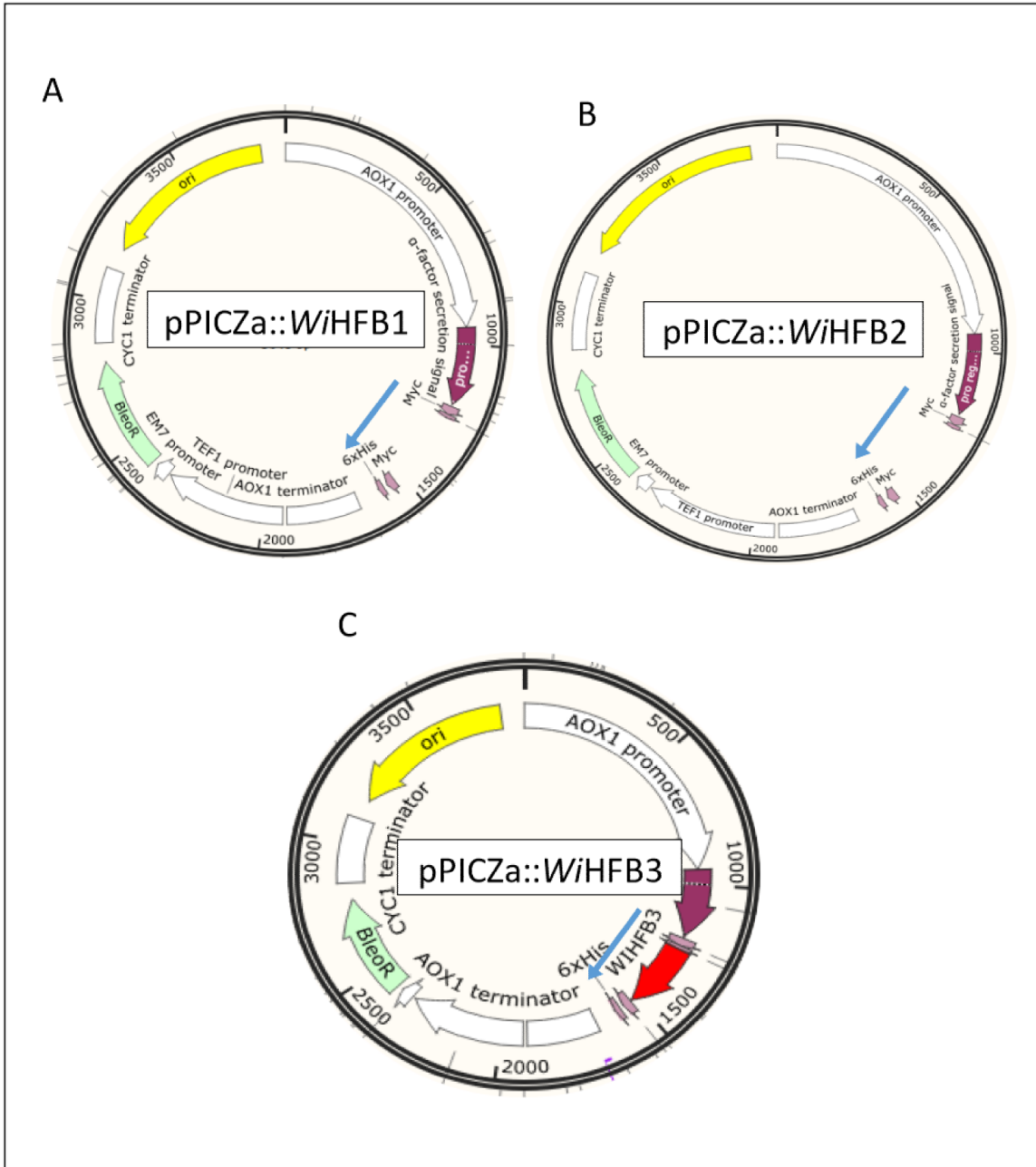


Figura 19: Mapas de las construcciones pPICZa::WiHFB1, pPICZa::WiHFB2 y pPICZa::WiHFB3, con sus tamaños en el vector. 3848 pb, 3648 pb y 3839 respectivamente. Estas fueron las construcciones que se decidieron utilizar en lugar de las que se habían estado trabajando. Las flechas señalan la ubicación de las hidrofobinas, A) para HFB1, B) para HFB2 y C) para HFB3

Estas construcciones se enviaron a sintetizar en la compañía coreana Macrogen, y se obtuvieron las construcciones pPICZa::WiHFB1, pPICZa::WiHFB2 y pPICZa::WiHFB3 (Figura 20).

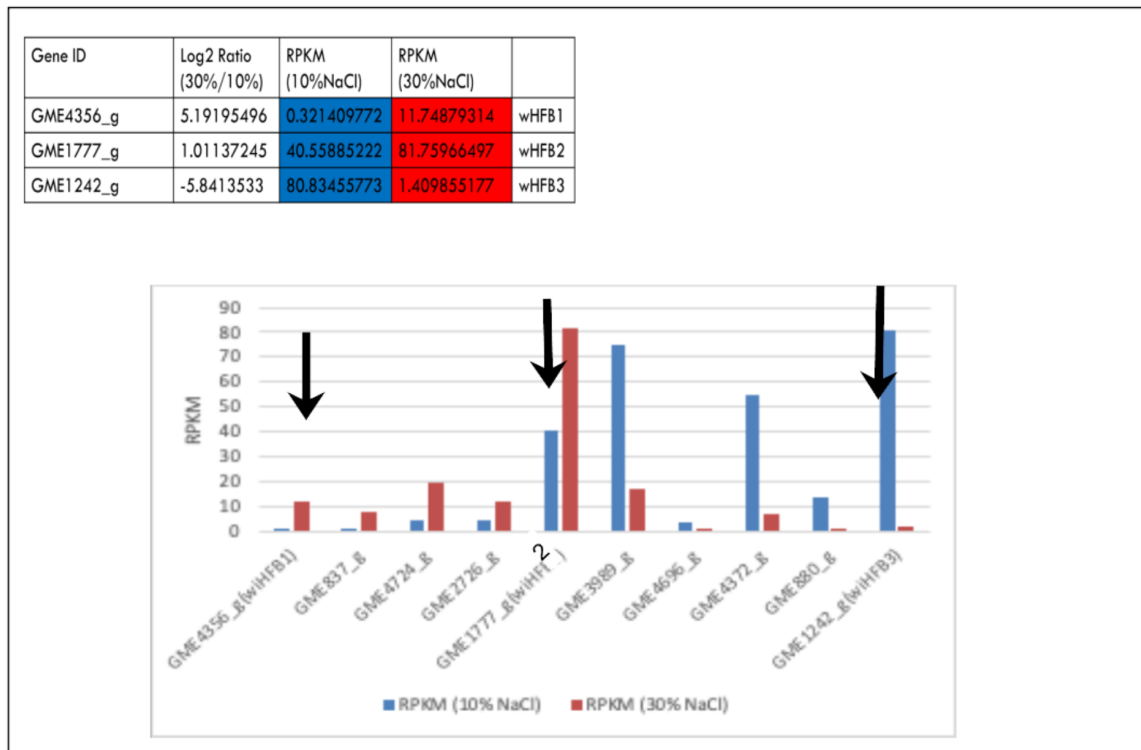


Figura 20. Perfil de expresión diferencial de los transcritos las HFBs de *W. ichthyophaga* en dos distintas concentraciones de sal.

### Transformación de las construcciones en *E. coli* DMS1116

Las construcciones que fueron sintetizadas se transformaron en *E. coli* DMS1116. Se realizó una PCR de colonia para verificar la presencia del vector con el inserto, donde se utilizaron los oligos Fw\_α\_Factor y Rv\_3'AOX, que flanquean al gen de interés Figura 21. En la Tabla 9 se pueden observar los tamaños esperados.

Tabla 9. Tamaños de las secuencias que codifican para las hidrofobinas de interés. Y el tamaño del producto de PCR con los oligos Fw-alpha-factor y Rv-3-AOX

	Tamaño del amplicon	Tamaño del vector vacío	Tamaño del inserto con el vector	Tamaño del inserto
pPICZαA::EAS	543 pb	3527 pb	3837 pb	310 pb
pPICZαA::RodA	708 pb	3527 pb	4002 pb	475 pb
pPICZαA::WiHFB1	542 pb	3527 pb	3791 pb	264
pPICZαA::WiHFB2	549 pb	3527 pb	3791 pb	264
pPICZαA::WiHFB3	542 pb	3527 pb	3782 pb	255



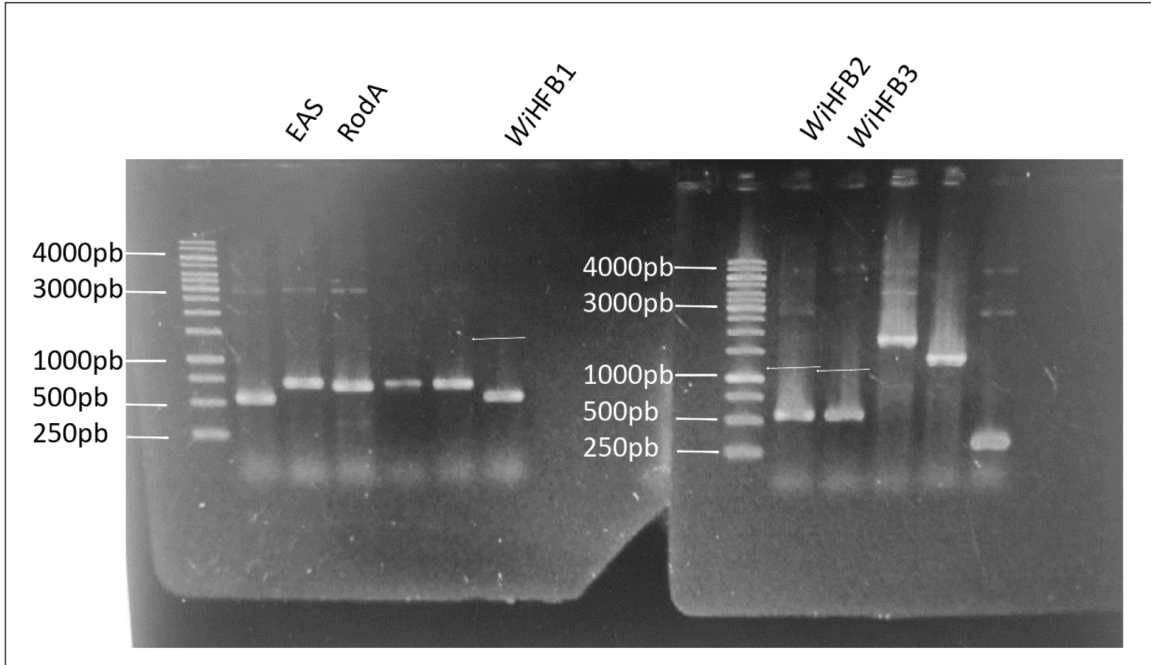


Figura 21: Amplificación de las construcciones de *WIHFB1*, *WIHFB2* y *WIHFB3*, de *N. crassa* (EAS) y de *A. fumigatus* (RodA). Las bandas observadas corresponden a los amplicones, de los tamaños esperados siendo el de EAS el de menor tamaño. Carril 1: Marcador de peso Molecular, Carril 2 y 3: Amplificaciones esperados de EAS y RodA, Carril 7: *WIHFB1* y Carril 2 y 3 (del segundo gel) de *WIHFB2* y *WIHFB3*. Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

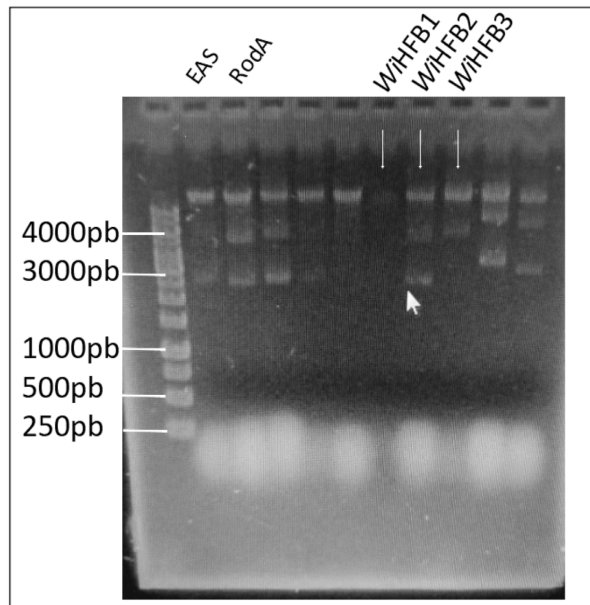
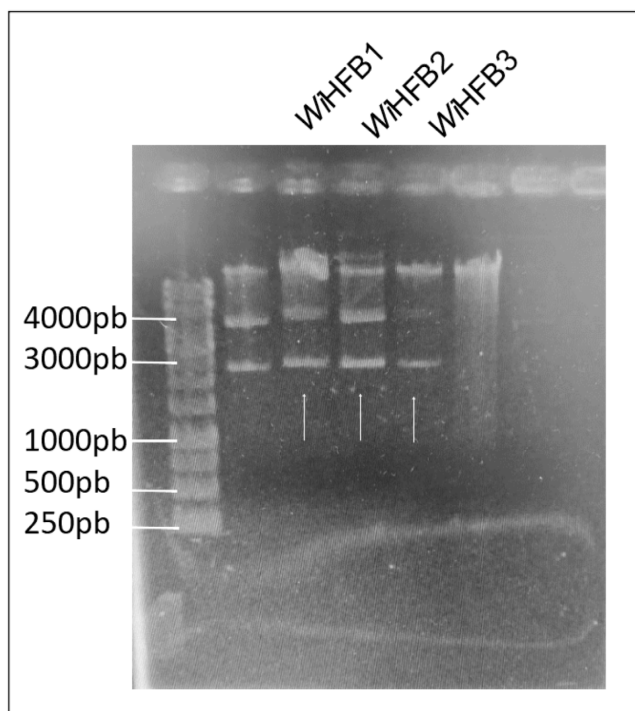


Figura 22: Análisis de la integridad de los plásmidos purificados por el método de Fenol/Cloroformo. Carril 1: Marcador de peso Molecular, Carril 7 y 8: Amplificaciones esperados de *WIHFB2* y *WIHFB3*, Carril 6: para *WIHFB1* aunque no se ve la banda los resultados de la concentración arrojaron que si teníamos presencia de la construcción. Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Se obtuvieron las siguientes concentraciones: pPICZ::*WIHFB1* con 7.59 ng/ul , pPICZ::*WIHFB2* con 8.67 ng/ul y pPICZ::*WIHFB3* con 4.86 ng/ul, por lo que se re

seleccionaron colonias que se tenían anteriormente y se re-sembraron en LB + Zeo.

Después de confirmar que las células contenían las construcciones, se realizó una extracción de DNA plasmídico (Midipred) por fenol/cloroformo usando el protocolo de Cold Spring Harbor Laboratory Presss, 2001 y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para verificar la integridad de los plásmidos (Figura 22). Debido a que en el gel se observa presencia de RNA, las muestras se trataron con RNAsa (Thermo Scientific) (Figura 23).

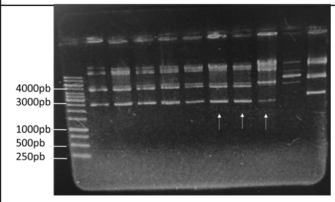
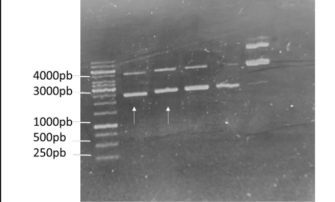


**Figura 23: Purificación de los plásmidos tras tratamiento con RNAsas.** Tratados con RNAsa a 37°C por 15 min, se ve como el ARN fue eliminado. Carril 1: Marcador de peso Molecular, Carril 2, 3 y 4: Purificación de *WiHFB1*, *WiHFB2* y *WiHFB3* (314pb). Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

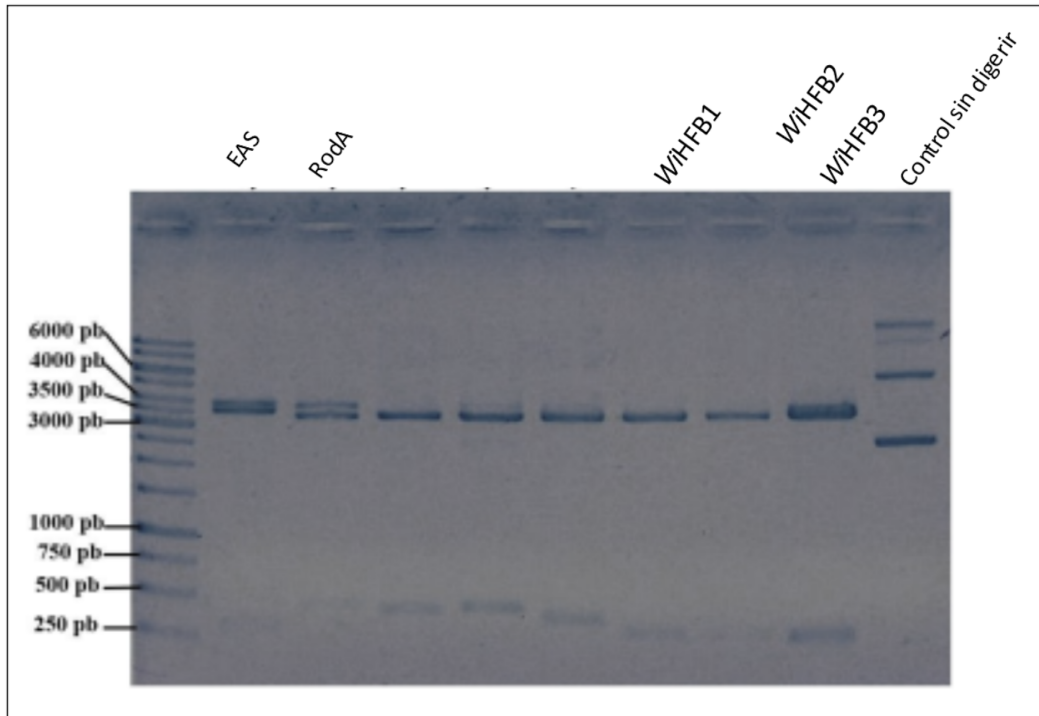
Posteriormente se realizó una segunda extracción del plásmido y se obtuvieron las siguientes concentraciones: *WiHFB1* con 3.72 ug/ul, *WiHFB2* con 3.6ug/ul y *WiHFB3* con 2.38ug/ul. Dado que obteníamos muy poca concentración se realizaron midipreps usando el GeneElute Plasmid Midiprep Kit de Sigma-Aldrich (Código del producto PLD 35 y PLD 140).

En la tabla 10, se muestran las concentraciones del plásmido obtenidas en las purificaciones. Para obtener la cantidad necesaria para la transformación de la levadura *P. pastoris*, se juntaron las purificaciones de cada plásmido y se procedió a la linearización del mismo.

**Tabla 10: Concentraciones obtenidas de las purificaciones de plásmido**

	Concentración de W/HFB1	Concentración de W/HFB2	Concentración de W/HFB3	Geles de electroforesis
Fenol/ Cloroformo (2da extracción) (30ul)	238.67 ng/ul	226.97 ng/ul	546.96 ng/ul	
Sigma-Aldrich (500ul)	76.37 ng/ul	106.64 ng/ul	209.19 ng/ul	

A si mismo se verificó la presencia del inserto en las construcciones realizando una digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI (Figura 24) Se puede observar la presencia de dos bandas, una de aproximadamente 3500pb que corresponde al vector vacío y una banda inferior en el rango de los 250pb a 500pb, que corresponde a los insertos del cDNA de las hidrofobinas



**Figura 24. Patrón de restricción de la digestión con las enzimas EcoRI y XbaI. Se obtuvo el patrón de digestión esperado. Como control se utilizó 251 ng del plásmido de la construcción pPICZαA::SIH1sin digerir. Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.**

Por otra parte se llevó a cabo una digestión piloto utilizando la enzima, *SacI*, por 4hrs a 37°C y se obtuvo una digestión completa, como se observa en la Figura 25. Después de esta prueba se juntaron las muestras de las extracciones previas (Fenol/Cloroformo y por columna) y se realizó una digestión con *SacI* de todas las muestras en un volumen de 100 µl. La reacción se llevó a cabo durante toda una noche y se observó una digestión parcial. Para obtener una mejor digestión se añadieron 50U de enzima nueva a las muestras y se dejó incubando por 1 hora más a 37° antes de la electroporación.

#### *Transformación de las construcciones en P. pastoris*

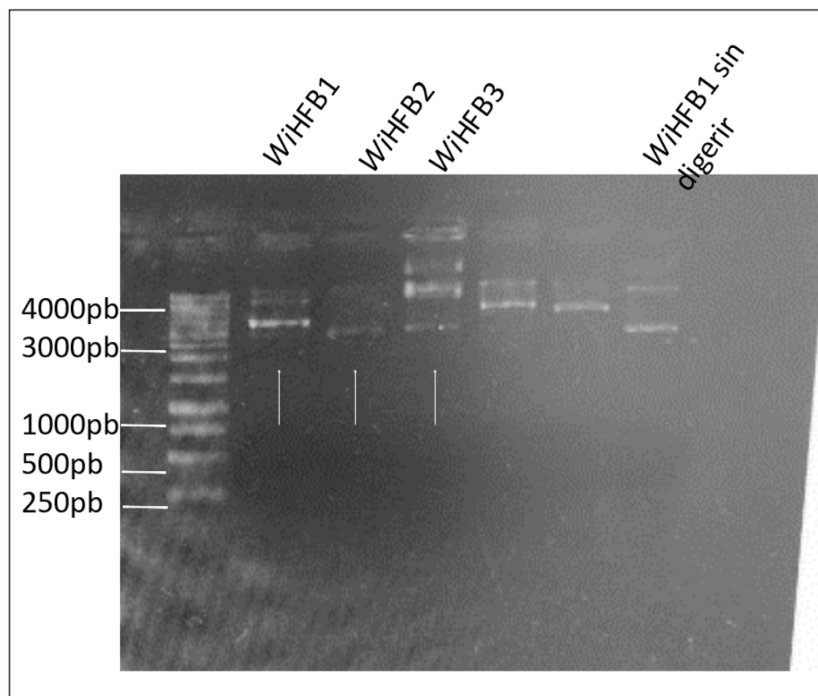


Figura 25: Analisis de restricci3n de la digesti3n de los plasmidos de las HFBs, digeridos con *SacI*. Las bandas que se alcanzan a ver son las correspondientes al tama1o esperado, solo que en lugar de ser una digesti3n completa luce mas como una digesti3n parcial, se utiliz3 un control de la *W/HFB1* sin digerir. Carril 1: Marcador de peso Molecular, Carril 2, 3 y 4: Digestiones de *W/HFB1*, *W/HFB2* y *W/HFB3* (314pb). Gel de Agarosa al 1% te1ido con bromuro de etidio.

Los pl3smidos digeridos se transformaron en la cepa *KM71H* de *P. pastoris* y se sembraron en placas con YPD + Zeocina (100ug/ml), se incubaron por 48hrs a 28°C. En la Figura 26 se pueden observar las colonias viables correspondientes de cada construcci3n.

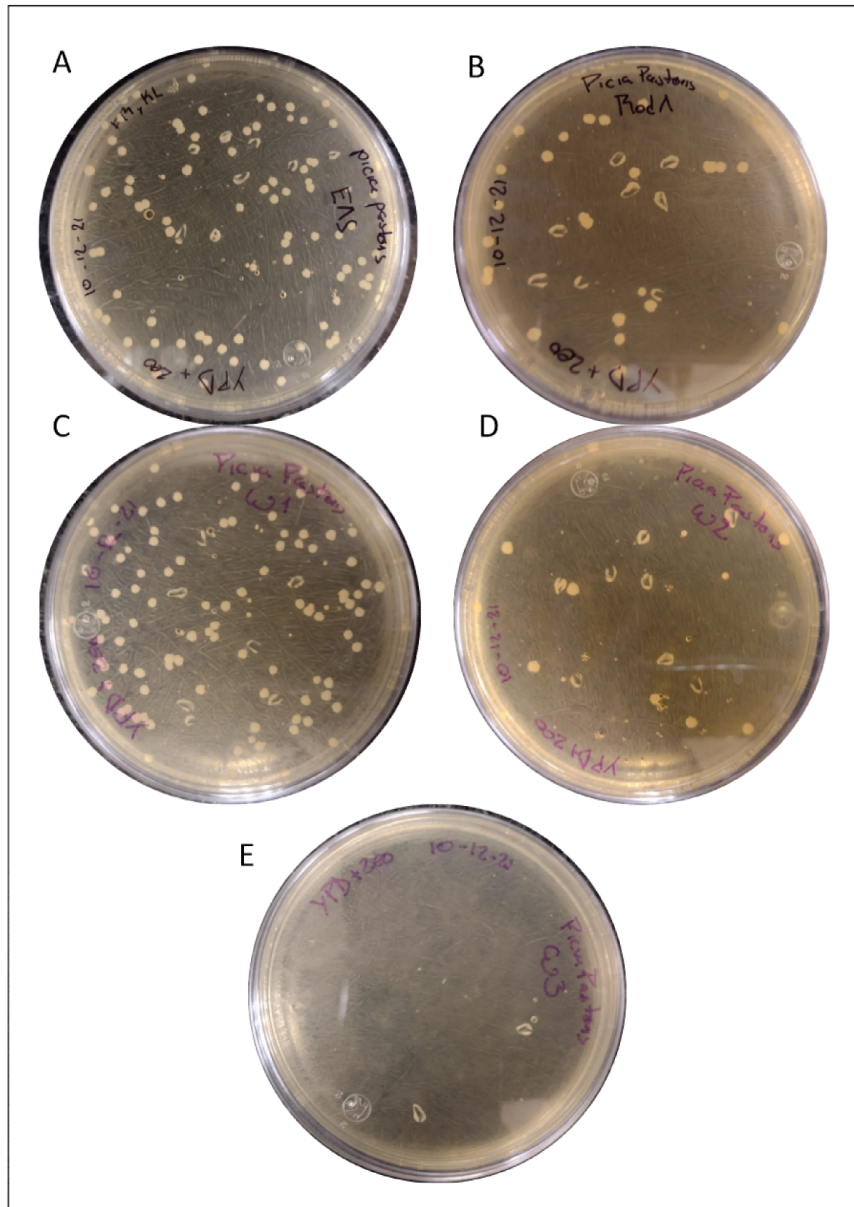


Figura 26: Colonias de *Pichia Pastoris* con la construcción. En medio YPD +Zeo, estas colonias debieron internalizar la construcción de pPICZ::WiHFB1, pPICZ::WiHFB2 y pPICZ::WiHFB3 (C,D y E), en esta ocasión también se ve las colonias de nuestras construcciones control pPICZ::EAS y pPICZ::RodA

Para comprobar la correcta transformación de las células de *P. pastoris*, se llevó a cabo un PCR de colonia. En la Figura 27, se observan los amplicones obtenidos de las hidrofobinas de *W. ichthyopaga*, como del control EAS. Para la amplificación se usaron los oligonucleótidos Fw-alpha-factor y Rv-3-AOX. Los fragmentos esperados fueron de 542 para WiHFB1, 549 para WiHFB2 y 542 para WiHFB3 y 530pb para la hidrofobina control positivo (EAS).

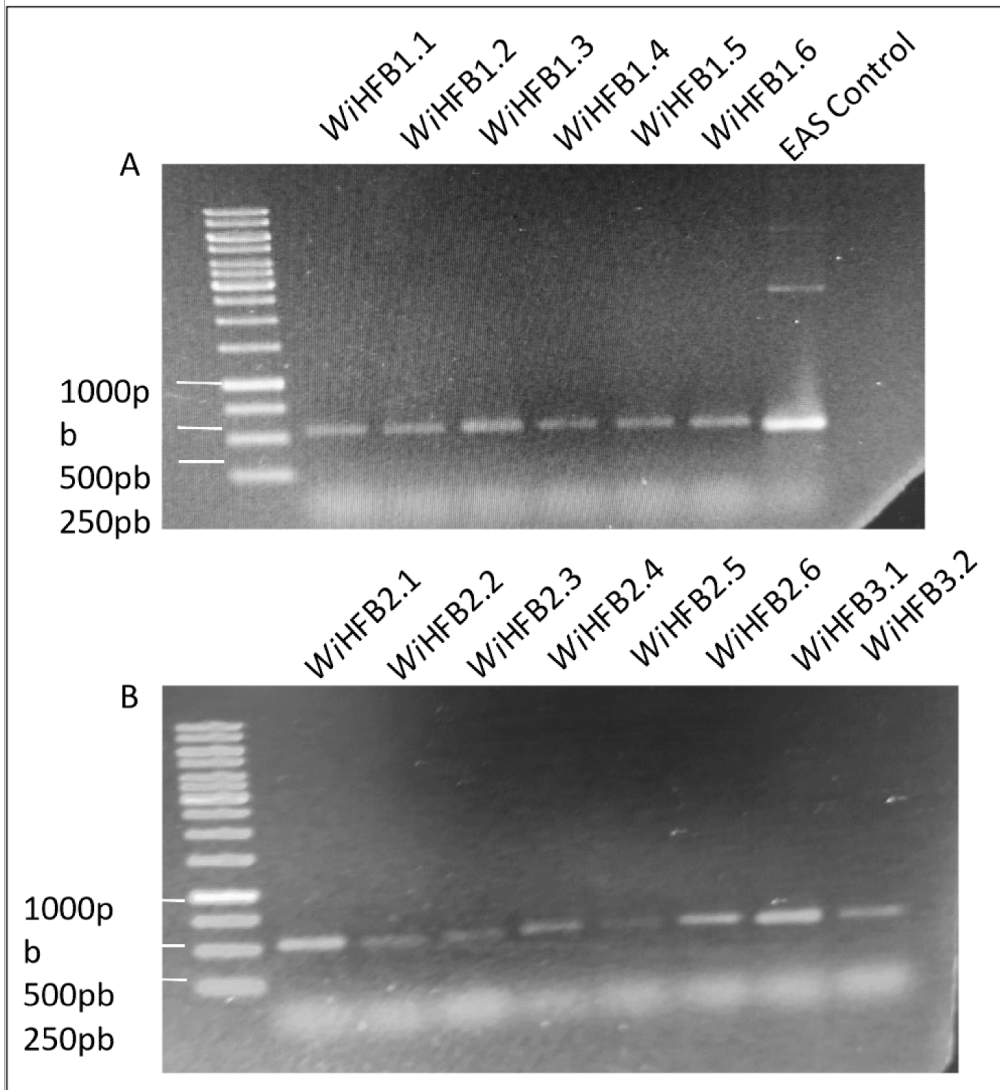


Figura 27: Tamizado de las colonias de *Pichia* transformadas con las construcciones pPICZ::*WiHFB1*, pPICZ::*WiHFB2* y pPICZ::*WiHFB3*. A) tiene las 6 colonias de pPICZ::*WiHFB1* y el control EAS, en B están las 6 colonias de pPICZ::*WiHFB2* y las dos colonias de pPICZ::*WiHFB3*. La amplificación se realizó con los oligonucleótidos Fw-alpha-factor y Rv-3-AOX. Gel de agarosa al 1% en un buffer TAE 1X. Marcador de peso molecular (MPM) Thermo Scientific 1 kb (300 ng)

### *Pruebas preliminares de expresión de las proteínas en colonias con metanol*

Para la selección de clonas con mayor expresión de proteínas recombinantes se llevó a cabo la técnica de Dot blot, donde se probaron diferentes concentraciones de metanol a 72hrs de inducción. En la Figura 28, se puede visualizar la presencia de los halos a diferentes concentraciones de metanol, donde la condición óptima de expresión se observa a 1x de metanol (10%).



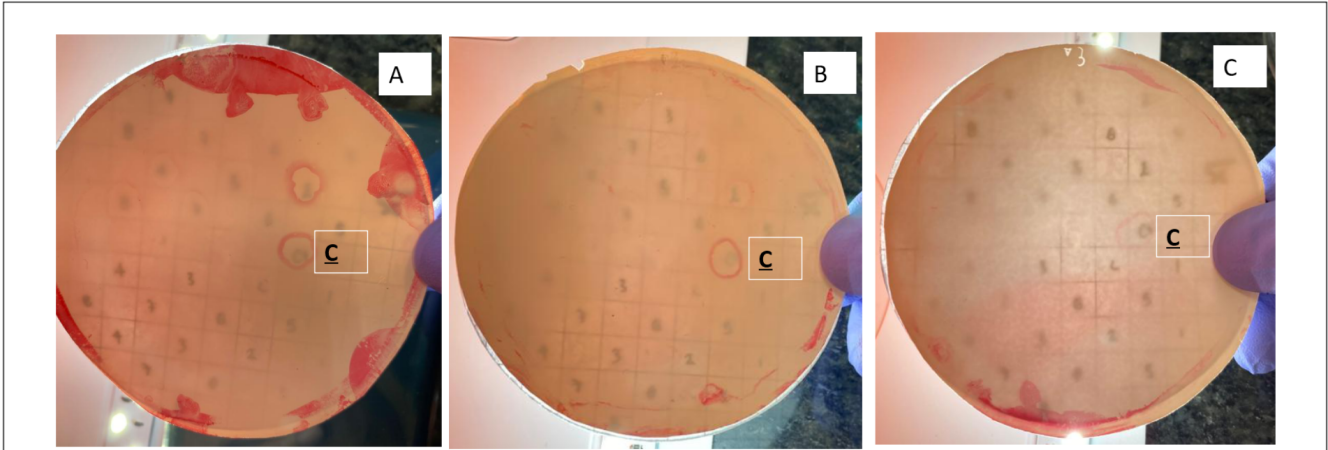


Figura 28: Análisis de expresión de las HFBs en colonia por el método Dot blot. Se utilizó como anticuerpo primario a Anti-Cmyc, y en esta prueba como anticuerpo secundario a Anti-mouse IgG- Fosfatasa alcalina, que generó una reacción colorimétrica con el sustrato de TR/Naphtho. En las tres podemos observar que el control (C) es la única colonia que expresó en las tres concentraciones (10%, 20% y 30%). Se eligió la concentración de 10% de metanol debido a que se observaron un mayor número de manchas de expresión.

En la Figura 29, se muestra la expresión de las hidrofobinas de *W. ichthyophaga* después de la inducción con metanol al 10%, los controles de expresión EAS y RodA y la proteína BaEstB que contiene la etiqueta de myc (donada por la Maestra María Guadalupe Morales), utilizada como el control positivo del ensayo. En esta prueba se utilizó el sustrato de la HRP que genera quimioluminiscencia y se analizaron los resultados obtenidos a las 24, 48, 72 y 96 hrs, para determinar el tiempo óptimo de expresión.

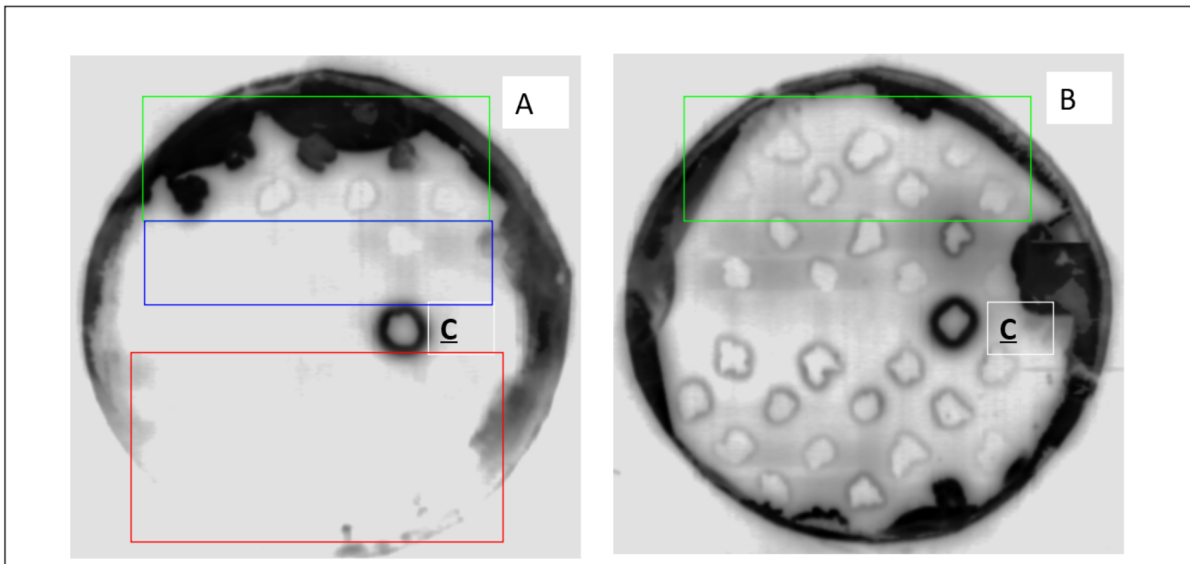


Figura 29: Análisis de expresión de las HFBs en colonia por el método de Dot blot a 72hrs. En ambas figuras se ve el control positivo (C) en A observamos levemente la presencia de manchas en la zona correspondiente a las colonias de W/HFB1 (azul), en cambio no se ve nada en la zona de W/HFB2 y W/HFB3 (rojo). En B estamos observando las manchas de expresión de las hidrofobinas Sih1, Sih2 y Sih4. Tanto para A y B se observan EAS y RodA (verde), hidrofobinas provenientes de un hongo no halófilo.

A partir de estos resultados se seleccionó la colonia con mejor rendimiento para continuar con la expresión en medio BMM. Las colonias numeradas como 5 tanto de *W/HFB1* como de *W/HFB2* se seleccionaron para su expresión en medio líquido (BMM), en cuanto a la *W/HFB3* se seleccionaron las colonias 2 y 5.

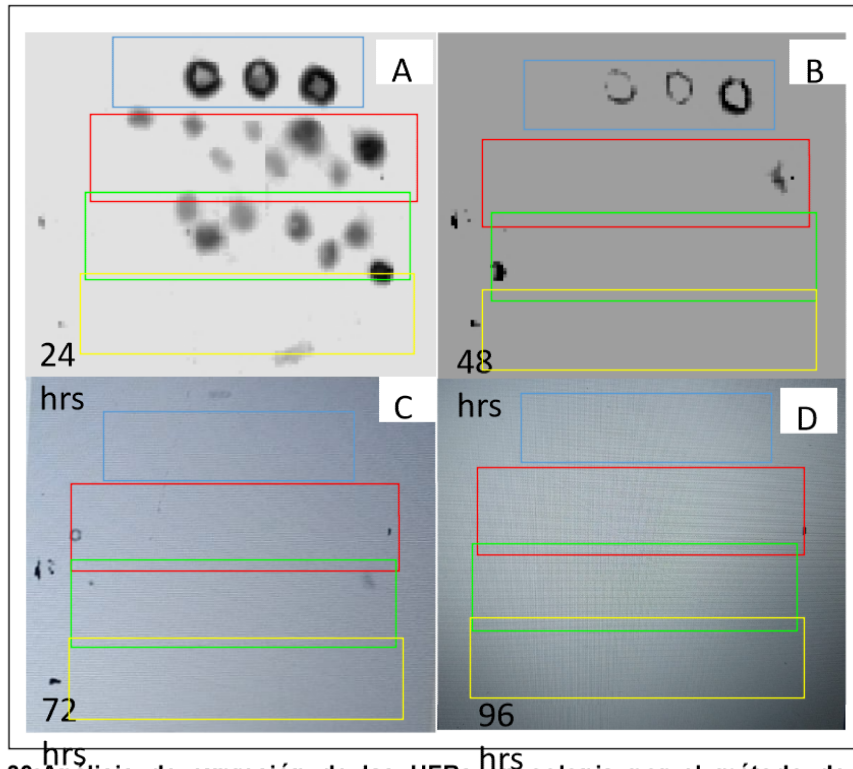


Figura 30: Análisis de expresión de las HFBS en colonia por el método de Dot blot a diferentes horas. Utilizando el anticuerpo primario a Anti-Cmyc, y de anticuerpo secundario a Anti-mouse IgG HRP, de respuesta quimio luminiscente. Se observan los halos de expresión de las hidrofobinas a diferentes horas (A)24, B) 48, C)72 y D)96 hrs) Las primeras manchas (azul) son las construcciones de una compañera de Laboratorio, cedidas como control. En rojo esta *W/HFB1*, en verde *W/HFB2* y en amarillo *W/HFB3*.

Debido que no se observó expresión de la *W/HFB3* en las pruebas anteriormente mencionadas, se secuenció esta construcción (IBT, UNAM). Como se observa en la Figura 31, el alineamiento de la secuenciación comparado con la secuencia de la construcción es idéntica (Figura 17), es decir, que no existen cambios entre la secuencia original y la construcción





## 8. DISCUSIÓN

Inicialmente, se seleccionó a los transcritos *WiHFB1*, *WiHFB3* y *WiHFB6* para generar las construcciones en el vector pPICZ y poder ser expresadas en el sistema heterólogo *P. pastoris*, basados en la expresión diferencial de estos en condiciones de 10 o 30% de NaCl. Después de un re-análisis de los transcritos expresados en el transcriptoma de *W. ichthyophaga* se decidió mantener a *WiHFB1*, y tomar a las hidrofobinas *WiHFB2* y *WiHFB3* debido no solo a su expresión diferencial sino también al número de transcritos expresados. Esta elección se debe a la diferencia de expresión entre las condiciones de 10 y 30% de NaCl (ver figura 20) ya que aunque los resultados de la expresión diferencial eran notorios, el número de transcritos en las condiciones 30% y 10% de NaCl no era contundente. Se cambiaron a *WiHFB3* y *WiHFB6*, por *WiHFB2*, ya que la diferencia de proporción de transcritos en ambas condiciones fue despreciable y por *WiHFB3* que tenía un mayor número de transcritos en la condición de 10% de NaCl. Estas fueron mandadas a sintetizar a la compañía coreana Macrogene.

Con estas tres construcciones sintetizadas se obtuvieron colonias en *P. pastoris* de las cuales seleccionamos a la colonia 5 de cada construcción *WiHFB1* y *WiHFB2*, y las colonias 2 y 5 de *WiHFB3*. Esto se decidió ya que comparando con los resultados de la tesis de Maestría de Pérez Llano donde se observó que la expresión de las diferentes hidrofobinas de *Wallemia* podía variar en tiempo y en el medio de inducción se llevaron a cabo las pruebas en medio solido de BMM utilizando al metanol como inductor a diferentes tiempos y concentración de metanol.

Aunque se probaron a las 24, 48, 72 y 96 hrs, podemos decir que no fueron resultados concluyentes en cuanto a la hora específica de mayor expresión, ya que la contaminación del anticuerpo primario (Anti-Myc) impidió que se visualizaran los resultados. Una vez con las muestras recolectadas de las diferentes horas en los diferentes medios de inducción, podremos determinar cuándo es el tiempo óptimo de expresión de hidrofobinas al ver los resultados de los geles de poliacrilamida que se harán a continuación. Analizando la literatura se ha decidido que a futuro se realizará la tinción con plata, ya que se ha reportado que las hidrofobinas resultan difíciles de observar con la tinción de commasie, ya propuesto.

## 9. CONCLUSIONES

Se eliminó el Péptido señal nativo de las construcciones pPICZ::*WiHFB1* y pPICZ::*WiHFB3*. A través de secuenciación llegamos a la conclusión de que la construcción etiquetada como pPICZ::*WiHFB6* con PSN es la construcción de *WiHFB3*.

Se obtuvieron las construcciones pPICZ::*WiHFB1*, pPICZ::*WiHFB2*, y pPICZ::*WiHFB3* y estas fueron transformadas en *P. pastoris*

Las colonias identificadas como número 5 de las construcciones pPICZ::*WiHFB1* y

pPICZ::*WiHFB2*, así como las colonias 2 y 5 de pPICZ::*WiHFB3* son las que mejor expresan a las hidrofobinas, usando 0.5% de metanol y 24 horas para la inducción, datos obtenidos usando la metodología de colony blot.

## 10. PERSPECTIVAS

A corto plazo:

1) Expresar y purificar las hidrofobinas *WiHFB1*, *WiHFB2* y *WiHFB3* de *W. ichthyophaga*.

A mediano plazo:

2) Caracterización biofísica de las hidrofobinas:

- Determinar cambios en la hidrofobicidad – hidrofiliidad de las películas formadas por las hidrofobinas *WiHFB1*, *WiHFB2* y *WiHFB3* de *W. ichthyophaga* a distintas concentraciones de sal con la técnica Water Contact Angle.
- Determinar cambios en la estructura secundaria y/o terciaria de las hidrofobinas *WiHFB1*, *WiHFB2* y *WiHFB3* de *W. ichthyophaga* a distintas concentraciones de sal con las técnicas de Dicroísmo Circular.

## 11. BIBLIOGRAFIA

Alvarez, Y., Arias A. (2013) Bacteria as a therapeutic heterologous protein expression system: a review. *Hechos Microbiol* 2013; 4(2) 106-116

Bayry, J., Amanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., & Latge, J. P. (2012). Hydrophobins— unique fungal proteins. *PLoS Pathog*, 8(5), 1002700.

Bromme, D., F.S. Nallaseth & B. Turk (2004) Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. 32: 199-206

Brondyk WH (2009). «Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein». *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology* 463: 131-47.

Catrillon Rivera, L.E., Rios A., Desgaren Ma. Del C. (2013) Biopelículas Fungicas, Artículo de revisión. *Dermatol Rev mex* 2013; 57:350-361

Carpeta, Marc D .; Hirokawa, Nobutaka; Windhorst, Uwe, eds. (2009). "Expresión heteróloga". *Enciclopedia de neurociencia* . Springer Berlín Heidelberg. pag. 1830

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Midipreparation, *Molecular Cloning a Laboratory Manual on the Web* Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T (2009). «Expression in the yeast *Pichia pastoris*». *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology* 463: 169-189

DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>

Daly R, Hearn MT (2005). «Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production». *J. Mol. Recognit.* 18 (2): 119-38.

García-Suárez, José, Zumalacárregui-de-Cárdenas, Lourdes, & Santana-Vázquez, Zeila. (2021). Usos de la levadura *Pichia pastoris* en la producción de proteínas recombinantes. *Vaccimonitor*, 30(3), 153-163. Epub 01 de diciembre de 2021. Recuperado en 26 de enero de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-028X2021000300153&lng=es&tling=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2021000300153&lng=es&tling=es).

Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, Plemenitas A, (2000). *FEMS Microbiology Ecology* 32: 235–240.

Gunde-cimerman, N., Ramos, J., Plemenitas, A., & Gadd, G. M. (2009). Halotolerant and halophilic fungi, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>

Géza R. Szilvay, Tiina Nakari-Setälä, & Marjus B. Linder (2006) Behavior of *Trichoderma reesei* Hydrophobins in Solution: Interactions, Dynamics and Multimer Formation *Biochemistry* 2006, 45, 8590-8598

González-Hernández, J. C., & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3–4), 137–156.

González-Abradelo D, Pérez-Llano Y, Peidro-Guzmán H, Sánchez-Carbente M.R, Folch-Mallol J.L, Aranda E, Vaidyanathan V.K, Cabana H, Gunde-Cimerman N, Batista-García R.A, (2019). First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic microremediation under high salinity conditions. *Bioresource Technology*

Gupta G. N., Srivastava S., Khare S. Prakash K. & (2014) Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment *IJAEB*: 7(2): 371-380 June 2014

Invitrogen manual. pPICZ alfa A, B y C. *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin and purification of secreted, recombinant proteins. By Life technologies. July 2010

Joseph Seckbach & Aharon Oren (2004) Introduction to the Extremophiles Division of Microbial and Molecular Ecology, The Institute of Life Sciences, and The Moshe Shilo Minerva Center for Marine Biogeochemistry, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904 Israel *Origins*, 373–393.

Kuncic M. K, Kogej T., Drobne D., Gunde-Cimerman N. (2009). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 1, p. 329–337, doi:10.1128/AEM.02318-09.

Kits de Extracción: GeneElute Plasmid Midiprep Kit de Sigma-Aldrich (Código del producto PLD 35 y PLD 140) y con GeneJet Plasmid Midiprep de Thermo Fisher Scientific (Código K0502)

López Galindo Daniela Alexis, Tesis de Maestría: Evaluación del plasmido de expresión intracelular Ppic3.5 en la producción del anticuerpo scFv 6009F en *Pichia Pastoris* GS115 Y KM71, (2019)

Lohrasbi-Nejad A, Torkzadeh-Mahani M, Hosseinkhani S (2016) Heterologous expression of a hydrophobin HFB1 and evaluation of its contribution to producing stable foam. *Protein Expr Purif* 118:25–30

Littlejohn, K. A., Hooley, P., & Cox, P. W. (2012). Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 503– 516.

Luis G. Lugones, Han A.B. Wösten, Kim U. Birkenkamp, Klaas A. Sjollema, Jan Zagers, Joseph G.H. Wessels, Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*, *Mycological Research*, Volume 103, Issue 5, 1999, Pages 635-640, ISSN 0953-7562, <https://doi.org/10.1017/S0953756298007552>.

Madigan, M. T. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn. *International Microbiology*, 8(May), 149–152

Maekus B. Linder, Géza R. Szilvay, Tiina Nakari-Setälä & Merja E. Penttilä (2005) Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 877–896

Meseguer Soria, Inmaculada (2004). «Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología». *Ciencia e Investigación*, 7:13-17.

Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00199>

Przylucka, A., Akcapinar, G. B., Chenthamara, K., Cai, F., Grujic, M., Karpenko, J., Livoi, M., Shen, Q., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2017). HFB7 – A novel orphan hydrophobin of the *Harzianum* and *Virens* clades of *Trichoderma*, is involved in response to biotic and abiotic stresses. *Fungal Genetics and Biology*, 102, 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.002>

Ramírez, N., Sandoval, A., & Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(2), 1–10.

Rodríguez-Pupo EC, Pérez-Llano Y, Tinoco-Valencia JR, Sánchez NS, Padilla-Garfias F, Calahorra M, Sánchez NDC, Sánchez-Reyes A, Rodríguez-Hernández MDR, Peña A, Sánchez O, Aguirre J, Batista-García RA, Folch-Mallol JL, Sánchez-Carbente MDR. Osmolyte Signatures for the Protection of *Aspergillus sydowii* Cells under Halophilic Conditions and Osmotic Shock. *J Fungi (Basel)*. 2021 May 26;7(6):414. doi: 10.3390/jof7060414. PMID: 34073303; PMCID: PMC8228332.

Sebastian A. Trejo, Walter D. Obregon, Sebastian M. Tanco & Francesc X. Aviles (2009) Superior plant proteolytic enzymes. Industrial applications. 1a ed. Buenos Aires. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo

Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology*, 165, 1–52. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62219-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62219-6)

Shiladitya DasSarma & Priya Arora (2001) Halophiles *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* / & 2001 Nature Publishing Group

Pérez-Llano Yordanis, Eya Caridad Rodríguez-Pupo, Irina S. Druzhinina, Komal Chenthamara, Feng Cai, Nina Gunde-Cimerman, Polona Zalar, Cene Gostinčar, Rok Kostanjšek, Jorge Luis Folch-Mallol, Ramón Alberto Batista-García, & María del Rayo Sánchez-Carbente (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity

Wessels, J. G. H. (1997). Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microb. Physiol* (Vol. 38). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60154-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60154-X)

Wosten, H., De Vries, O., & Wessels, J. (1993). Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. *The Plant Cell*, 5(11), 1567–74

Przylucka A., Bayram Akcapinar G., Bonazza K., Mello\_de\_Sousa T., Mach-Aigner A., Lobanov V., Grothe H., Kubicek C. P., Reimhult E., Druzhinina Irina s. (2017) Comparative physiochemical analysis of hydrophobins produce in *Escherichia coli* and *Pichia Pastoris*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 159 (2017) 913 - 923

Zacj Janja, Liu Yongfeng, Dai Wenkui, Hu Jingzhi, Gostincar Cene, Gunde-Cimerman Nina (2013) Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Walleimia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent I. *BMC Genomics* 2013, 14:617 Page 2 of 20 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/617>

Zajc, J., Kogej, T., Galinski, E. A., Ramos, J., & Gunde-cimerman, N. (2014). Osmoadaptation Strategy of the Most Halophilic Fungus, *Wallemia ichthyophaga*, Growing Optimally at Salinities above 15% NaCl. <https://doi.org/10.1128/AEM.02702-13>

Zykwinska, A., Guillemette, T., Bouchara, J.-P., & Cuenot, S. (2014). Spontaneous selfassembly of SC3 hydrophobins into nanorods in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1844(7), 1231–1237



## 12. ANEXOS

### Anexo A : Transformación De *E. Coli*

#### **Medio LB** (bajo en sales)

- 1L agua destilada
- 10g Bacto-triptona
- 5g extracto de levadura
- 5g NaC
- 15 gr de agar (NOTA: medio solido)

Se ajusta el pH a 7 con NaOH y se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 121°C.

### Anexo B: Extraccion Por Metodo De Fenol/cloroformo

#### **Solución I-De resuspensión**

- Glucosa 50 mM
- Tris-Cl 25 mM (pH 8.0)
- EDTA 10 mM (pH 8.0)

Se prepara a partir de soluciones madre estándar, se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

#### **Solución II- De lisis**

- NaOH 0.2 N (recién diluido de un stock 10 N)
- SDS al 1 % (p/v).

Se debe preparar fresca y utilizarla a temperatura ambiente.

#### **Solución III- De neutralización**

- Acetato de potasio 5 M
- Ácido acético glacial
- Agua destilada

La solución debería ser guardada a 4°C y transfírala a un cubo de hielo justo antes de usarla.

### Anexo C: Geles de agarosa

#### **Buffer TAE**

Stock al 50x

- 242g de Tris base en 750mL de agua desionizada
- 57.1g de ácido acético
- 100mL (.5M) de EDTA

Ajustar el volumen a 1 L agregando agua destilada. El pH final del tampón TAE 50x debe ser de aproximadamente 8,5.

Buffer de trabajo TAE 1x, se agrego 49 partes de agua desionizada a 1 parte de tampón 50x TAE.

### **Bromuro de etidio**

Stock- 5 miligramos/mililitro y se ocupa en 0.5 microgramo/mililitro

Anexo D: Transformación De *P. pastoris*

### **Medio YPD**

- 5 g de extracto de levadura
- 12 g de peptona
- 540 ml de agua

Para preparar 600 ml de medio YPD (Medio de dextrosa de peptona de extracto de levadura). Se metió a la autoclave por 20 minutos a 121°C. Se preparó 70 mL de dextrosa al 20% y esterilizó por filtración una vez esterilizadas se agregaron 60 ml de dextrosa al 20 % esterilizada por filtración. Para placas se disolvió 10 gr de agar y revolvió con una barra de agitación para asegurar la homogenización de los compuestos + Zeocin <sup>TM</sup> (100µg/ml).

### **Solución de sorbitol**

- Acetato de litio 200mM
- Sorbitol 0.6 M
- Tris-HCL 10mM ( pH 7.5)

Anexo E: Colony Blot

**BMM (BMMY)** Medio con metanol tamponado (suplementado con extracto de levadura y peptona)

- YNB 0.34%
- Sulfato de amonio 1%
- Metanol 1%
- Biotina 4x10<sup>-5</sup>%
- Tampón fosfatos 0.1M.
- Para suplementarlo se adicionó 1% de extracto de levadura y 2% de peptona al medio

Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°, solamente el agua con 1% de agar (para solido) cada componente tiene su propio proceso de esterilización descritos posteriormente en el texto.

### **TBST 1x**

- 24 g de Tris (200mM)
- 88 g de NaCl (1500mM)
- 900 ml de agua

Para preparar 1 litro de solución madre de TBS 10X. Se ajusta el pH a 7,6 y el volumen final a 1 litro. Con esta solución stock ya hecha ahora para hacer 1 L de tampón de lavado TBST:

- 100 mL de 10X TBS
- 1 mL de detergente Tween (1%)
- 900 mL de agua

### **Buffer de Bloqueo**

- TBST 1x
- Leche 3% de leche en polvo svelty

Mezclar muy bien los ingredientes y utilizar en el momento.

### **Anexo F: Expresión De Las Hidrofobinas**

**BMG (BMGY)** Medio con glicerol tamponado (suplementado con extracto de levadura y peptona)

- YNB 0.34%
- Sulfato de amonio 1%
- Glicerol 1%
- Biotina 4x10<sup>-5</sup>%
- Tampón fosfatos 0.1M
- Para suplementarlo se adicionó 1% de extracto de levadura y 2% de peptona

Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°, solamente el agua, cada componente tiene su propio proceso de esterilización.

**BMM (BMMY)** Medio con metanol tamponado (suplementado con extracto de levadura y peptona)

- YNB 0.34%
- Sulfato de amonio 1%
- Metanol 1%

- Biotina 4x10<sup>-5</sup>%
- Tampón fosfatos 0.1M
- Para suplementarlo se adicionó 1% de extracto de levadura y 2% de peptona

Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°, solamente el agua, cada componente tiene su propio proceso de esterilización.

### **Tampón de fosfato de potasio 1 M, pH 6.0**

- 24 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M
- 156 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M

Confirmar que el pH = 6.0 Se debe esterilizar por filtración y almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de esta solución es superior a un año.

### **10X YNB**

- 13.4% base de nitrógeno de levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos

Se van a disolver 26.8 g de base nitrogenada de levadura (YNB) con sulfato de amonio y sin aminoácidos en 200 mL de agua y esterilizar por filtración; se debe calentar la solución para disolver YNB completamente. Conservar a 4°C. La vida útil de esta solución es de aproximadamente un año.

### **500X Biotina**

- 0.02% biotina

Se debe disolver 10 mg de biotina en 50 ml de agua y esterilizar por filtración. Conservar a 4°C. La vida útil de esta solución es de aproximadamente un año.

### **10X Metanol**

- 5 mL de metanol
- 95 mL de agua

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. La vida útil de esta solución es de aproximadamente dos meses.

### **10X Glicerol**

- 10 mL de glicerol
- 90 mL de agua

Filtrar y esterilizar. Almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de esta solución es superior a un año.

#### Anexo G: Electroforesis En Geles De Poliacrilamida Y Tinción De Coomassie.

##### **Gel Concentrador**

- Tris-HCl (0.5M, pH6.8) a una concentración final de 0.125M
- SDS (10%) a concentración final de 0.1%
- PSA 10% a una concentración final de 0.1%
- TEMED 0.1%

A partir de una solución de acrilamida 29%.Bisacrilamida 0.9% se realizará un gel de poliacrilamida de 5% y 0.13%. Completar con agua Mili-q al volumen deseado.

##### **Gel Separador**

- Tris-HCl (1.5M, pH8.8) a una concentración final de 0.75M
- SDS (10%) a concentración final de 0.1%
- PSA 10% a una concentración final de 0.1%
- TEMED 0.05%

Acrilamida 29% y Bisacrilamida 0.9% a una concentración de 15% y 0.4% respectivamente; y completar con agua Mili-q al volumen deseado.

##### **Buffer de corrida**

- Tris 25 mM, pH 8.3
- Glicina 190 mM
- SDS 0.1%
- Beta-mercaptoetanol 5%
- Azul de bromofenol 0.1%

La electroforesis se comienza a 80 V hasta que la muestra penetra en el gel separador, entonces se eleva el voltaje a 180 V

##### **Solución de tinción**

Azul brillante de Coomassie R-250 (0.25%) para 1L de solución: 2.50g de azul brillante de Coomassie R-250

- 100ml de ácido acético concentrado
- 400ml de metanol
- Agua destilada se completará a 1L

Se recomienda disolver el colorante en un poco de metanol, se filtrará la solución antes de utilizar.

### **Solución desteñidora**

- 400ml de metanol
- 100ml de ácido acético concentrado
- Completar 1L con agua destilada.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **LUNA GALICIA KARLA CECILIA** con número de matrícula **20154005764** cuyo título es:

**“Expresión y caracterización de hidrofobinas aisladas del hongo halófilo obligado Wallemia Ichthyophaga”.**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 23 de noviembre del 2022

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

<b>DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAÉZ PADILLA</b>	<b>(PRESIDENTE).</b>
<b>DRA. SONIA DAVILA RAMOS</b>	<b>(SECRETARIO).</b>
<b>DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE</b>	<b>(VOCAL).</b>
<b>DRA. CARMEN NINA PASTOR COLON</b>	<b>(SUPLENTE).</b>
<b>DRA. RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA</b>	<b>(SUPLENTE)</b>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha:2022-11-23 16:04:11 | Firmante

MwOmvIB4/fS6f/4LNP1S2It3Z/XT/rpJC0bl+pM2nR4OyVmpSRux7lymb0r7WICATDgAsZcN/j8ENC8kX769iFv7PMqF15HnZrUbebj5eXvwdVnq0QUJA0ig0I3iosD2Z/rCZSUewr8cBkn+OVpGGVOrURnCjbbf8qCjv7OqQPZwXVwFF0799n9epFHAIS7CaEzVV68enBgp/seOrnBkQawI9j21sXI+avxiHIM5MF2lp/WazoULKi2Ipu2CH2jWYmisYqikhTLx8C15n92AFpc+J0Y0UYIomyvRbMjeX4j6VmKByWOq/4wxFpRkKCX1bBvELnASaGJpGVxK3Sjw==

**RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA** | Fecha:2022-11-23 16:52:43 | Firmante

WCFZ/aJLXDjLYL5vMctEOgrvGJX0GaHntgacNrkgM9qVWEM5xjleu3DfzQBII77bS6ALqoojc2hq7X2VWGFewGJO5CziIFi2uv1eveasFte8PB/nviWpLBEhSjxDqEu9qRD7gIUT0MzagK6XdfVJcz44SNANmMyXR7+I4H1ejCNiUyay+PbgfF+RLTTIfjgOJISMhwgm/N1AJ6aDUoeHc2bKBI-y4KkSm1rYAhPPvi3K9NS9xVMWiuOYzF/u7GqWO5F9XnlJSMTKUGOiD5/YaoGwqhX7VID43egd8lqAn03oLQYkVSwmO6prvn3LLGNCNHkdSZ/X4EYWdY1vKg==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE** | Fecha:2022-11-23 23:14:26 | Firmante

XXpWtV0uAtexSTL8o5RG48yuPijmB+F5qyAyE9k/Fh5MkLtvUd3LkF7a2aKjktbgQuJyBmRZ21NU7OI99fFDuqhvAzVcMaYGTgGmoQpRBYnl6IJCUT3Ezy4M6IugSxonSzygnUC1ASm5vzfJskHxyWBB+yuPrsMUJTI5dX9B9vXAw3LIG/+vtr7JTMRNG5u+kk+/hxoT5I7HeWwQ3W5RYxpPrmN0M3jXp32cA91ZkRQWZDnjIBZL/mq7VRYYPZ64gQaRgxHiAXL/W2QuEg2XCUMp0K92EkhxUVBbWP1/dpo6RCFCiUf/RuIKOa/0FFDIPriLJReYQS/eIM9+yw==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA** | Fecha:2022-11-25 08:14:04 | Firmante

L3/gn+eSVKwy/ANGUotwOt+KPX/gMwO3lxFV3anqQ4FUZSZVsOmoUdtGJKYSkuQw7BDAJL+UareI1POo8iEjhpcAZaC2qrW6gBpNHmJxEQjXofBWcviATyvgLiSr7P1HbVP8M3peYRITE1es/cNg87wEmsj9gWNWDOVzXicTHeGKR7T+dCMycX5Bx/VhpDpU9YNed06yc4kofQ2gX/rA7Q/DMuGjFfyq+lyWMjRvUX3H+9xa4yHdinHHk+/yqK9YG8x60iqwJ/Nx+F1+1V1kZnWnOegicHmN/LU3pwE94mKn7/E53Rf/ABMtBa5IPfdapL4IIOwnTQH/2zqmVI/w==

**SONIA DAVILA RAMOS** | Fecha:2022-12-01 16:17:13 | Firmante

AOhY7iL41L/mUOYShTPxhKmu54seTeViM7dykhhbO9hBC2zJfJG3oNd1SXhagfAjHhws6cA0XOigKOVULu4oVYcXRt8y8VJE/wMVJP6uQb40bH5JEgnAYJUFI9i2O4E1/DXqTSc7b+w55TQlcQ6Ntz1zWYdHJFWCgNTNnTRc0qULGK7ptppHjhx9G3fZEUgdH3Fhtaa4qhEaTLZRSWghOlfYzCb23LYSsnCraNaUqwn5dtWEw/pfg/rfUvFezsq8KKpBjkoS2OPKvQnXdkmwwuFQH80y0ROdrjcAPsb1YAknmd2AzEE+e0pS5m/FP2HTKjc5TrQBztdplg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5IUSxoufi

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aOfVxnTfttWMwmPFEPI5WVseONvyc6UD>

