



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



**DR. Jean Michel Grévy Macquart**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **Herramientas moleculares para el estudio de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 del hongo halófilo *Aspergillus sydowii***, que presenta la alumna **Wendy Méndez Ortega (10024369)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Ayixon Sánchez Reyes IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente CEIB-UAEM	APROBADO	



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

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2020-11-30 17:58:37 | Firmante**

RERB9mpinN4DQVZpE+NRvO/N/ApSYM4hAuEutSIYAE9L5BnJdocAIUzqyRfEXUFRChYG8EHjGatb0nsc2nrztY1sEEI9sgMunYf2TadNMz4loJBjtG78/g4kYuVZ1Q1OWckaOELmyciWitcTt23jIPUmCbebbBU+aCfMLnhxfSKcNkQx2J6BIG4UKOSJdnv7EMgRSLXUSDLMy/hsTnazYsvWlxSshJoP5gOibAjkZgF3wTWFjrVsf8tquAQdVqBZ1h8uPT3kwOqxWtzU+dt/K3UKSLh/2gZA0DQLQxCOWikT0bMKLTzgpVjruefX4MJ+Ab4SYIYUASmqhO3AAvBMQ==

**CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2020-11-30 18:31:58 | Firmante**

aSRWZoeOTmT/8WxRYmvk9k5/ooCYk205VJkjr7iqC8G2w0IX9Mo3k+kqVNC+ZLBY2xxgrRxGeZ5GFefbSIH10a4Z0VN7rIIHj770XSMUpSi7FXycbNntsQz5Y0A6pohTvxBiG+5Kr5uobPf1fyk+nAtFLhSg7CPtdgdNOAaDiSN/OiW/im3sqCzDnw8iSpVa3LUulOxaFODkaqefDfXlOzqaSTSPibGFC5DZXUyeld12hApO2oj+EDzIzYq+FNN6sWgFZInUjQ0E8jSdEO7LzZiWWtHTgdON/YwaaQrXjDZZKM30Dj9W834IVx9r/jR3+i7C8RBchTffJ9IAvg==

**AYIXON SÁNCHEZ REYES | Fecha:2020-11-30 19:48:12 | Firmante**

TOjPyegVTmcMFSjE/KzDvNOGQAsdPgs44zSB/cU5+QSST1F7WoQmve9buO7UlcZ5gNnf0hVw28ayblc/INhE26JjrN0C5/g/U2Y+I2B5PW5y23ijNIJfyIE34nvFt5OX8NeZa2SVvgYVsTvZifWUst6bUx9QmmZwib08c1ti3EMTvi7U7FSsKPHrrskFmkI2Njg5TGZX2+5ZOQIOmZhV6rz4+VAOsi8v+kNzGcw63wgu///DvFSGHJ19s0uAUhs7nQwDsWCSRAqCN8oSvYqMz1/3SELPcfWsqPfeGudRcqPInVRS/VYjc4QD90FihKxpl7rzQ6Wo6xwzuYulXbwOKw==

**RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2020-11-30 20:22:56 | Firmante**

BPtaw75PogpytWk5F5Acv+3xycI64M7gEmmzQPoRa4mLzZ3npf5+QXHRdUu32PVMwaSY2p4VIUmH79OFpXI2/Xg9iNskuy7gFlnRLeDQGdoNdXDoVNPdP8DvWstXqJpxo5tUTGhPvDhpsGs+a2vu3/kR57M37tRHUdHsaLq5CrUXzvHhCrrOxcLMNYTz61Utk/nMi5EfmD8xzNA0pfcVcp/Zjo7OpniJHt+AC3NLJleSQHHL8v1NYg0yRNzvw6wL5XuXuzvyy/yXS1TCcw5unmqD2SpH/eXQHtkiUYZdpELuPyYvyzNgO7kCwxATNVgZ2RBoPzMIOZtDz/KL7nXg==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2020-11-30 20:31:50 | Firmante**

fcABXEzcgXZ2aHLG50kKyYPgHQMUqzdlu4Dvdw+uN9GezuRnI47Rm3r6Lnv62A4tl+g8r/R7a6T4sPRaiR0ZOQLkj5CIK+FYfWKIKOIBYQLd2BRGOO0e9XBoYe3aWe/cTk+Lb8eJ4XYnrciSbko5ZkKuYi1bFS14yN+D/6FBxi99A54jqhc5zXGep6oPE/ulwkLmpFBPgQUQU47sJBej3rEC7Qjx6RqyJrMiMbqDB0aTgiXKCYsbxJec0nmzxiDiXiuzgsElu5ILrkUpjeqcli8EZcTVRHE7D0uayYJyUJNAE9vcmO/1WZuNihRoijsav21Z7FHQU0+5MPenw==

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



Yz1aoU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/lme5jiktZsPp0BvgTKlhLwMVMgEuRF3q>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Herramientas moleculares para el estudio de las hidrofobinas SIH1, SIH2  
y SIH4 del hongo halófilo *Aspergillus sydowii***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. WENDY MÉNDEZ ORTEGA

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. MARIA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

## **Jurado**

- Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
- Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla
- Dr. Ramón Alberto Batista García
- Dra. Carmen Nina Pastor Colón
- Dr. Ayixon Sánchez Reyes

## **Agradecimientos**

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol, por aceptarme en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB.

A mi asesora la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, por todo el conocimiento que me ha transmitido, por su apoyo y su consuelo en innumerables ocasiones. Mil gracias Dra.

A los miembros del comité tutorial y miembros del comité revisor de tesis.

A La Beca Nacional otorgada por el CONACYT, que me permitió realizar mis estudios de Maestría en México.

A mis nuevos amigos, a los ya conocidos y a los que se quedan para siempre. En especial a Irina, gracias por tus análisis de Microbiología, de Psicología y de la vida en general.

A todos los que contribuyeron de una forma u otra con la realización de esta tesis.

A Yoandy por arriesgarse conmigo en esta aventura.

A mi mamá y mi papá por confiar siempre en mí y ser las personas más maravillosas del mundo, por ser mi mundo.

A los que siempre me guían y acompañan, mis abuelitos.

## **Dedicatoria**

Esta victoria es más de ustedes que mía.

*A mi mamá y mi papá*

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1- INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1- Hongos halófilos .....	10
1.2- Mecanismos de halofilia .....	11
1.3- Características de las hidrofobinas .....	17
1.4- Funciones biológicas de las hidrofobinas .....	20
1.5- Morfología de las colonias de hongos halófilos .....	22
<b>2- ANTECEDENTES</b> .....	23
2.1- Características de la cepa halófila moderada <i>Aspergillus sydowii</i> .....	23
2.2- Análisis transcriptómico de <i>A. sydowii</i> .....	24
2.3- Análisis <i>in vitro</i> de hidrofobinas en presencia de sal .....	26
<b>3- Hipótesis</b> .....	28
<b>4- Objetivo general</b> .....	28
<b>5- Objetivos específicos</b> .....	28
<b>6- Materiales y Métodos</b> .....	29
6.1- Modelación <i>in silico</i> de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de <i>A. sydowii</i> .....	30
6.2- Generación de las construcciones pPICZ::SIH1, pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 para la expresión en el sistema heterólogo <i>Pichia pastoris</i> .....	31
6.2.1- Cepas fúngicas y condiciones de cultivo .....	31
6.2.2- Amplificación y clonación de los genes de hidrofobinas .....	31
6.2.3- Transformación de <i>P. pastoris</i> .....	33
6.3- Análisis de la influencia de la salinidad en el crecimiento de las colonias de <i>A. sydowii</i> en medio sólido y líquido .....	34
6.4- Generación de las construcciones mediante el sistema CRISPR/Cas9 de los genes de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de <i>A. sydowii</i> .....	35
<b>7- Resultados y discusión</b> .....	37
7.1- Modelado de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de <i>A. sydowii</i> .....	37
7.2- Generación de las construcciones pPICZ::SIH1, pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 para la expresión en el sistema heterólogo <i>P. pastoris</i> .....	42
7.3- Análisis de la influencia de la salinidad en el crecimiento de las colonias de <i>A. sydowii</i> en medio sólido y líquido .....	48

7.4- Generación de las construcciones mediante el sistema CRISPR/Cas9 de los genes de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de <i>A. sydowii</i> .....	53
<b>8- Conclusiones</b> .....	55
<b>9- Perspectivas</b> .....	56
<b>10- Referencias bibliográficas</b> .....	57

## Resumen

Los halófilos son aquellos organismos que crecen de manera óptima en presencia de NaCl ( $\geq 200\text{mM}$ ), mientras que los halotolerantes son aquellos que pueden crecer en condiciones de alta salinidad, pero su crecimiento óptimo es en su ausencia. Ambos grupos de organismos son relevantes porque pueden servir como fuente de biomoléculas tales como enzimas estables en alta fuerza iónica, biopolímeros y solutos compatibles, además de ser útiles para procesos de biofermentación, y algunos son candidatos potenciales para la biorremediación. La mayor parte de los organismos halófilos caracterizados hasta la fecha son procariontes, aunque se han descrito algunas algas y hongos con la potencialidad de crecer en condiciones de altas concentraciones de NaCl ( $>1.0\text{M}$ ). Dentro de los mecanismos de halofilia observados en hongos están: el aumento de transportadores de membrana, la acumulación de solutos compatibles y el engrosamiento de la pared celular. Un nuevo mecanismo propuesto es la expresión diferencial de hidrofobinas respecto a la salinidad del medio, lo que se ha visto en el halófilo extremo *Wallemia ichthyophaga* (Zajc et al., 2013). En el análisis transcriptómico del hongo *Aspergillus sydowii* BHH004, realizado en nuestro laboratorio, se observó la expresión diferencial de tres hidrofobinas, SIH1 y SIH2 en presencia de 2 M de NaCl y SIH4 en la condición sin sal (Pérez-Llano et al., 2020). Dado que existen pocos estudios que aborden el papel de las hidrofobinas en la halofilia, resulta relevante el análisis de las hidrofobinas en varios niveles: *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue generar herramientas para el estudio de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 del hongo halófilo *Aspergillus sydowii*. Los resultados *in silico* mediante la generación de modelos tridimensionales nos indican que estas proteínas tienen una carga electrostática negativa, que se encuentra localizada en una de sus caras, aunque SIH4 tiene mayor homogeneidad de cargas negativas que las otras dos. Para estudiar las hidrofobinas *in vitro*, hemos generado las construcciones pPICZ::SIH1, pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 para la posterior expresión en el sistema heterólogo *Pichia pastoris* y purificación; para hacer estudios biofísicos de su comportamiento a distintas concentraciones de sal. Para los estudios *in vivo* se realizaron las construcciones para el uso del sistema CRISP/Cas, sin embargo, los RNA guías no fueron introducidos de manera eficiente en el vector, por lo que generamos nuevos oligonucleótidos para hacer las construcciones de manera tradicional por recombinación homóloga. A manera de conclusión, los análisis *in silico* mostraron que las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de manera general son proteínas ácidas. Se generaron las construcciones para la expresión heteróloga de las hidrofobinas en *Pichia pastoris*. No se obtuvieron las construcciones

adecuadas para generar a las cepas mutantes de estas proteínas. En estudios a mediano y largo plazo se generarán las cepas mutantes a través del sistema de recombinación homóloga, y se expresarán y purificarán las hidrofobinas para su posterior análisis biofísico.

## Abstract

Halophiles are organisms that grow optimally in the presence of NaCl ( $\geq 200\text{mM}$ ), while halotolerants can grow in hypersaline conditions, but their optimal growth is in the absence of salt. Both groups are relevant because they can serve as a source of biomolecules such as stable enzymes in high ion strength, biopolymers, and compatible solutes, as well as being useful for biofermentation processes, and some are potential candidates for bioremediation. Most of the halophilic organisms characterized to date are prokaryotes, although some algae and fungi have been described with the potential to grow in hypersaline conditions ( $\text{NaCl} > 1.0\text{M}$ ). Among the halophile mechanisms observed in fungi we can find increased number of membrane transporters, accumulation of compatible solutes, and thickening of the cell wall. A new mechanism proposed is the differential expression of hydrophobins regarding the salinity of the medium, which has been seen in the extreme halophile *Wallemia ichthyophaga* (Zajc et al., 2013). In the transcriptomic analysis of the fungus *Aspergillus sydowii* BHH004, carried out in our laboratory, the differential expression of three hydrophobins, SIH1 and SIH2 were observed in the presence of 2M of NaCl and SIH4 in the condition without salt (Pérez-Llano et al., 2020). Since there are few studies addressing the role of hydrophobins in halophilia, the analysis of hydrophobins at various levels is relevant: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo*. Therefore, the objective of this work was to generate tools for the study of SIH1, SIH2, and SIH4 hydrophobins of the halophilic fungus *Aspergillus sydowii*. The results at the *in-silico* level by generating three-dimensional models indicate that these proteins have a negative electrostatic charge, that is located on one of their faces, although SIH4 has greater homogeneity of negative charges than the other two. To study hydrophobins *in vitro*, we have generated the constructions pPICZ::SIH1, pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 for further expression in the *Pichia pastoris* heterologous system and purification, to do biophysical studies of their behavior at different salt concentrations. For *in vivo* studies, constructions were carried out for the use of the system CRISP/Cas, however, the guide RNAs were not efficiently introduced into the vector, so we generated new oligonucleotides to make the constructions in a traditional way by homologous recombination. To summarize, *in silico* analyses showed that SIH1, SIH2, and SIH4 hydrophobins are generally acidic proteins. Constructions were generated for the heterologous expression of hydrophobins in *Pichia pastoris*. The right constructions were not obtained to generate the mutant strains of these proteins. In medium and long-term studies, the mutant strains will be generated through the homologous recombination system,

and the hydrophobins will be expressed and purified for their subsequent biophysical analysis.

## 1- Introducción

### 1.1 Hongos halófilos

La vida en ambientes extremos está dominada por los microorganismos. Estos son considerados organismos extremófilos (Gostinčar et al., 2010; N. Gunde-Cimerman et al., 2003). Particularmente, en los ambientes hipersalinos naturales predominan diferentes especies de levaduras negras y hongos melanizados del género *Cladosporium*, algunas especies anamorfos de *Aspergillus* y *Penicillium*, teleomorfos de *Emericella* y *Eurotium*, algunas especies de levaduras no melanizadas y *Wallemia* spp. (Nina Gunde-Cimerman & Zalar, 2014). Estos microorganismos son halófilos o halotolerantes, o halotolerantes extremos. Los halófilos crecen en condiciones de alta salinidad y requieren determinada concentración de sal para su crecimiento óptimo ( $\geq 200\text{mM}$ ) (Plemenitaš et al., 2014). Son filogenéticamente diversos, con reportes de organismos pertenecientes a los tres dominios: Archaea, Bacterias y Eukarya (Tafer et al., 2019). Los halotolerantes tienen su crecimiento óptimo sin sal, pero pueden tolerar concentraciones de hasta 30% (equivalente a 5.13 M) de sal (Plemenitaš et al., 2014). Tanto los halófilos como los halotolerantes son capaces de contender con dos condiciones nocivas para la célula: el estrés osmótico y el estrés iónico, estímulos ambientales provocados por la sal circundante. Como consecuencia del estrés osmótico sale el agua del interior de la célula provocando la deshidratación del citosol. Por otra parte, bajo condiciones de estrés iónico aumenta la entrada de iones a la célula, lo que provoca daños en las membranas y en los sistemas citosólicos (Plemenitaš et al., 2014). A pesar de esto, se ha aislado un gran número de microorganismos de sitios hipersalinos (Gostinčar et al., 2010). En los ambientes hipersalinos existe poca disponibilidad de agua para el crecimiento bacteriano, esto se conoce como baja actividad de agua ( $a_w$ ), los organismos que crecen en esta condición se clasifican como xerófilos (Gostinčar et al., 2011). En el Mar Muerto uno de los ambientes más extremos y hostil del planeta, por su alta salinidad y baja actividad de agua, se han aislado varias halobacterias (Archaea), una especie de alga verde (*Dunaliella parva* Lerche) y varios taxones fúngicos, incluidos hongos filamentosos (Kis-Papo et al., 2014). Del género *Aspergillus* se han aislado los halófilos *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii* y *Aspergillus ruber* (Batista-García et al., 2014; DasSarma & DasSarma, 2015; Kis-Papo et al., 2014). Entre los hongos basidiomicetos halófilos aislados se encuentran algunos como *Wallemia ichthyophaga*, *Wallemia muriae* y *Wallemia sebi*, del orden de los Wallemiales. Los miembros de este orden se caracterizan por ser xerófilos/halófilos o xerotolerantes (Nina Gunde-Cimerman et al., 2009). Se consideran xerófilos los microorganismos con crecimiento óptimo en  $a_w$  de 0.85, que

corresponde a 17% (2.90 M) de NaCl o 50% (2.77 M) de glucosa en el medio de cultivo (Nina Gunde-Cimerman et al., 2009), mientras que los xerófilos extremos pueden crecer hasta en 0.75 de  $a_w$ , lo cual es equivalente al punto de saturación de NaCl (Grant et al., 2004; N. Gunde-Cimerman et al., 2003). *Wallemia ichthyophaga* es un halófilo obligado que requiere, para crecer, al menos 1.5 M de NaCl, o el equivalente de  $a_w$  para otro osmolito, y soporta hasta 5 M de NaCl al igual que el halotolerante extremo *Hortaea werneckii*. Ambos son modelos para el estudio de las estrategias de halofilia en hongos (Gostinčar et al., 2011; Plemenitaš et al., 2014).

## 1.2- Mecanismos de halofilia

La capacidad de sobrevivir al estrés salino requiere de varias adaptaciones en los organismos, tanto morfológicas como funcionales entre los dominios. Por ejemplo, las arqueas halófilas mantienen el balance iónico mediante la acumulación de una cantidad de KCl en el citosol equivalente a la concentración de NaCl del exterior, mecanismo conocido como "salt in". Esto implica que las proteínas intracelulares son funcionales en medios de alta fuerza iónica (DasSarma & DasSarma, 2015). En contraste, las eubacterias y los eucariontes halófilos usan la estrategia "salt out" que consiste en sacar el sodio del interior de la célula y a la vez acumular solutos orgánicos osmóticamente activos para evitar la pérdida de agua (DasSarma & DasSarma, 2015). Los solutos osmóticamente activos o "solutos compatibles" pueden ser sintetizados por la célula o transportados del espacio extracelular. Son compuestos polares y eléctricamente neutros, de distinta naturaleza química: azúcares (sacarosa, trehalosa), aminoácidos (prolina, glicina betaína, glutamina) y polialcoholes (manitol, arabitol, glicerol, eritritol). Los polialcoholes o polioles son los más usados por los eucariontes, particularmente en los hongos se han identificado: eritritol, manitol, arabitol y glicerol (Plemenitaš et al., 2014).

La vía de alta osmolaridad de glicerol, conocida como HOG (por sus siglas en inglés High Osmolarity Glycerol), es la principal vía en hongos de respuesta a estrés osmótico y ha sido ampliamente estudiada en la levadura halotolerante *Saccharomyces cerevisiae* (Saito & Posas, 2012). La vía de HOG descrita en *S. cerevisiae* está constituida por dos ramas funcionalmente redundantes, pero estructuralmente distintas, una que involucra a la proteína SHO1 y la otra a SLN1, y ambas convergen en la MAP quinasa Pbs2, activador de la MAP quinasa Hog1 (Plemenitaš et al., 2014). En *W. ichthyophaga* y *H. werneckii* se encontraron homólogos de SHO1 y SLN1 (Plemenitaš et al., 2014). Tras un choque osmótico, ocurre pérdida de agua en la célula, se activa la vía de HOG donde una fracción

sustancial de la MAPK Hog1 que se encuentra fosforilada (proteína central de la vía) es transportada al núcleo. Consecuentemente hay regulación en la transcripción y el ciclo celular, y se activan las vías de síntesis de glicerol, entre otras. Una vez que el equilibrio osmótico se ha restablecido, la actividad de la MAP quinasa Hog1 vuelve a niveles basales y se exporta de vuelta al citoplasma (Plemenitaš et al., 2014; Saito & Posas, 2012). Aunque en *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus ruber*, *W. ichthyophaga* y *H. werneckii* el glicerol es el principal soluto compatible utilizado, también se han cuantificado otros polioles como arabitol, eritritol y manitol, pero en menor concentración (Nina Gunde-Cimerman & Zalar, 2014; Plemenitaš et al., 2014). En el transcriptoma de *A. ruber* en condiciones de alta salinidad se sobreexpresaron transcritos para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, relacionada con la síntesis de glicerol (Kis-Papo et al., 2014).

Para lidiar con el estrés iónico generado por la alta salinidad es necesario mantener una concentración intracelular óptima de iones de potasio, además la relación  $K^+/Na^+$  debe ser alta y estable. Bajo estrés iónico *S. cerevisiae* utiliza tres estrategias generales para evitar la entrada de sodio a la célula: (i) discriminación estricta entre cationes metálicos a nivel de la afluencia (transportadores que muestran una mayor afinidad por el potasio que por el sodio), (ii) el eflujo eficiente del excedente de cationes de células y (iii) secuestro selectivo (compartimentación) de cationes en organelos (Ariño et al., 2010). Esto incluye a seis sistemas de transporte a través de la membrana plasmática, Trk1 y Trk2 para la absorción de  $K^+$ , el canal de  $K^+$  Tok1, el simportador Pho89 de  $Pi-Na^+$ , el sistema de eflujo Ena  $Na^+$ -ATPasas y el antiportador Nha1 de  $Na^+/H^+$ . Junto con estos, se ha descrito que los transportadores proteicos no específicos (Pm3, Qdr2) están involucrados en el flujo  $K^+/Na^+$  (Ariño et al., 2010).

Por otra parte, *H. werneckii* cultivado en un medio sin NaCl, acumula mayor cantidad de  $K^+$  que de  $Na^+$ , en una proporción de 2.24 ( $K^+/Na^+$ ). Sin embargo, con 25% (4.28 M) de NaCl en el medio la concentración de  $K^+$  disminuye y aumenta la de  $Na^+$ , por lo que la proporción  $K^+/Na^+$  disminuye a 0.42 (Kogej et al., 2005). El análisis del genoma de *H. werneckii* muestra una considerable expansión en la familia de genes que codifican para transportadores de cationes metálicos en la membrana plasmática, especialmente los homólogos a Trk1, Trk2, Tok1, Nha1 and Pho89 de *S. cerevisiae* (Lenassi et al., 2013). En *H. werneckii* se identificaron ocho homólogos de Trk1 y Trk2 (Plemenitaš et al., 2014).

Igualmente, en el interior de las células de *W. ichthyophaga* en condiciones de alta salinidad la proporción  $K^+/Na^+$  disminuye. Sin embargo, en este hongo esa relación intracelular es mayor y menos pronunciada en toda la gama de salinidad (de 0% a 25% de NaCl, que sería

lo mismo que de 0 M a 4.28 M) en comparación con *H. werneckii*, como se muestra en la figura 1 (Plemenitaš et al., 2014). Los datos del genoma de *W. ichthyophaga* muestran que sólo hay un número bajo de transportadores catiónicos, a excepción del enriquecimiento de la familia de las sodio ATPasas tipo P (Plemenitaš et al., 2014; Zajc et al., 2013).

También el genoma de *Aspergillus salisburgensis* contiene la mayoría de los transportadores que están involucrados en el tráfico iónico que se informó en *S. cerevisiae* y *H. werneckii* durante el estrés osmótico, con excepción del transportador Tok1. Sin embargo, si se encontró Tok1 en el halotolerante *Aspergillus sclerotialis*, pero la regulación de su expresión fue cuatro veces menor en la condición de 20% (3.42 M) que en 5 % (0.85M) de NaCl, mientras que la regulación de Nah1, el antiportador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, fue seis veces mayor, en 20% que en 5% (Tafer et al., 2019). El transcriptoma de *A. salisburgensis* en 20% (3.42 M) de NaCl muestra una sobreexpresión de los genes que codifican para los transportadores de la superfamilia facilitadora principal MFS (del inglés Major Facilitator Superfamily), que transportan moléculas pequeñas dependiendo de los gradientes de iones quimiosmóticos; la presencia de estos podría ser una respuesta al estrés osmótico (Tafer et al., 2019). En el caso de *A. ruber* en medios hipersalinos hay mayor regulación de los genes para las permeasas zinc/hierro, los canales de calcio dependientes de voltaje y una ATPasa que transporta metales pesados. Además, hay inducción de los miembros de MFS, muchos de ellos conocidos como "transportadores de solutos activos secundarios" (Kis-Papo et al., 2014).

Se considera que la membrana citoplasmática y la pared celular son la principal defensa de los microorganismos en condiciones de estrés salino. En hongos filamentosos se ha observado el engrosamiento de la pared celular y modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática en ambientes hipersalinos (Turk et al., 2007; Zajc et al., 2013). En la levadura halotolerante *A. pullulans*, aumenta la fluidez de la membrana con el aumento de la concentración de sal en el medio (Turk et al., 2007). Es posible que el halófilo *A. sydowii* tenga un comportamiento similar, porque en su transcriptoma hay sobreexpresión de transcritos para enzimas relacionadas con la insaturación de los ácidos grasos de la membrana en la condición de 2 M de NaCl. (Pérez-Llano et al., 2020).

La pared celular de los hongos se compone de diferentes polisacáridos. Generalmente está formada por un núcleo fibrilar de ramificaciones de  $\beta$ -(1,3)-glucano, con algunos puntos de ramificación  $\beta$ -(1,6)-, al que se unen covalentemente, de quitina/quitosano, de  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,4)-glucano y de  $\beta$ -(1,5)-galacto- $\alpha$ -(1,2)- $\alpha$ -(1,6)-manano (GM) (Free, 2013). La concentración y localización de estos polisacáridos difiere entre los conidios y las hifas.

Además, los conidios están cubiertos por capa proteica (de hidrofobinas) superficial seguida de una capa de melanina, que le confiere hidrofobicidad y los hace inertes para el sistema inmunológico del hospedero, en el caso de algunos patógenos como *Aspergillus nidulans* (Beauvais et al., 2014).

En *W. ichthyophaga* la pared celular se engrosa en un factor de 2.6 al aumentar de 15% (2.57 M) a 25% (4.28 M) la concentración de NaCl en el medio (Kunčič et al., 2010). Esto fue similar a lo observado en el halófilo *Aspergillus sydowii*, en la condición de 2.0 M de NaCl donde hay un engrosamiento significativo de la pared celular comparado con las condiciones de 0.5 M de NaCl y sin sal, además de que la pared adopta una estructura lamelar (Pérez-Llano et al., 2020).

Por otra parte, el transcriptoma del halófilo *A. salisburgensis* en alta salinidad muestra un aumento de los transcritos que codifican para proteínas que se localizan en la región extracelular, algunos de ellos relacionados con la reparación de la pared celular como la D-alanina-D-alanina ligasa y la manosa-6-fosfato isomerasa. Este resultado podría indicar que están ocurriendo daños en la pared celular cuando crece en 20% (3.42 M) de NaCl (Tafer et al., 2019). Además, el transcriptoma de *A. ruber* crecido en tres diluciones de agua del Mar Muerto (5, 30 y 50%, esto equivale a 0.85 M, 5.13 M y 8.55 M) mostró que en la condición de hipersalinidad hay enriquecimiento de los transcritos relacionados con procesos biosintéticos de beta-glucanos y de unión a quitina. Esto sugiere que las propiedades biofísicas de la pared celular se reajustaron en esta condición (Kis-Papo et al., 2014).

Otra adaptación observada en condiciones hipersalinas es el fortalecimiento de la pared celular con un recubrimiento proteico, disminuyendo la permeabilidad y evitando la entrada excesiva de sodio a la célula. Esta función podría atribuirse a las hidrofobinas, las cuales se ubican en la superficie externa de la pared celular de los hongos filamentosos. En distintos reportes se ha mostrado la expresión diferencial de las hidrofobinas bajo distintas condiciones de la salinidad en el medio. En el 2013, Zajc y colaboradores, reportaron que *W. ichthyophaga* tiene un genoma de 9.6 Mb, mientras que la mayoría de los genomas de los basidiomicetos halófilos son el doble de grandes. Este solo tiene 1.67% de secuencias repetidas y casi las tres cuartas partes consiste en secuencias de ADN codificante. Sin embargo, es significativo que se haya identificado la presencia de 26 genes para hidrofobinas, en comparación con *W. sebi* en el cual se han estimado 15 genes para hidrofobinas, lo que consiste en una expansión de esta familia de proteínas. En el género

*Aspergillus* se ha estimado que el número de hidrofobinas por especie está entre seis y diez, con un promedio de nueve (Pérez-Llano et al., 2020).

Además, en el transcriptoma de *W. ichthyophaga* se observa expresión diferencial de al menos 12 genes que codifican para las hidrofobinas que depende de la salinidad del medio. De estos, ocho se sobreexpresan en 10% (1.71 M) de NaCl y cuatro en 30% (5.13 M) de NaCl (Zajc et al., 2013), por lo que estos autores sugirieron que la regulación en la expresión de estas proteínas podría ser un mecanismo de halofilia aún no descrito y que aún no se ha validado experimentalmente (Plemenitaš et al., 2014; Zajc et al., 2013).

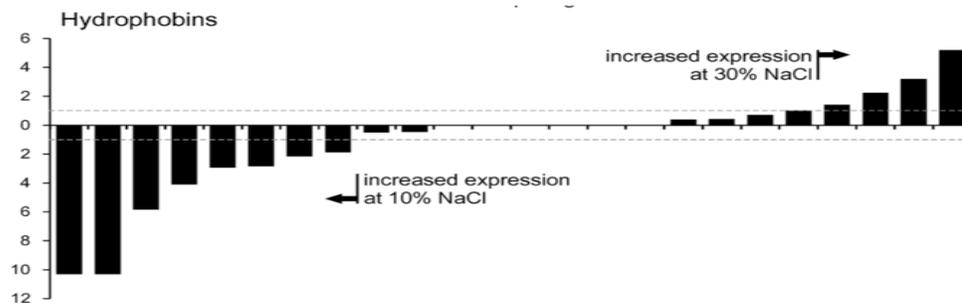


Figura 1: Expresión diferencial de transcritos para hidrofobinas en *W. ichthyophaga* en distintas concentraciones de sal en el medio (Zajc et al., 2013).

De manera interesante el análisis transcriptómico del halotolerante *Aspergillus sclerotialis* y del halófilo moderado *A. sydowii* crecidos en diferentes concentraciones de sal (5% (0.85 M) y 20% (3.42 M), y sin sal, 0.5 y 2 M de NaCl, respectivamente), muestran la expresión de hidrofobinas, una para el primer hongo y tres transcritos para el segundo, dos de las cuáles se expresan en la salinidad máxima (2 M de NaCl) (Pérez-Llano et al., 2020; Tafer et al., 2019). Curiosamente en *A. salisburgensis* no hay expresión de genes relacionados a estas (Tafer et al., 2019), por lo que la regulación de la expresión de estas hidrofobinas podría estar relacionada con la resistencia del hongo a la alta salinidad, como previamente se ha sugerido para *W. ichthyophaga* (Zajc et al., 2013).

A pesar de tener información de mecanismos moleculares que les permiten a hongos halófilos y halotolerantes crecer en ambientes hipersalinos, aún existen muchas incógnitas en muchos hongos. Por ejemplo, de *Aspergillus versicolor* y *A. sydowii* no se conocen en detalle las vías de señalización y los factores de transcripción que intervienen en las modificaciones de la pared celular, ni tampoco cómo se lleva a cabo la regulación de la expresión de hidrofobinas cuando crecen en ambientes con alta salinidad.

*H. werneckii* *W. ichthyophaga*

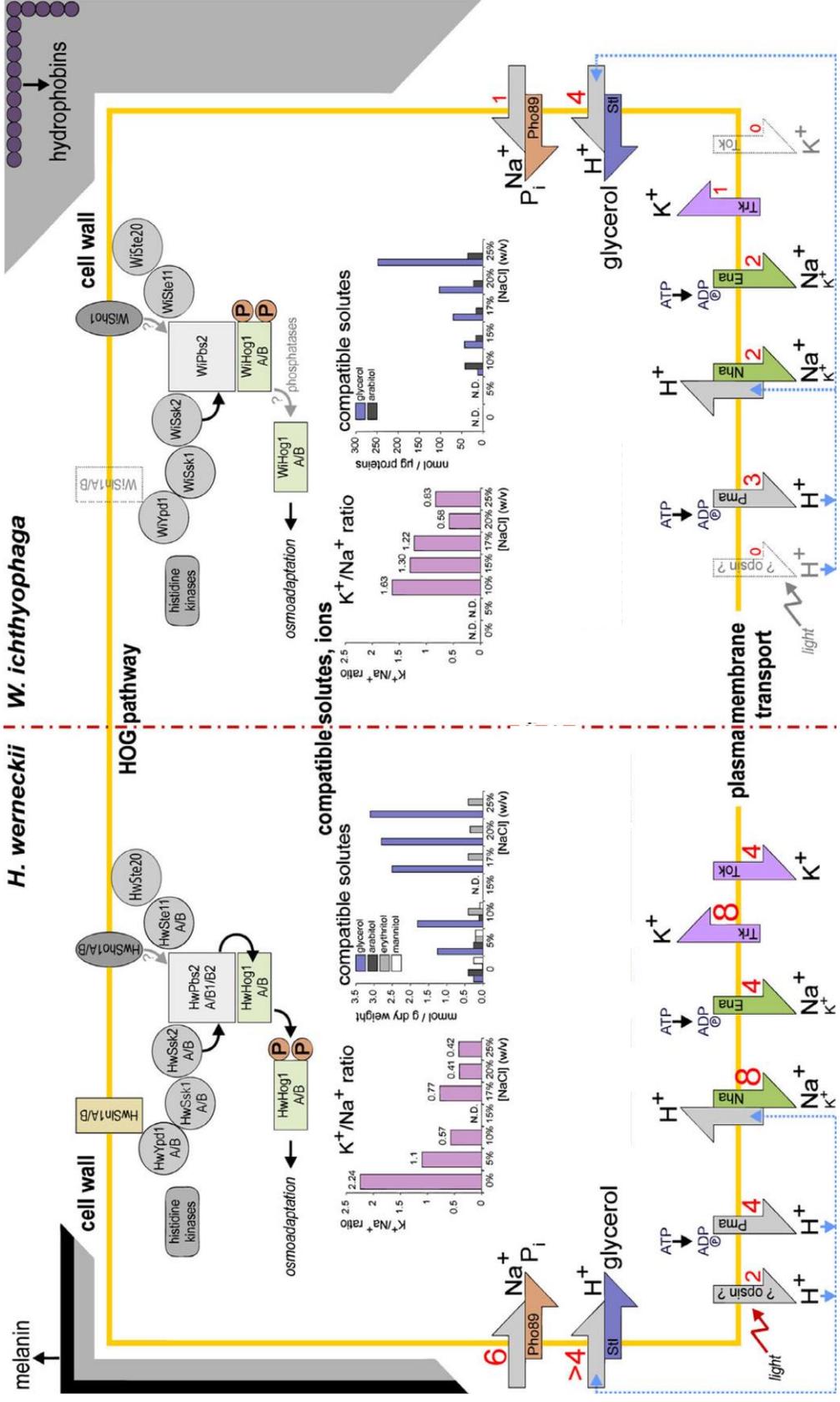


Figura 2: Representación esquemática de las adaptaciones a la halofilia en los organismos modelos *H. werneckii* y *W. ichthyophaga* (Plemenitaš et al., 2014).

### 1.3- Características de las hidrofobinas

Las hidrofobinas son un grupo de proteínas pequeñas (~20 kDa) producidas por los hongos filamentosos. Son anfipáticas, es decir tienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, por lo que tienen alta actividad superficial (Linder et al., 2005). El término de "hidrofobina" había sido acuñado anteriormente para compuestos hidrofóbicos presentes en la pared celular de microorganismos procariontes y eucariontes. A principios del año 1991 se identificó en el hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans* un gen denominado *rodA* que codifica para un polipéptido pequeño, moderadamente hidrofóbico que recubre la superficie de la pared celular de las esporas, pero no fue hasta mediados de 1991 que se le dio el término de hidrofobinas a una familia de proteínas hidrofóbicas ricas en cisteínas en el hongo basidiomiceto *Schizophyllum commune* (Wessels et al., 1991). Una vez que el término fue reajustado, la proteína RodA producto del gen *rodA*, también se clasificó como hidrofobina (Stringer et al., 1991). Las hidrofobinas tienen ocho residuos de cisteínas altamente conservados, que forman puentes disulfuros entre sí, con patrones de hidrofobicidad característicos de proteínas hidrofóbicas y un péptido señal (Linder et al., 2005; Wessels, 1997). La formación de los puentes disulfuros generan un patrón característico (C1-C6, C2-C5, C3-C4, C7-C8) que se ha observado en muchas hidrofobinas (Valsecchi et al., 2019). Independientemente de los residuos de cisteínas en posiciones conservadas se ha visto que las hidrofobinas tienen poca homología entre el resto de sus aminoácidos, incluso entre las de una misma especie (Wessels, 1997).

Inicialmente se clasificaron en clase I y clase II, basándose en la interacción con el solvente, perfiles de hidrofobicidad y por la separación entre los residuos de cisteínas conservados. Recientemente se propuso una tercera clase, intermedia entre la I y la II, llamada clase III (Sunde et al., 2008; Valsecchi et al., 2019). Las de clase I presentan este patrón de cisteínas: X<sub>7</sub> – C – X<sub>5-7</sub> – C – C – X<sub>19-39</sub> – C – X<sub>8-23</sub> – C – X<sub>5</sub> – C – C – X<sub>6-18</sub> – C – – X<sub>2-13</sub>, son altamente estables y solo se solubilizan con ácido fórmico o ácido tricloroacético. Forman una monocapa en forma de bastones conocida como rodlets (ver figura 3), y tienen forma de fibras amiloide funcionales, ya que tienen entrecruzamiento de estructuras de hojas β, además de la capacidad de formar monocapas anfipáticas en un interface hidrofóbica/hidrofílica (ver figura 3) (Morris et al., 2013). Por lo general las de clase I se encuentran recubriendo la superficie de muchos conidios (Ball, Kwan, et al., 2020).

Las secuencias peptídicas de las hidrofobinas de clase II son generalmente más cortas que las de la clase I y presentan el siguiente patrón: X<sub>7</sub> – C – X<sub>9-10</sub> – C – C – X<sub>11</sub> – C – X<sub>16</sub> – C – X<sub>8-9</sub> – C – C – X<sub>10</sub> – C – X<sub>6-7</sub>. Estas se pueden solubilizar en mezclas de etanol y SDS (Ball, Kwan, et al., 2020). Por otro lado, la clase III tienen el patrón de cisteínas: X<sub>7</sub> – C – X<sub>8;11-14</sub> – C – C – C – X<sub>5-17; 40-42</sub> – C – X<sub>3-8; 23-41</sub> – C – X<sub>4; 6-9</sub> – C – C – X<sub>4; 5; 21-35</sub> – C – X<sub>14-45; 7</sub>, y también difieren en el perfil de hidropatía respecto a las otras dos clases (Valsecchi et al., 2019). Se ha visto que la separación entre los ocho residuos de cisteínas conservados muestra mayor variación en las de clase I que en las de clase II (Przylucka et al., 2017).

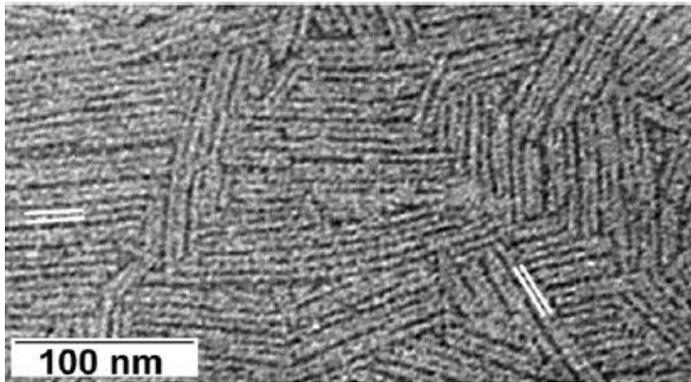


Figura 3: Autoensamblaje tipo rodlets formado por la hidrofobina DewA de clase I, de *A. nidulans* (Morris et al., 2013).

Todavía hay muchas hidrofobinas que no pueden ser clasificadas, porque no cumplen con los parámetros de las clases existentes. A pesar de esto, todas tienen la capacidad de autoensamblarse en interfaces hidrofílicas/hidrofóbicas, formando una película entre la pared celular y el ambiente, y le dan un carácter hidrofóbico a la estructura recubierta. Esto último se comprobó mediante la generación de mutantes de *T. reesie* que carecían de la expresión de *hfb1* que codifica para la hidrofobina HFB I, como consecuencia disminuyó la hidrofobicidad de las hifas, en comparación con la cepa silvestre (Askolin et al., 2005).

Dentro de sus rasgos estructurales está la formación de un barril beta central, compuesto por cuatro hojas betas antiparalelas que se entrelazan mediante bucles (L1, L2 y L3), los cuales tienen una longitud variable en dependencia de la hidrofobina y en algunos casos hay estructuras secundarias en los bucles (ver figura 4) (Gandier et al., 2017).

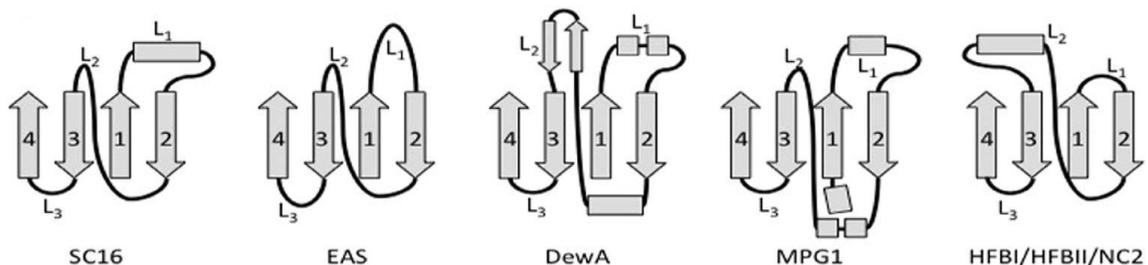


Figura 4: Representación de las estructuras secundarias de varias hidrofobinas. Las cuatro hojas  $\beta$  están numeradas (del 1 al 4) y los bucles representados como L1, L2 y L3. Las de clase I: SC16 de *S. commune*, EAS de *Neurospora crassa*, DewA de *A. nidulans* y MPG1 de *Magnaporthe grisea* y las de clase II: HFB I y HFB II de *Trichoderma reesei* y NC2 de *Neurospora crassa* (Gandier et al., 2017).

El primer reporte con la estructura tridimensional de hidrofobinas fue hecho en el 2004, por Hakanpää y colaboradores. Mediante técnicas de cristalografía se pudo resolver la estructura de HFB II de *T. reesei*, de clase II, con 1 Ångström de resolución (PDBID IR2M). Tiene una estructura beta central, formada por un motivo de horquillas  $\beta$  (hebras S1 y S2; S de strands) unido a un segundo motivo de horquillas  $\beta$  (hebras S3 y S4, por strands) mediante una hélice  $\alpha$ . La estructura terciaria adopta una forma de barril dada por las cuatro hojas  $\beta$  antiparalelas (Hakanpää et al., 2004). Este barril  $\beta$  está estrechamente ligado por la presencia de los cuatro puentes de disulfuro y tiene dos bucles cortos (L1 y L2) y otro un poco más largo (L3) (ver figura 5), con una hélice  $\alpha$  en L2 hacia la periferia del barril  $\beta$  (Ball, Kwan, et al., 2020).

Por otra parte, la primera estructura monomérica de clase I se determinó por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), revelando que EAS de *N. crassa* tenía un barril  $\beta$  central similar al de HFB I, pero significativamente diferente en las regiones de los bucles (Kwan et al., 2006). L2 en EAS contiene una hoja  $\beta$ , mientras que L1 y L3 carecen de elementos de estructura secundaria y son flexibles (Ball, Kwan, et al., 2020).

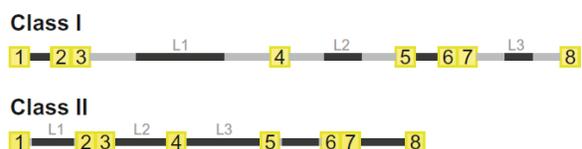


Figura 5: Representación de la distribución de los bucles (L1, L2 y L3) entre la clase I y la clase II. En cuadros amarillo y representado con números se muestran los ocho residuos de cisteínas (Ball, Kwan, et al., 2020).

También la estructura de DewA de *A. nidulans*, clase I, fue resuelta mediante espectroscopía de RMN, y consiste en una pequeña hoja  $\beta$  curvada, rodeada por tres hélices  $\alpha$ , dos hojas  $\beta$  más y otras regiones bien ordenadas que carecen de una estructura secundaria regular. El centro está formado por cuatro hojas  $\beta$  antiparalelas, hay dos bucles de unión entre las hojas  $\beta$  centrales que contienen pequeñas estructuras secundarias. Al igual que otras hidrofobinas, la estructura de DewA muestra una sorprendente separación

de los residuos cargados y los no cargados, ubicados en lados opuestos de la proteína (Morris et al., 2013).

Otra estructura resuelta recientemente por espectroscopía de RMN fue la hidrofobina RodA de *A. fumigatus*, de clase I, que forma rodlets en la superficie de los conidios. Esta estructura se organiza alrededor de los cuatro puentes de disulfuros y consiste en un barril central  $\beta$  compuesto por cuatro hojas  $\beta$  antiparalelas curvadas, dos hélices  $\alpha$  relativamente largas (H1: 49-56; H2: 79-90), una hélice  $\alpha$  corta (H4: 123-126) y dos hélices  $3_{10}$  (H3: 96-98; H5: 155-157). Dos puentes disulfuros conectan las hojas  $\beta$  en el barril y los otros dos conectan la cara externa del barril con las regiones de las hélices H1 y H4. A pesar de que las estructuras mostraron buena convergencia dentro de las regiones con estructura secundaria, hay más variabilidad en los residuos localizados hacia el extremo N-terminal y en las regiones entre las cisteínas 4-5 y 7-8. En cuanto a la distribución de cargas y la hidrofobicidad de la estructura, el monómero de RodA en solución tiene un carácter anfipático, mostrando una cara hidrofóbica con cargas compensadas, y en la cara opuesta, una superficie más hidrofílica con parches negativos y cargas positivas aisladas (Valsecchi et al., 2019).

Hasta la fecha (15/11/2020), hay resueltas 24 estructuras de hidrofobinas, depositadas en la base de datos Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), de las cuales una mitad se obtuvo por espectroscopía de RMN y la otra por cristalografía de difracción de rayos X. Estas estructuras se mencionan en la tabla 1, acompañado de los organismos que las producen. Evidentemente la resolución de estructuras de hidrofobinas sigue siendo un reto en el estudio de estas proteínas y la adición de nuevas estructuras podrían dar indicios de las distintas funciones que estas pudieran tener en los hongos.

Tabla 1: Hidrofobinas con estructuras resueltas, organismos que las producen, técnica usada y clasificación.

<b>Microorganismo (hidrofobina)</b>	<b>Código PDB</b>	<b>Técnica</b>	<b>Resolución</b>	<b>Clase</b>
<i>T. reesei</i> (HFB II) (cristal monoclinico, en presencia de detergente)	2PL6	Difracción de Rayos X	2.2 Å	Clase II
<i>T. reesei</i> (HFB I) (en presencia de detergente)	2GVM	Difracción de Rayos X	2.3 Å	Clase II
<i>T. reesei</i> (HFB I)	2FZ6	Difracción de Rayos X	2.1 Å	Clase II
<i>T. reesei</i> (HFB II) (cristal ortorrómbico, en presencia de detergente)	2PL7	Difracción de Rayos X	1 Å	Clase II

<i>T. reesei</i> (HFB II) (nanotubos anfílicos en la estructura cristalina)	3QQT	Difracción de Rayos X	1.9 Å	Clase II
<i>T. reesei</i> (HFB II) (estructura con ultra-alta resolución)	2B97	Difracción de Rayos X	0.75 Å	Clase II
<i>T. reesei</i> (HFB II)	1R2M	Difracción de Rayos X	1 Å	Clase II
<i>N. crassa</i> (hidrofobina quimérica NChi2)	4BWH	RMN	-	-
<i>N. crassa</i> OR74A (NC2)	4AOG	RMN	-	Clase II
<i>N. crassa</i> OR74A (EAS)	2LFN	RMN	-	Clase I
<i>N. crassa</i> (EAS D15 mutante)	2K6A	RMN	-	-
<i>N. crassa</i> (EAS)	2FMC	RMN	-	Clase I
<i>S. commune</i> H4-8 (HYD1)	2NBH	RMN	-	Clase I
<i>Serpula lacrymans</i>	5W0Y	RMN	-	Clase I
<i>Phanerochaete carnososa</i>	6E98	RMN	-	Clase I
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 (DewA)	2LSH	RMN	-	Clase I
<i>Magnaporthe oryzae</i> (MPG1)	2N4O	RMN	-	Clase I
<i>W. ichthyophaga</i> EXF-994	6E9M	RMN	-	Clase I
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163 (RodA)	6GCJ	RMN	-	Clase I
<i>Bacillus subtilis</i> (BslA)	4BHU	Difracción de Rayos X	1.91 Å	-
<i>Bacillus subtilis</i> (Ywea)	5MKD	Difracción de Rayos X	2.51 Å	-
<i>S. cerevisiae</i> S288C (Flo11)	4UYR	Difracción de Rayos X	0.89 Å, 1.05 Å, 1.03 Å	-

#### 1.4- Funciones biológicas de las hidrofobinas

Las funciones biológicas de las hidrofobinas están relacionadas con su capacidad de autoensamblaje, su carácter anfipático y su alta estabilidad. Conociendo estas propiedades es fácil suponer que las hidrofobinas participan en el recubrimiento de estructuras y brindando protección de las condiciones ambientales. Es sabido que los conidios de los Ascomicetos y los Basidiomicetos están recubiertos con una capa de proteínas hidrofóbicas organizadas en estructuras fibrilares conocidas como rodlets, formada precisamente por hidrofobinas (Valsecchi et al., 2019), aunque no todas las hidrofobinas pueden formar rodlets, esto es un rasgo particular de las de clase I. Los rodlets tienen aproximadamente

10 nm de diámetro, cientos de nanómetros de largo y se organizan en fascículos, recubriendo los polisacáridos de la pared celular y así le dan resistencia a las esporas ante la humedad y a la desecación (Ball, Pham, et al., 2020). Muchos patógenos humanos como *Coccidioides immitis*, *A. fumigatus* y dermatofitos tienen capas tipo rodlets en la superficie de sus conidios. La hidrofobicidad de esta superficie facilita su dispersión en el aire, la adhesión al hospedero y además podría estar vinculada en la protección frente a compuestos antimicrobianos (Ebbole, 1997).

Estas proteínas se han encontrado tanto en los conidios como en las hifas. Estudios con cepas mutantes de *T. reesei* para los genes *hfb1* y *hfb2*, que codifican para HFB I y HFB II respectivamente, sugieren que HFB I está involucrada en el desarrollo de las hifas, mientras HFB II participa en la esporulación. Las colonias mutantes para *hfb2* tenían una apariencia húmeda y la esporulación se redujo al 50%, en comparación con la cepa silvestre, mientras que las mutantes para *hfb1* mostraron un fenotipo húmedo y esponjoso, sin afectación significativa en la esporulación (Askolin et al., 2005). Otro de sus roles biológicos es la capacidad de disminuir la tensión superficial entre la superficie de la célula y el agua, lo cual permite el crecimiento de las estructuras aéreas (Linder et al., 2005), además de facilitar el intercambio gaseoso (Wösten, 2001).

En algunos casos están reguladas por el ciclo de vida de los organismos. Por ejemplo, la expresión de las hidrofobinas SC1 y SC4 de *S. commune* está regulada por los genes relacionados con el apareamiento y por los reguladores esenciales en la formación del basidiocarpo (Wessels, 1992). También se han visto reguladas por la escasez de nutrientes, como es el caso del gen *ssgA*, del patógeno de insectos, *Metarhizium anisopliae* que codifica para la hidrofobina SSGA, que se expresa tanto en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes como durante procesos de infección, creando un recubrimiento hidrofóbico en la superficie tipo rodlets (St. Leger et al., 1992). Igualmente, el gen *hfb2* que codifica para HFB II de *T. reesei* se sobreexpresa en condiciones de inanición de nitrógeno y carbono (Nakari-Setälä et al., 1996).

Por otra parte, las hidrofobinas del hongo halófilo *W. ichthyophaga* tienen mayor porcentaje de aminoácidos ácidos respecto a sus homólogos en hongos no halófilos (Zajc et al., 2013), similar a lo reportado en proteínas de arqueas halófilas (Madern et al., 2000). Esto podría resultar en una adaptación para su crecimiento en ambientes con alta concentración de sal. Al exponer los residuos ácidos en la superficie, estos pueden unir iones salinos evitando así su entrada a la célula (Plemenitaš et al., 2014).

Varias funciones de las hidrofobinas se han comprobado mediante la generación de cepas mutantes, donde se elimina la expresión del gen y por tanto la síntesis de la proteína. *Beauveria bassiana*, un patógeno de insectos de distintas especies, produce las hidrofobinas Hyd1 y Hyd2 de clase I, las cuales recubren la pared celular de los conidios. Se observó que tanto las mutantes simples como en las dobles disminuyó la tasa de crecimiento y la conidiación, en comparación con la cepa silvestre, pero no hubo diferencias significativas entre las cepas mutantes. Conociendo que este hongo puede formar asociaciones íntimas con algunas plantas, los autores sugieren que Hyd1 está involucrada en la asociación del hongo con la planta, mientras que Hyd2 tiene mayor influencia en la adhesión a los insectos (Moonjely et al., 2018).

Además, en el ascomiceto *Magnaporthe grisea*, agente causal de la enfermedad de "explosión del arroz", se determinó como el gen *Mpg1* que codifica para la hidrofobina MPG1, está involucrado en la patogénesis del hongo. Las mutaciones nulas del gen *Mpg1* producen un fenotipo de patogenicidad reducida, con baja frecuencia de desarrollo de apresorios, estructuras que son claves en el inicio del ciclo de infección (Talbot et al., 1993). Todavía queda por demostrar experimentalmente muchas de las funciones en las que se relacionan estas proteínas, pero es evidente que las hidrofobinas tienen un papel fundamental en el ciclo de vida de los hongos.

#### 1.5- Morfología de las colonias de hongos halófilos

La morfología de las colonias es un rasgo característico de cada especie de hongo y está influenciado por las condiciones del cultivo. Particularmente en los hongos halófilos y halotolerantes se ha visto como la presencia de sal en el medio afecta el fenotipo de la colonia (Kunčič et al., 2010; Pérez-Llano et al., 2020). Como se analizó anteriormente, la pared celular es esencial para mantener el equilibrio osmótico de la célula, ya que protege contra daños mecánicos, así como de las altas concentraciones de sales. Su red de peptidoglicanos le confiere dureza, pero también es altamente flexible. Este equilibrio entre estructura rígida y estructura dinámica influye en la forma de las células, en el crecimiento y la ramificación de las hifas (Kunčič et al., 2010). Sin embargo la capa de hidrofobinas hace que aumente su rigidez (Plemenitaš et al., 2014).

Un ejemplo de cómo la salinidad influye en la morfología de la colonia se evidencia en la cepa perteneciente al género *Exophiala* denominada BMH1013, aislada de un sitio contaminado con petróleo. Esta cepa muestra un dimorfismo, manifestando un desarrollo

característico de hongo filamentoso en la condición sin sal, mientras que en 0.5M su crecimiento es levaduriforme (Ide-Pérez et al., 2020).

También, el crecimiento tipo sarcina visto en *W. ichthyophaga* se considera una de sus principales estrategias de haloadaptación que podría involucrar a las hidrofobinas (Gostinčar et al., 2010; Plemenitaš et al., 2014). Cuando se cultiva en medio líquido *W. ichthyophaga* forma agregados multicelulares, lo cual difiere de lo observado en *W. muriae* y *W. sebi*. Este crecimiento micelial denso se debe a la compactación de las hifas ramificadas y entrelazadas en pellets miceliales (Kunčič et al., 2010). Las hidrofobinas podrían estar facilitando este empaquetamiento denso del micelio debido al aumento de la hidrofobicidad (Pérez-Llano et al., 2020).

Por otra parte, la melanización es una característica de los hongos con crecimiento meristemático tipo levadura que habitan en ambientes estresantes. Cabe señalar que la salinidad del medio también afecta la síntesis de melanina. El análisis del crecimiento en medio sólido del halófilo *Trimmatostroma salinum* y el xerófilo *Trimmatostroma abietis* a distintas concentraciones de NaCl, 0%, 4%, 10% y 20% (0, 0.68, 1.71 y 3.42 M) para el halófilo y 0%, 6% y 10% (0, 1.03 y 1.71 M) para el xerófilo, demostró que la sal afecta el tamaño, el color y la estructura de la colonia (Kogej et al., 2006). El halófilo *T. salinum* responde al aumento de la salinidad modificando su pared celular, aumentando la estratificación, y también se observan invaginaciones irregulares en la membrana plasmática; además el patrón de melanización se hace más denso y compacto, en forma de una capa uniforme. En ambos caso, en la condición de mayor concentración de sal se redujo el área de la colonia y se pronunció el crecimiento en sentido contrario al sustrato (Kogej et al., 2006).

## **2- Antecedentes**

Después de mostrar varias de las adaptaciones morfológicas y moleculares observadas en hongo que crecen en condiciones salinas, enfocaremos este acápite en dos estudios que se complementan para análisis de la influencia de la salinidad tanto a nivel de organismo como a nivel de proteínas. El primer estudio muestra como un organismo halófilo modifica su morfología y expresa diferencialmente transcritos para proteínas (hidrofobinas), las cuales según el segundo estudio pueden autoensamblarse y formar películas estables bajo condiciones de fuerza iónica generada por NaCl.

### **2.1- Características de la cepa halófila moderada *Aspergillus sydowii***

En estudios previos en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB, se aisló la cepa halófila *Aspergillus sydowii*, a partir de una fermentación de un lote de bagazo de caña de azúcar, con medio mineral suplementado con 2 M de NaCl (Batista-García et al. 2014). Los experimentos de crecimiento de esta cepa con carboximetilcelulosa (2%) como fuente de carbono y con concentraciones desde 0.5 M hasta 2 M de NaCl, mostraron que la velocidad de crecimiento es mayor en 0.5 y 1.0 M de NaCl, por lo que se clasificó como un halófilo moderado; de ahí que, nos resultó relevante continuar con la descripción de los mecanismos de halofilia de esta cepa. Este interés se debe a que hasta la fecha no hay suficiente información acerca de los mecanismos de haloadaptación de hongos ascomicetos, por lo que se requiere de una caracterización profunda de las estrategias que le permiten controlar la presión osmótica e iónica causadas por las altas concentraciones de NaCl en el medio circundante.

## 2.2- Análisis transcriptómico de *Aspergillus sydowii*

Pérez-Llano y colaboradores, (2020), reportaron el análisis transcriptómico de *A. sydowii* crecido en paja de trigo y con distintas concentraciones de NaCl. Los resultados obtenidos en este estudio constituyen el antecedente directo para este trabajo y muestran que el hongo expresa genes relacionados a la respuesta a estrés.

Los datos de los niveles de expresión muestran que los transcriptomas de *A. sydowii* crecido sin sal y 2.0 M de NaCl (condiciones extremas) son más parecidos entre ellos, respecto a 0.5 M (condición óptima de salinidad). Esto sugiere que la expresión en las condiciones extremas (sin sal y 2.0 M de NaCl) está mediada por mecanismos de respuestas a estrés. En relación con la respuesta a estrés osmótico, se observa expresión de los genes relacionados con la síntesis de trehalosa, pero la cuantificación de este osmolito muestra que solamente se produjo en la condición sin sal. También hay expresión de los transcritos involucrados en la síntesis y acumulación de glicerol en la condición hiperosmótica, siendo estadísticamente significativa la expresión de los genes de acumulación, dentro de los que se encuentran genes para transportadores de glicerol. La acumulación de glicerol solo se produjo en la condición de 2.0 M. En *A. sydowii* al igual que en otros hongos, la acumulación de glicerol es una respuesta característica de estrés osmótico (Pérez-Llano et al., 2020). También hay regulación en la expresión de genes relacionados con transportadores de membrana. Es interesante que la mayoría de los transcritos para transportadores que se expresan están relacionados con la internalización de azúcares, aminoácidos y otros solutos resultantes de la degradación de la paja de trigo, y no con el mantenimiento del

balance de cationes metálicos. Solo tres transcritos relacionados con transportadores de cationes metálicos tienen expresión diferencial inducida por la salinidad. Uno de ellos es *Ena2*, una sodio ATPasa, que igualmente fue identificada en *W. ichthyophaga* y *H. werneckii*, con expresión diferencial en la condición de mayor salinidad (Pérez-Llano et al., 2020).

En cuanto a las modificaciones de la pared celular, los resultados indicaron que en la condición de hipersalinidad el contenido de quitina se reduce, mientras que aumenta el contenido de  $\beta$ -glucanos o se reorganizan, generando una reducción de la elasticidad de la pared celular que brinda resistencia en los ambientes extremos. Por otra parte, no hubo cambios significativos en los transcritos de los genes involucrados en las modificaciones de la membrana plasmática, pero se sobreexpresó una D12-ácido graso desaturasa a 2.0 M de NaCl y una metil-esterol monooxigenasa a 0.5 de NaCl. La sobreexpresión de la primera implicaría un aumento en la insaturación de los lípidos, mientras que la segunda un aumento en la vía de síntesis de ergosterol (Pérez-Llano et al., 2020). La acción de ambas pudiera aumentar la fluidez de la membrana, fenómeno reportado en la levadura negra halotolerante *A. pullulans* (Turk et al., 2007).

Otro punto importante es el recubrimiento de la pared celular con hidrofobinas. En el transcriptoma de *A. sydowii* se identificaron transcritos para cuatro hidrofobinas (*sih1*, *sih2*, *sih3* y *sih4*), pero solo los genes que codifican para *sih1*, *sih2* y *sih3* se encuentran completos en el genoma de referencia secuenciado (*Aspergillus sydowii* CBS 593.65 v1.0 (de Vries et al., 2017)). En el locus genómico correspondiente al transcrito *sih4* hay una versión truncada del gen, que codifica para un producto proteico con solo cuatro residuos de cisteínas. Sin embargo, en la cepa *A. sydowii* BHH004 el transcrito está completo y la secuencia de *sih4* se clonó a partir del cDNA y se confirmó que correspondía a un gen completo de hidrofobina. Algunas de las características de las hidrofobinas de la cepa *A. sydowii* BHH004 se muestran en la Tabla 2. La expresión de los genes que codifican para hidrofobinas tuvo el siguiente comportamiento: *sih4* se expresó en ausencia de sal, mientras que *sih1* y *sih2* se expresaron en 2.0 M de NaCl, y en 0.5 M los niveles de transcritos fueron muy bajos, mientras que los niveles de expresión de *sih3* fueron cercanos a cero (figura 6). Esta expresión diferencial relacionada con la salinidad del medio, sugiere que las hidrofobinas podrían funcionar como efectores en la respuesta a estrés salino (Pérez-Llano et al., 2020), función que también se vio en *W. ichthyophaga* (Zajc et al., 2013).

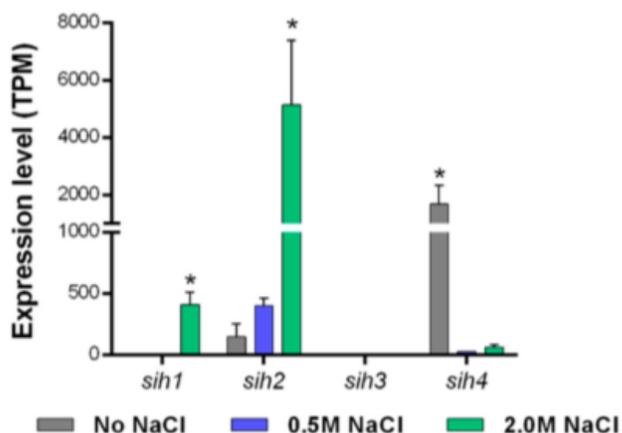


Figura 6: Expresión diferencial de los transcritos de las hidrofobinas identificados en *A. sydowii* (Pérez-Llano et al., 2020).

Tabla 2: Características de las hidrofobinas de *A. sydowii*.

Gen	Tamaño de la proteína (aa)	Clasificación
<i>sih 1</i>	129	sin clasificar
<i>sih 2</i>	137	Clase I
<i>sih 3</i>	110	sin clasificar
<i>sih 4</i>	117	sin clasificar

En este estudio se pueden observar los diferentes comportamientos del halófilo *A. sydowii* bajo distintas situaciones de estrés salino. Algunas adaptaciones son similares a las reportadas en otros hongos, sin embargo, algunas modificaciones no coinciden con lo informado anteriormente. Particularmente en el caso de las hidrofobinas, no se entiende completamente su función en la adaptación a la salinidad del medio, ni la selectividad en su expresión.

### 2.3- Análisis *in vitro* de hidrofobinas en presencia de sal

Es posible que la regulación en la expresión de hidrofobinas, observada en *A. sydowii* se relacione con las características particulares de las películas que forma cada hidrofobina por lo que es importante estudiar los factores intrínsecos que influyen en la formación de la monocapa. Recientemente Hähl y colaboradores usaron las hidrofobinas HFB I y HFB II de *T. reesei* como modelo de estudio para entender la influencia de la carga de la proteína y

de las fuerzas coulombianas intermoleculares en la cinética de adsorción; evaluaron comparativamente la cinética de la formación de la monocapa variando la fuerza iónica en el medio. La adsorción de la proteína en la interface aire-agua se obtuvo mediante mediciones elipsométricas de la película y la cinética de absorción se hizo con una concentración de proteína de 0.2  $\mu\text{M}$ , en diferentes condiciones de fuerza iónica (6 mM, 100 mM, 500 mM y 1000 mM de NaCl). Resultó que el valor de saturación, es decir la cantidad absorbida, no se vio afectada por la fuerza iónica, fue la misma en todos los casos. Sin embargo, la tasa de adsorción aumentó con mayor fuerza iónica ocurriendo la saturación de la interfaz en un menor tiempo, como se muestra en la figura 7.

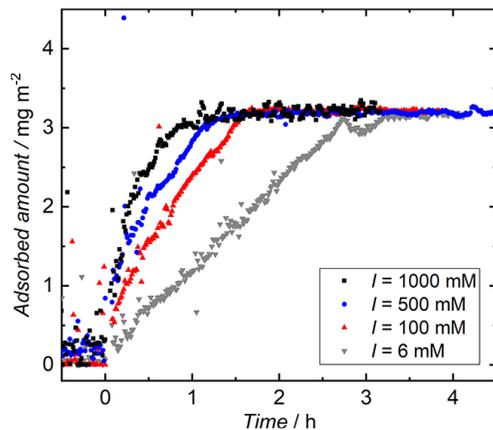


Figura 7: Cinética de adsorción para HFB II (0.2  $\mu\text{M}$ ) en diferentes condiciones de fuerza iónica, 6 mM (gris), 100 mM (rojo), 500 mM (azul) y and 1000 mM. (negro).

Además, mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se observó el proceso de ensamblaje en la interfaz para la hidrofobina HFB I (ver figura 8). Para este experimento se establecieron dos condiciones con diferente fuerza iónica (6  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  de NaCl), pero con igual concentración de proteína (0.2  $\mu\text{M}$ ), y se midió el tiempo de cobertura para la misma superficie. Resultó que en la condición de mayor fuerza iónica hay menos agrupaciones de proteínas, pero son de mayor tamaño, en comparación con la condición de menor fuerza iónica donde las agrupaciones de proteínas son más abundantes y pequeñas. Las imágenes obtenidas mediante AFM mostraron que las proteínas forman agrupaciones en la interfaz, que pueden crecer hasta alcanzar los bordes de las agrupaciones vecinas, pero no se fusionan. (Hähli et al., 2019).

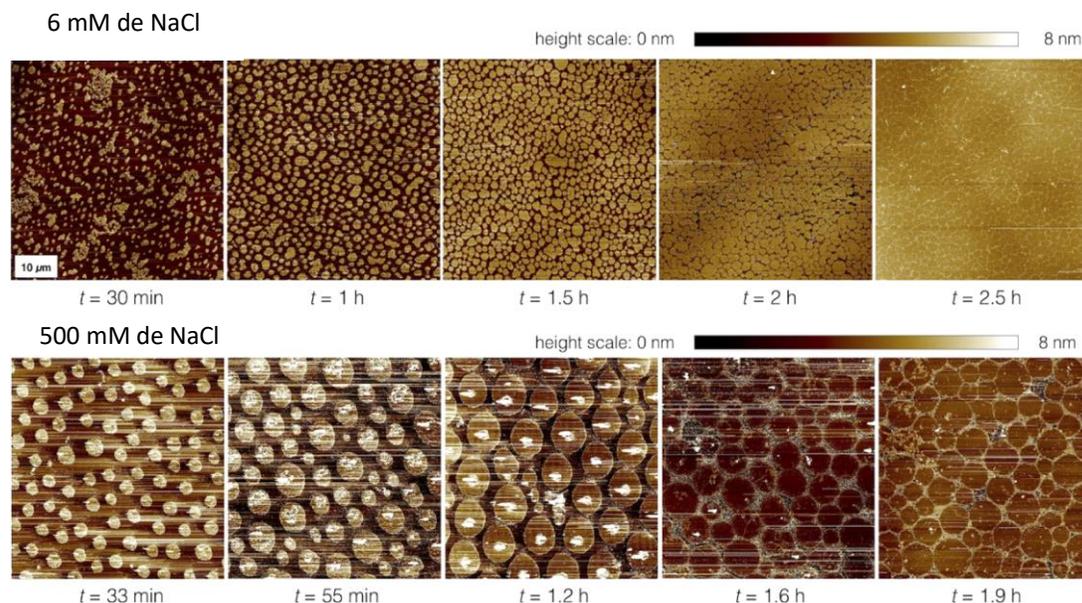


Figura 8: Agrupaciones de la hidrofobina HFB I con diferentes fuerzas iónicas (Hähli et al., 2019).

Estos resultados nos llevan a pensar que el mecanismo de ensamblaje de las hidrofobinas no es igual en todas, lo cual pudiera influir a nivel fisiológico en la adaptación de los hongos en ambientes hipersalinos y por eso su expresión selectiva dependiendo de las condiciones del medio. En este estudio se examinarán los modelos generados *in silico* de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4, para las que hubo expresión diferencial de transcritos en *A. sydowii*. Además, se expondrán los pasos de la construcción de vectores para el estudio de estas tanto *in vitro* como *in vivo*. Y también se analizarán las características de los cultivos de *A. sydowii* con distintas concentraciones de sal, las cuales podrían estar dadas por la expresión de las hidrofobinas antes mencionadas.

### 3- Hipótesis

La expresión diferencial de las hidrofobinas en el halófilo moderado *Aspergillus sydowii* es un mecanismo de respuesta a estrés salino que se relaciona a sus características estructurales.

### 4- Objetivo general

Generar las herramientas para el estudio de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 del hongo halófilo *Aspergillus sydowii*.

## **5- Objetivos específicos**

- 1- Modelar *in silico* la estructura tridimensional de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4.
- 2- Generar las construcciones de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii* en el vector pPICZ del sistema heterólogo *Pichia pastoris*, para su posterior estudio biofísico.
- 3- Analizar la influencia de la salinidad en el crecimiento de las colonias de *A. sydowii* en medio sólido y líquido.
- 4- Generar las construcciones por el sistema CRISP/Cas para mutar los genes de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii*.

## **6- Materiales y Métodos**

### **Medios de cultivo y soluciones stock**

#### **Medio LB**

Para la preparación de medio LB (Medio Luria-Bertani) se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 1 L de agua destilada: 10g de bacto-triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl. Para la preparación de LB bajo en sal se añadió la mitad de NaCl en el mismo volumen. Se ajustó el pH a 7 con NaOH y se adicionó agar al 1.5% cuando se requirió preparar medio de cultivo sólido. Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq.

#### **Medio PDA**

Para preparación de medio PDA (Agar Papa-Dextrosa) se disolvió 39g de PDA de BD Bioxon en 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq.

#### **Medio Mínimo**

Para la preparación de medio mínimo se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 1 L de agua destilada: 7.8 mg de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 18 mg de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 500 mg de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg de  $\text{ZnSO}_4$ , 50 mg de KCl, 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 2 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Luego se ajustó el pH a 6 con ácido fosfórico – KOH al 0.25 N y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq. Se adicionó agar (1.5% en molaridades menores de 2 M de NaCl y 2% para molaridades mayores) cuando se requirió preparar medio de cultivo sólido.

#### **Medio YPD**

Para la preparación de medio YPD se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 900 mL de agua destilada: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona. Se adicionó agar al 1.5% cuando se requirió preparar medio de cultivo

sólido. Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq. Se le adicionó 100 ml de 10X D para completar 1000 mL de medio.

### **Medio YPDS**

Para la preparación de medio YPDS se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 900 mL de agua destilada: 10 g de extracto de levadura, 182.2 g de sorbitol, 20 g de peptona. Se adicionó agar al 1.5% cuando se requirió preparar medio de cultivo sólido. Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq. Se le adicionó 100 ml de 10X D para completar 1000 mL de medio.

### **Solución de dextrosa 10X D (Dextrosa al 20%)**

Se disolvió 200 g de dextrosa (de la línea Bioxon) en 1000 mL de agua. se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C a una presión de 15 lb/sq.

## **Metodología**

### **6.1- Modelación *in silico* de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii*.**

Las secuencias de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii*, sin el péptido señal, se introdujeron en la base de datos SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) en formato FASTA. La biblioteca de modelos SWISS-MODEL cuenta con una amplia base de datos estructural de estructuras proteicas determinadas experimentalmente derivadas de Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). La búsqueda de templados se basa en el valor de GMQE (Global Model Quality Estimation), una estimación de calidad que combina los datos de alineamiento entre la proteína de interés-templado y la estructura del templado. Es un valor numérico que va de 0 a 1, mientras más alto será mejor la predicción del modelo. También se reportan otros parámetros como: la cobertura de alineamiento y el rango, la identidad entre la proteína de interés y el templado, entre otros datos. Una vez generados los templados, se seleccionó el que tenía mayor valor de GMQE y se construyó un modelo. Los modelos de las tres hidrofobinas tuvieron indicadores de calidad estructural deficientes, debido a la baja identidad de secuencia (apenas cercanas al 30%) con el templado, con residuos en regiones no permitidas en el mapa de Ramachandran y varios ángulos de torsión de enlaces peptídicos prohibidos. Por estos motivos fue necesario hacerle una minimización de energías a las estructuras usando el programa CHARMM-GUI (<http://charmm-gui.org/>) para agregar átomos de hidrógeno y establecer puentes disulfuro, seguido de la minimización de energía con CHARMM45. De esta forma se mejoraron los ángulos de enlace, el valor de la energía total, el empaquetamiento y la electrostática de las estructuras. Después se calculó el pKa de cada aminoácido y el punto isoeléctrico de las

proteínas a pH 6, usando el programa APBS (<http://server.poissonboltzmann.org/>). Además, se analizó la distribución de cargas en la superficie de van der Waals y la superficie de accesibilidad al solvente, para cada hidrofobina. Finalmente, las proteínas se visualizaron con el programa VMD (del inglés Visual Molecular Dynamics) (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

## **6.2- Generación de las construcciones pPICZ::SIH1, pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 para la expresión en el sistema heterólogo *Pichia pastoris*, para su posterior estudio biofísico.**

### 6.2.1- Cepas fúngicas y condiciones de cultivo

*A. sydowii* se cultivó en una fermentación semisólida en paja de trigo y diferentes concentraciones de NaCl (Sin NaCl, 0.5 M NaCl y 2.0 M NaCl). El medio de cultivo consistió de 3g de paja de trigo, pretratada mediante esterilización en autoclave, y distintas concentraciones de NaCl a la que se añadieron 30 ml de Medio Mineral suplementado con distintas concentraciones de NaCl en cajas Petri (d=25 cm) (Pérez-Llano et al., 2020). El hongo se incubó a 28°C sin agitación durante 7 días. Para la separación del micelio, la biomasa se lavó tres veces con agua destilada agitando mediante vortex. La suspensión recuperada de cada lavado se centrifugó a 4000g durante 10 minutos, y se colectó el precipitado para la extracción de ARN.

### 6.2.2- Amplificación y clonación de los genes de hidrofobinas

La amplificación de los genes que codifican para las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 se realizó a partir del cDNA generado de la purificación del RNA total de *A. sydowii* cultivado en diferentes concentraciones de NaCl. Los cebadores utilizados fueron diseñados para la inserción directa del producto de PCR en el vector pPICZ $\alpha$  con sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y XbaI (Tabla 3). En el extremo 5' del cebador directo (Fw) se añadió un sitio de corte para la endonucleasa EcoRI, seguido de la secuencia que codifica para la etiqueta myc y el sitio de corte de la proteasa Factor Xa. El cebador reverso (Rv) contiene el codón de paro y en su extremo 5' un sitio de corte para la endonucleasa XbaI. Se decidió colocar la etiqueta de myc en el extremo amino de la hidrofobina, porque un análisis de alineamiento múltiple de secuencias mostró que la mayoría de las hidrofobinas analizadas tenían alrededor de diez aminoácidos después del último residuo de cisteína. Al parecer es una característica estructural de estas proteínas y para evitar posibles problemas en el plegamiento se mantuvo la cantidad original de aminoácidos hacia el extremo carboxilo. Dado que el vector comercial pPICZ $\alpha$ , como se muestra en la figura

9, tiene la etiqueta myc hacia el extremo carboxilo de cualquier proteína clonada, y para evitar que se añadiera esta etiqueta se mantuvo el codón de paro de cada hidrofobina.

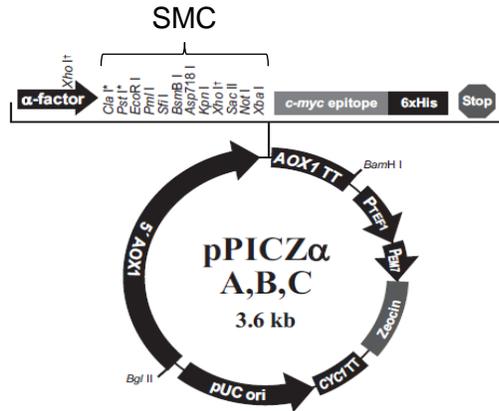


Figura 9: pPICZα, vector de expresión para *P. pastoris*. SMC, sitio de múltiple clonación.

Tabla 3: Características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de las hidrofobinas SIH 1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii* (Tesis de Maestría Pérez-Llano, 2017).

Clave	Secuencia (5'–3')	Características
FwHFB1	ATAGAATTCGAGCAGAACTCATCTCTGA AGAGGATCTGATCGAAGGTCGTATCCCC AACGGCCCTGGCTA	Sitio EcoRI Etiqueta c-myc Sitio de digestión Factor Xa Región complementaria a SIH1
RvHFB1	GCTCTAGACTAGAGAACCTTGACGGGAA TGCAAGG	Sitio XbaI Región complementaria a SIH1
FwHFB2	ATAGAATTCGAGCAGAACTCATCTCTGA AGAGGATCTGATCGAAGGTCGTGCTCCC CCCGGCCAGGCC	Sitio EcoRI Etiqueta c-myc Sitio de digestión Factor Xa Región complementaria SIH2
RvHFB2	GCTCTAGATTAGAGAAGAGAACCAAGAG CAACGCAAGGAAG	Sitio XbaI Región complementaria a SIH2
FwHFB4	ATAGAATTCGAGCAGAACTCATCTCTGA AGAGGATCTGATCGAAGGTCGTATGCCTT CCTCCGAGCAGGCC	Sitio EcoRI Etiqueta c-myc Sitio de digestión Factor Xa Región complementaria a SIH4
RvHFB4	ATTCTAGATTACTCCTCGGCCTCCTCGGT CT	Sitio XbaI Región complementaria a SIH4

Los productos de PCR se clonaron en el vector de expresión heteróloga pPICZα para *Pichia pastoris*, el cual contiene un gen de selección para Zeocina, un promotor inducible por metanol, y etiquetas que facilitan la purificación posterior de las proteínas. Previamente el vector y el inserto fueron digeridos con las endonucleasas EcoRI y XbaI, ambos se ligaron usando el kit Thermo Scientific T4 DNA Ligase y se transformaron estas construcciones en células *Escherichia coli* cepa XL-1 Blue, mediante electroporación. Las células

transformadas se cultivaron en medio LB bajo en sales con Zeocina a 25 µg/ml como antibiótico de selección. Se tamizaron las colonias obtenidas mediante PCR de colonia para determinar la presencia del inserto. Brevemente, se tomaron células de cada colonia, se resuspendieron en 5 µl de agua, incubándose por 30 minutos a 95°C para liberar el ADN. Para la reacción de PCR se utilizaron los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1 que hibridan sobre regiones externas del sitio múltiple de clonaje (MCS) del vector pPICZα, incluyendo la etiqueta myc y los seis codones de histidina. Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se purificó el plásmido de las colonias que resultaron positivas a la presencia del inserto. Para ello se tomó una muestra de la colonia y se inocularon 5 ml de LB bajo en sales con Zeocina a 25 µg/ml toda la noche, en agitación y a 37°C. La purificación fue según el protocolo para la purificación de plásmidos del kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific). Se cuantificó la concentración de plásmido y se corroboró la presencia del inserto mediante una reacción de PCR similar a la realizada con el ADN de las colonias.

#### 6.2.3- Transformación de *Pichia pastoris*

Se siguieron las instrucciones del kit de transformación de *P. pastoris* de Invitrogen. De forma breve, las células electrocompetentes de *P. pastoris* (cepa KM71H) se crecieron toda la noche en medio YPD sin antibiótico. Cuando el cultivo llegó a la fase de crecimiento exponencial ( $DO_{600} = 1.3-1.5$ ) se procedió a los pasos de centrifugación para la obtención de las células. Las células se centrifugaron cuatro veces por 5 minutos a 1500 g, y se resuspendieron en 100 mL, 50 mL, 20 mL y 1 mL de sorbitol 1M, respectivamente. Las células electrocompetentes se pueden almacenar a -80°C durante varios meses sin una pérdida considerable en la eficiencia de transformación.

Para la transformación los plásmidos se linealizaron mediante digestión con la endonucleasa ScaI y se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1% utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (ThermoFisher Scientific). Se mezclaron 80 µL de células con 7.424 µg del plásmido pPICZ::SIH4 linealizado y se incubaron en hielo por 5 minutos, posteriormente se les dio un pulso de 2000 V. Inmediatamente se adicionó 1 mL de sorbitol 1M a la cubeta y todo el volumen se transfirió a un tubo estéril de 15 mL y se puso a 30°C, por 2 horas sin agitación. Una vez recuperadas las células se esparcieron volúmenes de 10, 25, 50, 100 y 200 µL en placas de YPDS con Zeocina a 100 µg/mL. Las placas se incubaron por 3 días a 30°C. Se comprobó la presencia del plásmido mediante PCR de colonia usando los oligonucleótidos 5'AOX1 y 3'AOX1.

### **6.3- Análisis de la influencia de la salinidad en el crecimiento de las colonias de *A. sydowii* en medio sólido y líquido.**

Se partió de una colonia de *A. sydowii* crecida en PDA (se hizo un raspado para obtener las esporas y se prepararon cuatro diluciones en glicerol al 0.05% (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000)), de las cuales se tomaron 50 uL y se esparcieron en placas de PDA. A las 24 horas de crecimiento a 28°C se tomaron colonias independientes de la última dilución para hacer un cultivo monospórico en placas de PDA. A partir de una colonia monospórica se tomaron 3 *plugs* con un diámetro de 0.6 cm para inocular en 100 mL de medio mínimo suplementado con glucosa al 2%, y después de 72 horas de crecimiento se tomaron las germínulas y se pusieron de forma individual en placas de medio mínimo suplementado con glucosa al 2%, con 0.5 M y 1.0 M de NaCl, ya que es el rango de crecimiento óptimo. A partir de una colonia crecida a 0.5 M de NaCl se diluyeron las esporas en agua destilada estéril y se contaron en la cámara de Neubauer para calcular un volumen de inoculación de  $1 \times 10^6$  esporas en matraces con 50 mL de medio mínimo suplementado con glucosa al 2%, como única fuente de carbono, y a distintas concentraciones (sin sal, 0.5 M, 2.0 M y 4.0 M). El cultivo se mantuvo en agitación (150 rpm) a 28°C, y se midió el tamaño de las agrupaciones celulares (*pellets*) al 3<sup>er</sup>, 5<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> día de crecimiento. En el caso de 4 M se realizó una única medición al día 24 debido a la baja tasa de crecimiento. Se pusieron tres réplicas para cada condición por día, y de cada réplica se midieron 30 agrupaciones celulares (n=90). En cada día de medición se sacrificaron los matraces, es decir se desecharon una vez que se hizo la medición. El tamaño de los *pellets* se midió con el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>), los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron en el programa GraphPad (<https://www.graphpad.com/scientificsoftware/prism/>). Se comprobó la normalidad de los datos mediante los test Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Los datos presentaron una distribución normal por lo que se realizó el test paramétrico Two-way ANOVA (p<0.05), las diferencias significativas entre los tratamientos se determinaron mediante el test de comparación múltiple Tukey (*post hoc*). Estas diferencias están reportadas con un intervalo de confianza de 95%.

También se sembraron placas de medio mínimo suplementadas con glucosa al 2% con diferente salinidad (sin sal, 0.5 M, 2.0 M y 4.0 M de NaCl), a partir de las germínulas anteriormente mencionadas, a 28°C. Se midió el diámetro de la colonia al 3<sup>er</sup>, 5<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> día de crecimiento. Se usaron siete réplicas en cada condición y el diámetro se promedió a partir de mediciones en varias direcciones del crecimiento de la colonia.

#### **6.4- Generación de las construcciones mediante el sistema CRISPR/Cas9 de los genes de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *Aspergillus sydowii*.**

Nodvig y colaboradores en el 2015 realizaron la adaptación de sistemas CRISPR-Cas9 para su uso en hongos filamentosos para la introducción de mutaciones específicas (Nødvig et al., 2015). Este sistema consiste en dos componentes, la nucleasa Cas9 y el RNA guía (sgRNA, single chimeric guide RNA). La orientación precisa en la secuencia de DNA de la nucleasa Cas9, guiada por el sgRNA, se logra mediante la secuencia del protoespaciador que forma parte del sgRNA. El protoespaciador es un fragmento de 20 nucleótidos, del RNA guía, que reconoce una región específica en el DNA mediante apareamiento de bases. El RNA guía se obtiene como producto de fusión de dos ribozimas que se autoescinden una vez que se ha transcrito el RNA para generar el sgRNA maduro. Conociendo la secuencia del gen se diseñaron los oligonucleótidos, mediante el programa E-CRISP ([www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html](http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html)), para generar el RNA guía con el protoespaciador específico para el gen de interés. Se usaron los vectores comerciales pFC332 y pFC334. El pFC332 se usó como vector de clonación. Este contiene la secuencia que codifica para la enzima Cas9, los elementos para la replicación tanto en bacteria como en hongos, un gen de resistencia a Higromicina B y otro gen de resistencia a Ampicilina, para la selección. El RNA guía se generó a partir del pFC334 usando oligonucleótidos específicos por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se necesitan dos juegos de oligonucleótidos, un par para amplificar la región del RNA guía que contiene al protoespaciador y el otro par para amplificar un fragmento que complementa con una parte del protoespaciador y es necesario para el correcto autocorte por las ribozimas. En la figura 10 se muestra el mecanismo general desarrollado por Nødvig y colaboradores en 2015 para la construcción de los vectores para mutagénesis dirigida en hongos filamentosos. Los fragmentos se purificaron en gel siguiendo el protocolo de Thermo Scientific GeneJetGel Extraction Kit #K0692 y se cuantificaron.

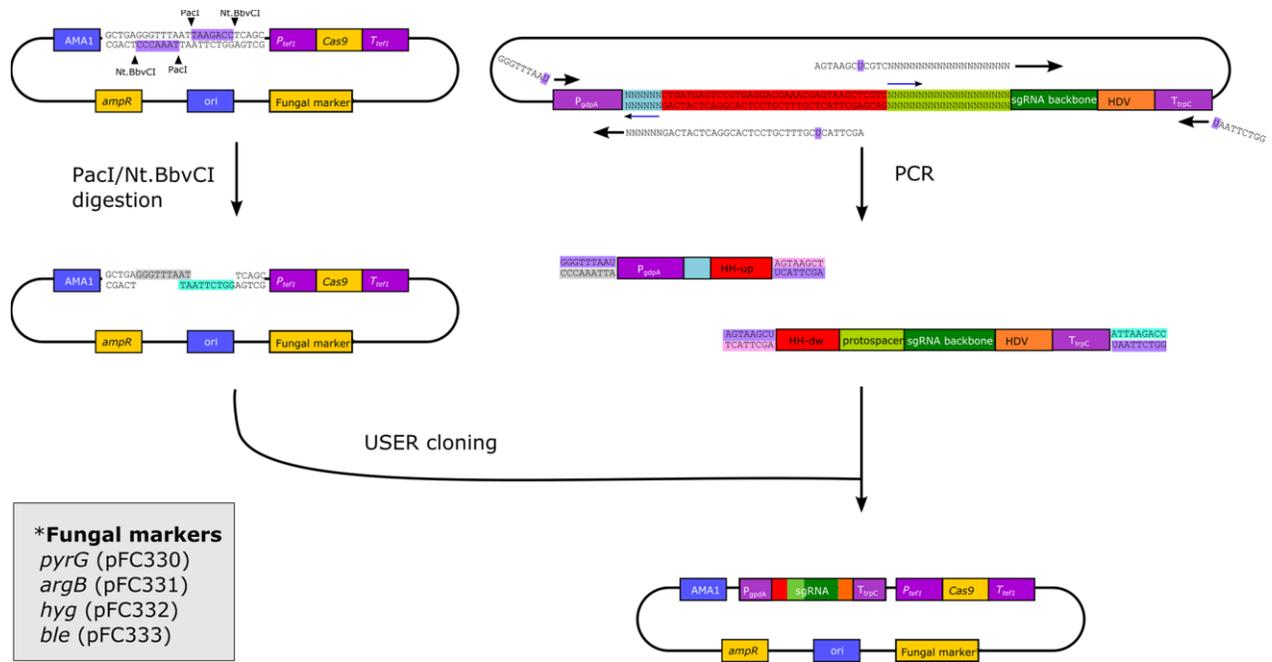


Figura 10: Construcción de los vectores para mutagénesis dirigida en hongos filamentosos mediante el sistema CRISP/Cas9. Del lado izquierdo se muestran los sitios de corte en el vector donde se insertará el RNA guía. Del lado derecho, en verde oscuro se representa el fragmento del RNA guía, en verde claro la secuencia de 20 nucleótidos que pertenece al protoespaciador y en azul claro la secuencia de seis nucleótidos que complementan con el protoespaciador. Ambas secuencias se obtienen a partir del vector pFC334, mediante PCR con oligonucleótidos específicos para cada gen. En el cuadro de la izquierda se muestran los genes de selección correspondiente a cada vector de expresión (Nødvig et al., 2015).

Posteriormente se digirió el plásmido pFC332 con la enzima Bgl II, durante 3 horas a 37°C, según el protocolo de Thermo Scientific Bgl II # ER0081. El vector linealizado se purificó en gel siguiendo el protocolo de Thermo Scientific GeneJetGel Extraction Kit #K0692, se cuantificó y se recombinaron los fragmentos (protoespaciador y secuencia que complementa con el protoespaciador) con el pFC332, usando el sistema NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix E2621S. Después, se hizo la transformación mediante electroporación de las células de *E. coli* XL-1 Blue y se esparcieron en placas de LB con Ampicilina a 60ug/L, a 37°C, por 24 horas. Las colonias que se seleccionaron, se comprobaron por tamizado de colonias mediante PCR de colonia usando los oligonucleótidos 5' sgRNA y 3' sgRNA que hibridan con las regiones que flanquean al inserto, en este caso el RNA guía, y se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

## 7- Resultados y Discusión

El estudio de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii* se intentó realizar en tres niveles: *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. En muchas ocasiones es necesario partir de los análisis *in silico* para obtener la mayor información respecto a la conformación, distribución de cargas y sitios potenciales de interacción con otras moléculas de las proteínas de interés, con el propósito de orientar los estudios *in vitro* y facilitar la comprensión de su rol *in vivo*.

### 7.1- Modelado de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii*.

Los modelos de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 se generaron a partir de los plantados propuestos por la base de datos SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). En todos los casos los plantados sugeridos fueron estructuras de hidrofobinas de clase I, resueltas por RMN y pertenecientes a hongos del género *Aspergillus*. Para SIH1 el plantado seleccionado fue RodA de *A. fumigatus* (Valsecchi et al., 2019), y este modelo tuvo un valor de GMQE de 0.48, con una cobertura de secuencia de 0.91 y 27.35% de identidad. Para SIH2 también se seleccionó RodA, en este caso presentó 0.74 de GMQE, 0.98 de cobertura de secuencia y 66.92% de identidad. Sin embargo, para SIH4 se seleccionó DewA de *Aspergillus nidulans* (Morris et al., 2013), con 0.43 de GMQE, 0.82 de cobertura de secuencia y 25.26% de identidad de secuencia. En los tres casos se refinaron los modelos obtenidos en SWISS-MODEL mediante una breve minimización de energía con el programa CHARMM45 después de preparar las estructuras (adición de átomos de hidrógeno y formación de puentes disulfuro) con CHARMM-GUI (<http://charmm-gui.org/>). Después de mejorar los parámetros de calidad de los modelos, se utilizó el programa APBS (<http://server.poissonboltzmann.org/>) para analizar las propiedades electrostáticas de las proteínas. Con el programa propka (<https://anaconda.org/insilichem/propka>) se obtuvo el pKa local de cada uno de los residuos potencialmente ionizables y se generó el archivo pqr en el que se asignó la carga y el radio a cada uno de los átomos de la proteína, para poder calcular el potencial electrostático. Los análisis arrojaron que a pH 6 SIH1, SIH2 y SIH4 tienen un punto isoeléctrico de 2.97, 3.11 y 4.14, respectivamente. Llama la atención en SIH4 una histidina con pK de 20, a pesar de estar expuesta en la superficie y tener cerca un aspartato y una serina. Este comportamiento anómalo debe ser examinado con más detalle como una perspectiva del proyecto. En los tres casos las cisteínas tienen un pK de 99, lo que significa que están formando puentes disulfuros entre ellas. La figura 11 y la 12 muestran la superficie de las hidrofobinas visualizadas en VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) a partir de los archivos pqr y pot obtenidos en

APBS (<http://server.poissonboltzmann.org/>). En la figura 11 está resaltado en rojo el potencial electrostático negativo y en azul el positivo. Esta representación es similar a la superficie de Van der Waals generada por el programa APBS, que simula las interacciones de Van der Waals de la superficie de las proteínas con una molécula de agua. En la figura 12 se observan los residuos con cargas negativas y positivas en rojo y azul, respectivamente, además en verde los residuos polares y en blanco los apolares.

Como era de esperar se observan diferencias entre las estructuras de las tres hidrofobinas. En el caso de SIH1 y SIH2, los modelos muestran una alta exposición de cargas negativas en la superficie de las proteínas, las cuales están distribuidas hacia un lado de estas, mientras que en el otro predominan las cargas neutras y positivas. Sin embargo, SIH4 tiene una distribución de cargas negativas distribuidas en toda la molécula. De acuerdo al valor del punto isoeléctrico (pI), las tres hidrofobinas son altamente ácidas, pero a nivel de la estructura primaria no tienen mayor proporción de residuos ácidos (Pérez-Llano et al., 2020) como sus ortólogos en *W. ichthyophaga* y *W. sebi* (Zajc et al., 2013). Una de las hipótesis propuesta para explicar la presencia de proteínas ácidas en la superficie de la pared celular, es que podrían interactuar con los iones salinos, evitando su entrada a la célula y los posibles daños que estos podrían causar (Plemenitaš et al., 2014).

Muchos estudios sugieren que la haloadaptación se correlaciona con un aumento de aminoácidos ácidos en la composición proteica (Fukuchi et al., 2003). Por ejemplo, en las archaeas halófilas se ha observado la presencia de proteínas con mayor proporción de aminoácidos ácidos como un mecanismo de halofilia (Madern et al., 2000). También, en el transcriptoma del halófilo *Eurotium rubrum* se observó que algunos transcritos codifican para proteínas con mayor proporción de aminoácidos ácidos (Kis-Papo et al., 2014).

La exposición de residuos cargados negativamente en las superficies proteicas es una de las características más destacadas de los organismos halófilos (Paul et al., 2008). Estos residuos de aminoácidos cargados negativamente pueden formar una red de iones de sal hidratados que contribuye cooperativamente a la estabilidad de la proteína. Este mecanismo fue propuesto para el tetrámero de la malato deshidrogenasa (MalDH) de *Haloarcula marismortui*, la estructura de la proteína reveló una superficie ácida, así como redes de hidratación pertenecientes a los iones de sal hidratados que se unen a la proteína (Fukuchi et al., 2003). Precisamente, la capacidad de las proteínas halófilas para unir sales depende en gran medida del número de aminoácidos ácidos en la superficie proteica (Siglioccolo et al., 2011).

Esto nos hace pensar que las hidrofobinas de *A. sydowii*, particularmente las que se expresan a 2M de NaCl podrían estar uniendo cationes  $\text{Na}^+$  como posible mecanismo de halofilia.

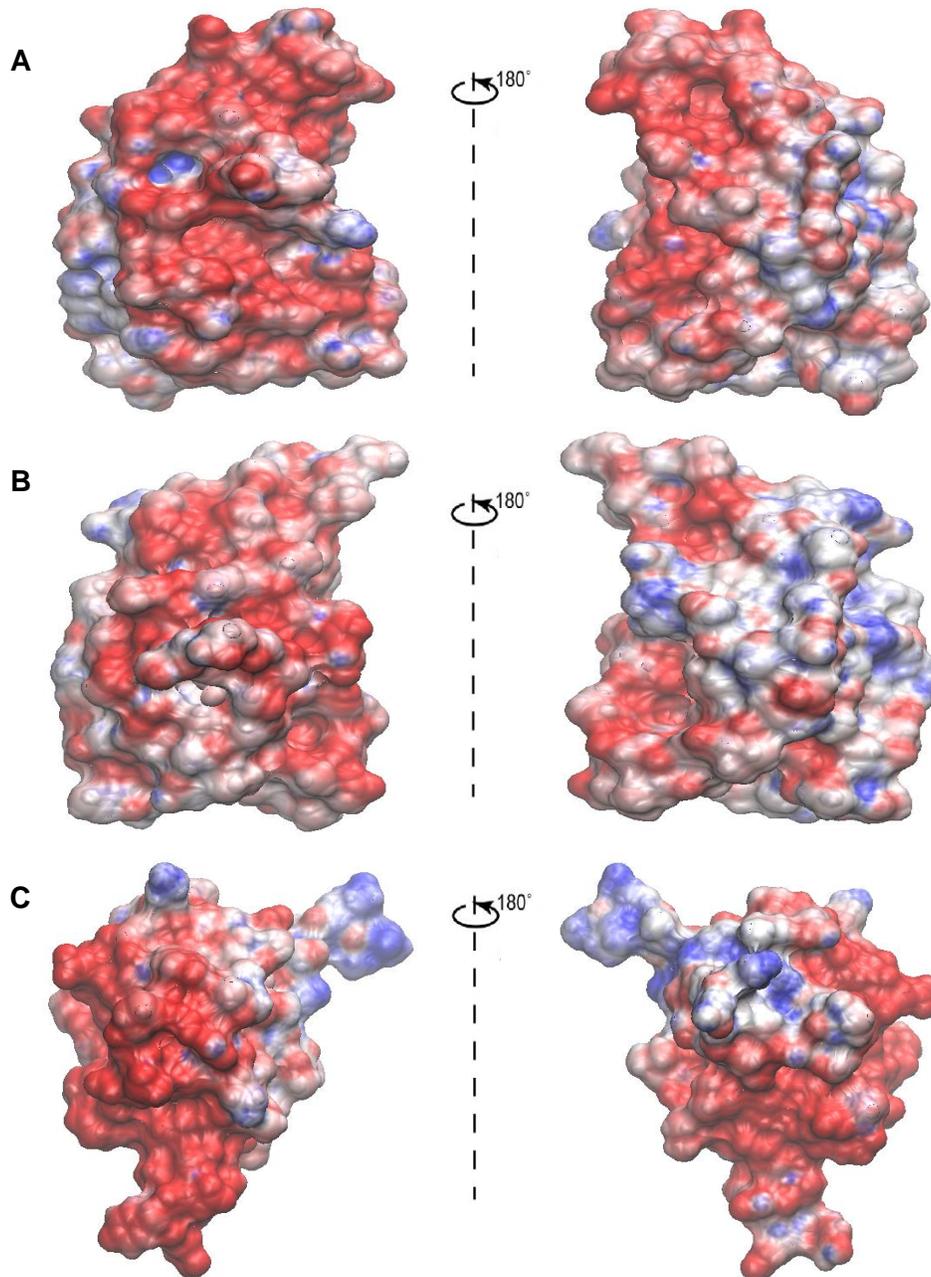


Figura 11: Modelos tridimensionales generados con el programa VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) de las hidrofobinas SIH1 (A), SIH2 (B) y SIH4 (C) de *A. sydowii*. En color rojo se representan el potencial electrostático negativo, en azul el positivo y en blanco el neutro.

En la figura 12 se muestran en color blanco los residuos hidrofóbicos, estos aparecen formando parches en la superficie de las tres hidrofobinas, predominando en la cara opuesta a la de cargas negativas. Estos parches hidrofóbicos quizás están involucrados en la formación de estructuras cuaternarias como dímeros y tetrámeros en solución. Por ejemplo, las hidrofobinas HFB I y HFB II en solución se encuentran formando dímeros, donde el parche hidrofóbico queda parcialmente oculto en la interface del dímery, y con la menor exposición al solvente (Hakanpaa, 2006). Ocultar una parte del parche hidrofóbico mediante la formación de dímeros o tetrámeros es energéticamente más favorable que dejarlo totalmente expuesto al solvente (Hakanpaa, 2006).

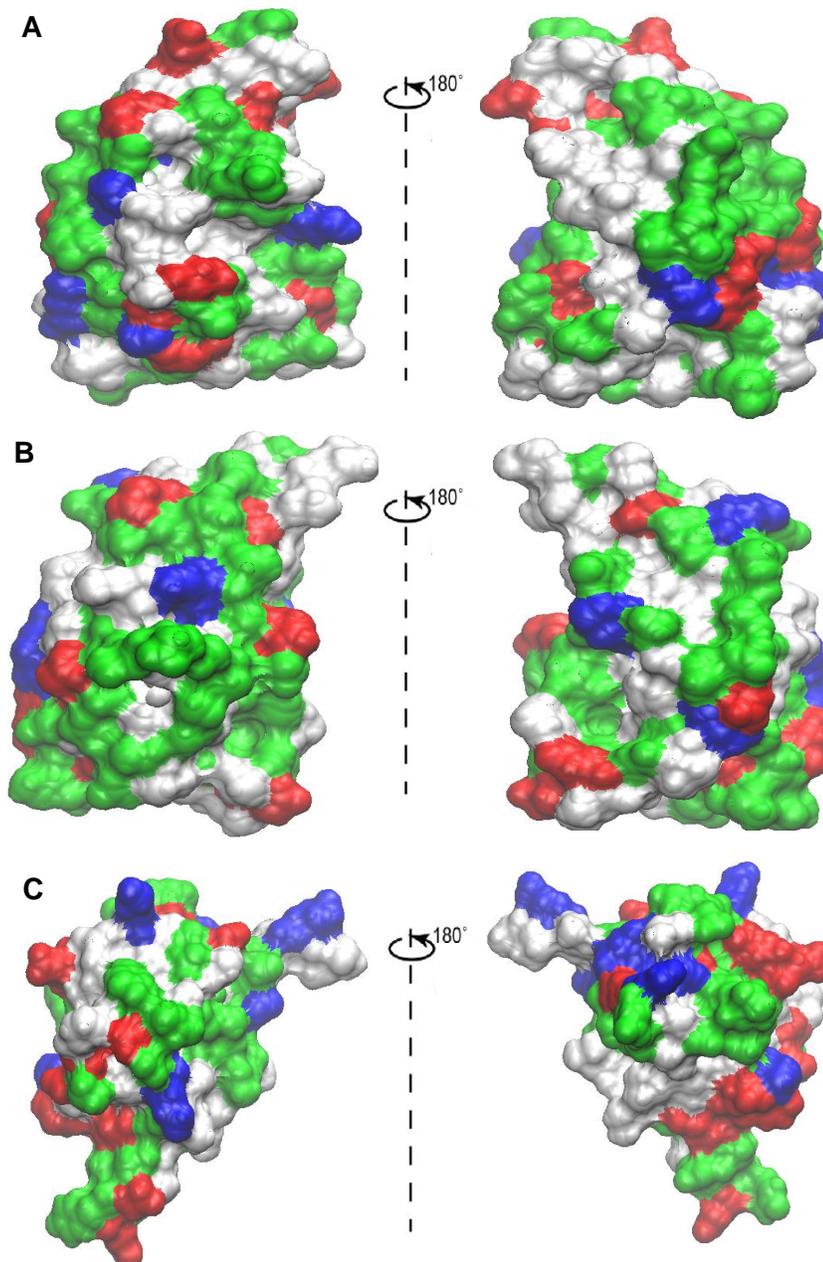


Figura 12: Representación de la distribución de cargas e hidrofobicidad de las hidrofobinas SIH1 **(A)**, SIH2 **(B)** y SIH4 **(C)** de *A. sydowii*, generada mediante el programa VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). En color rojo los residuos de aminoácidos con carga negativa, en azul los residuos con carga positiva, en verde los residuos polares y en blanco los residuos apolares.

En el estudio realizado por Hähl y colaboradores en el 2019, donde se analizó la influencia de la fuerza iónica en el ensamblaje de hidrofobinas, también se observó el papel de los residuos alrededor del parche hidrofóbico. Se comparó el autoensamble interfacial de las hidrofobinas HFB I y HFB II de *T. reesei* respecto a las mutantes: HFBI-dCBM (dos dominios de celulosa), HFBI-D30N-K32Q, y FpHYD5 (hidrofobina glicosilada derivada de *Fusarium graminearum*), las cuales fueron producidas usando una cepa recombinante de *T. reesei*. HFBI-D30N-K32Q es una variante de HFBI, pero dos residuos de aminoácidos cargados (Asp30 y Lys32) cerca del parche hidrófobo fueron sustituidos por asparagina y glutamina, respectivamente. La cinética de las proteínas HFB I y HFB II presentó una tasa de absorción constante en el tiempo hasta que se alcanzó la saturación de la interfaz. Al llegar al valor de saturación, la tasa de adsorción bajó rápidamente a cero y permaneció sin cambios, pero con 0.1  $\mu\text{M}$  no se alcanzó el valor de saturación durante el período de las medidas. Por otra parte, las cinéticas de adsorción de las proteínas modificadas, FpHYD5 y HFBI-dCBM, también mostraron valores de saturación constantes para las concentraciones de proteínas  $\leq 1 \mu\text{M}$ . Solamente para experimentos con una concentración proteica de 5  $\mu\text{M}$  se registraron valores de saturación. Sin embargo, la cinética de HFBI-dCBM no exhibió una tasa de adsorción constante con una parada abrupta. En el caso de HFBI-D30N-K32Q la saturación se alcanzó en menor tiempo que con HFB I y HFB II, en todas las concentraciones estudiadas, esto podría ser por el intercambio de los residuos aminoacídicos. Según lo observado, los autores concluyeron que el mecanismo de adsorción depende de las interacciones electrostáticas entre las proteínas, si estas son repulsivas pueden desacelerar el ensamblaje en la interfase. Particularmente los residuos que colindan a los parches hidrofóbicos tienen un papel crucial en el ensamblaje, aunque todavía no está totalmente detallado claro el mecanismo de ensamblaje (Hähl et al., 2019). En otro estudio se examinó el efecto de la sal en la estabilidad de proteínas mesófilas, termófilas e hipertermófilas de *Bacillus subtilis*, *B. caldolyticus* y *Thermotoga marítima*, respectivamente. Los resultados fueron que en presencia de sal la proteína mesófila se estabiliza, mientras que la termófila y la hipertermófila se desestabilizan. Estos autores

proponen que la sal aumenta la tensión superficial en el medio acuoso, lo cual incrementa las fuerzas hidrofóbicas en el núcleo de la proteína y por tanto aumenta su estabilidad (Dominy et al., 2002). Esto puede explicar el comportamiento de las proteínas de hongos halófilos, particularmente las hidrofobinas que son estables en altas concentraciones de sal. Por otra parte, las diferencias observadas entre las hidrofobinas de *A. sydowii* podrían explicar su expresión diferencial que se observó anteriormente. Después de estos análisis, sería interesante estudiar el comportamiento de hidrofobinas provenientes de organismos halófilos, incluso entre las de un mismo organismo pero que se expresan en distintas condiciones de salinidad.

## **7.2- Generación de las construcciones pPICZ::SIH1, pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 para la expresión en el sistema heterólogo *Pichia pastoris*, para su posterior estudio biofísico.**

Un primer acercamiento para comprender el posible papel fisiológico de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii* es el estudio *in vitro* de algunas de sus características estructurales. Por lo tanto, es necesario clonarlas en el sistema de expresión heterólogo *P. pastoris* para expresarlas y purificarlas para posteriormente realizar estudios biofísicos que permitan determinar la influencia de la sal en su estructura secundaria, su oligomerización y en la hidrofobicidad/hidrofilicidad de las películas que forman.

Las construcciones de los ORFs de las hidrofobinas se habían realizado con anterioridad, en el vector de expresión pPICZa. A continuación, se describen los avances en la verificación de las construcciones de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4. Las cepas de *P. pastoris* con las construcciones se mantenían en glicerol guardadas a -70°C (ver figura 13). Para recuperar a las células, se tomó una muestra a partir de los gliceroles y se sembraron en placas de YPD con Zeocina a 100 ug/mL. Las colonias que crecieron con la construcción pPICZ::SIH4 tenían características bacterianas, lo que indicaba que el tubo del que partimos tenía células de *E. coli* y no de *P. pastoris*. Por otro lado, las células en la placa con pPICZ::SIH2, crecieron como levadura. Para corroborar las construcciones, a partir de las clonas obtenidas de los gliceroles con las construcciones de pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 en *E. coli*, se realizó la purificación de los plásmidos con las construcciones y el pPICZ vacío. Para verificar que contenían los insertos, las construcciones se digirieron con las enzimas EcoRI y XbaI.

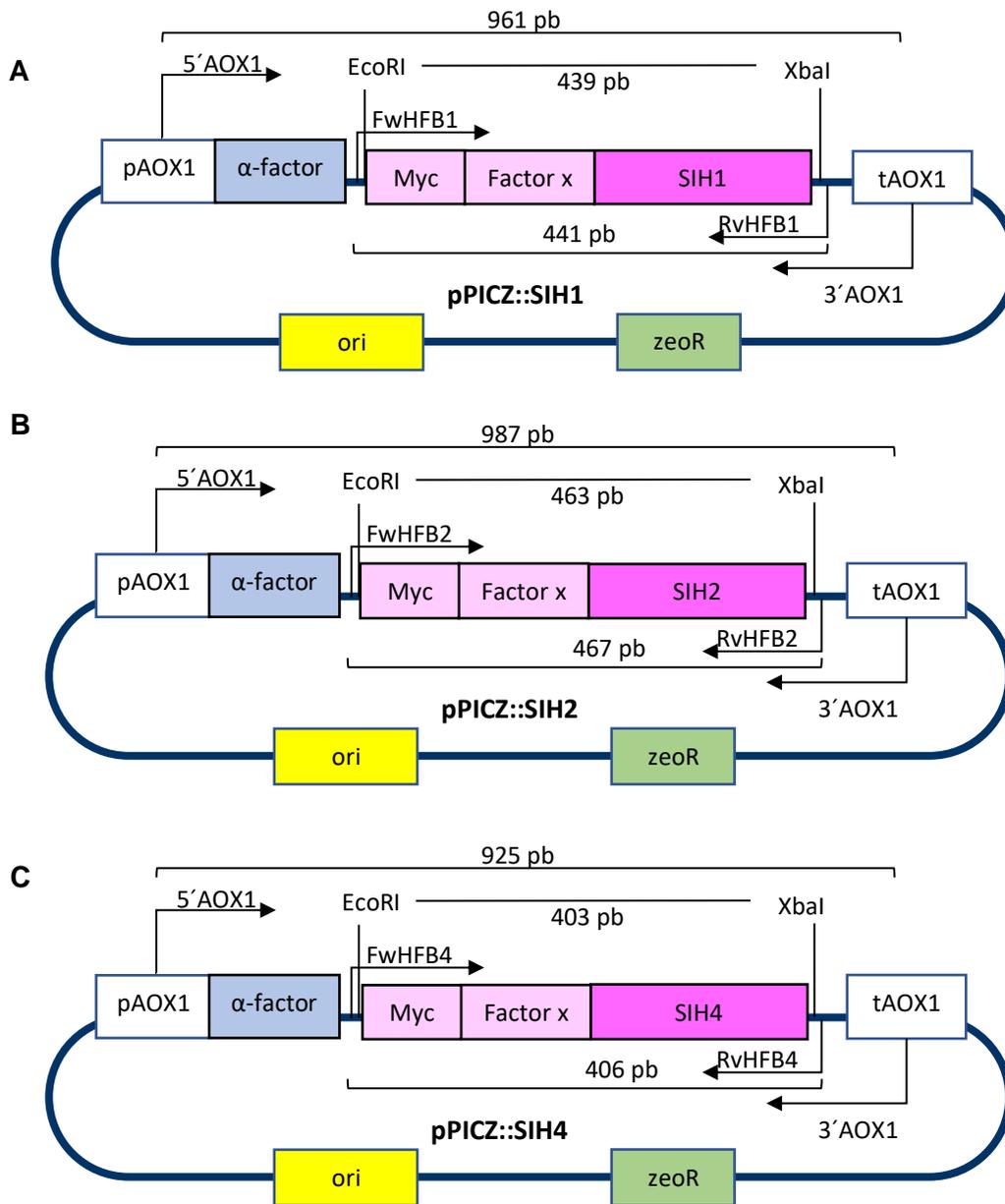


Figura 13: Representación esquemática de las construcciones de los vectores de expresión en *P. pastoris* para las hidrofobinas. **(A)** pPICZ::SIH1, **(B)** pPICZ::SIH2 y **(C)** pPICZ::SIH4.

En la figura 14 **(A)** se muestra la digestión de las construcciones pPICZ::SIH2 y del pPICZ vacío. La banda que aparece en el primer carril a la altura de 3600 pb pertenece al pPICZ vacío linealizado que tiene un tamaño de 3593 pb, el segundo carril muestra el vector sin digerir. En el tercer carril está pPICZ::SIH2 digerido, se observa una banda aproximadamente a la misma altura que la del vector vacío digerido (3528 pb) y otra cercana

a los 500 pb, esta última tiene un tamaño de 463 pb y contiene al fragmento de la hidrofobina. Este resultado muestra que la construcción contiene al vector pPICZ y al inserto de SIH2.

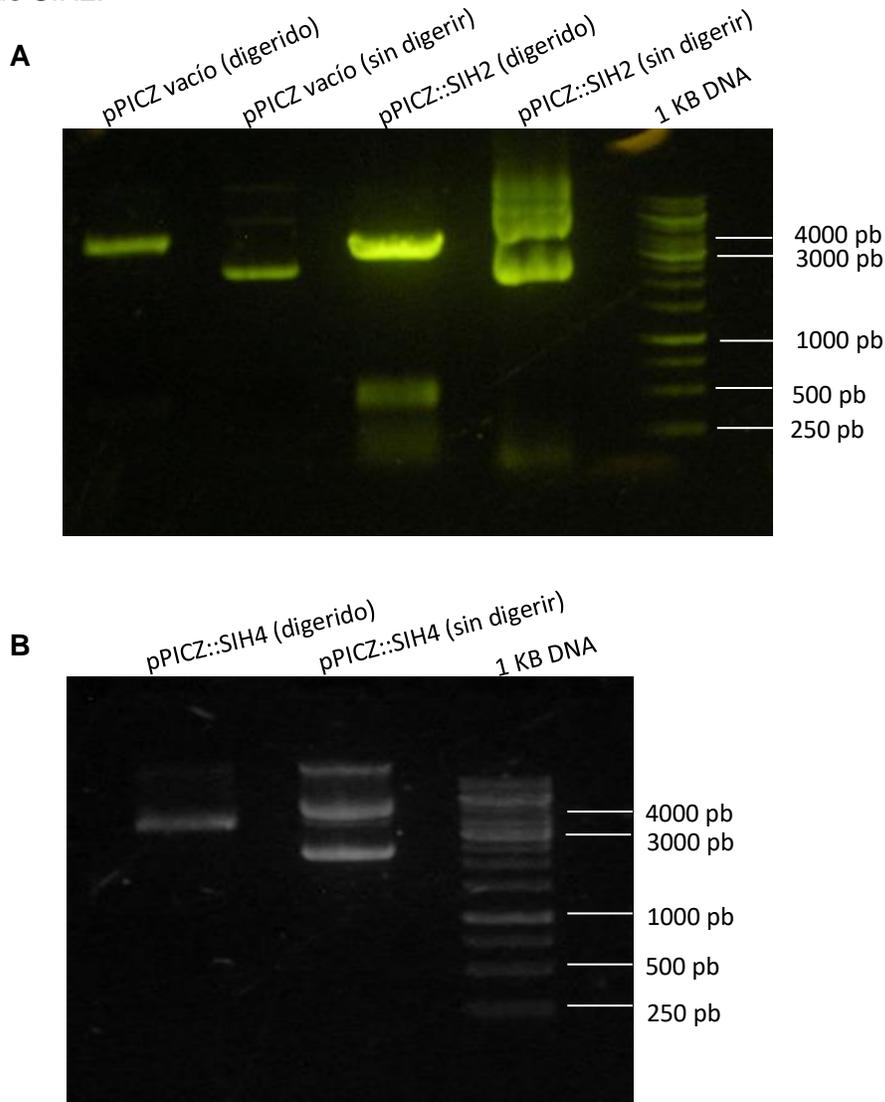


Figura 14: Patrón de digestión de las construcciones pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI. **(A)** pPICZ::SIH2, los fragmentos esperados tienen un tamaño de: 463 pb el inserto y 3528 pb el vector. **(B)** pPICZ::SIH4, los fragmentos esperados tienen un tamaño de: 403 pb el inserto y 3526 pb el vector.

La figura 14 **(B)** muestra el patrón de digestión obtenido para pPICZ::SIH4. En la digestión de pPICZ::SIH4 debía aparecer una banda a la altura de 403 pb y otra a 3526 pb, sin embargo solo está una banda cercana a 3600 pb. Esto indica que el vector no tiene el inserto de SIH4, es decir es el vector vacío con un tamaño de 3593 pb.

Con este resultado negativo, se buscaron preparaciones de plásmido purificado que teóricamente era de la construcción pPICZ::SIH4 para volver a transformar en *E. coli* cepa XL-B y tener cantidad suficiente de ADN para posteriormente transformar en *P. pastoris*. Se verificó la integridad del ADN mediante un gel de agarosa y se cuantificó. Se seleccionó la purificación con la mayor concentración (164 ng/uL), esta se digirió con EcoRI y XbaI y se obtuvo el patrón de digestión esperado, además se amplificó con los oligonucleótidos específicos para SIH4 y se obtuvo el fragmento esperado. Una vez verificado, la construcción fue utilizada para transformar células competentes. Las colonias obtenidas se comprobaron por PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos AOX1, que flanquean la región del inserto. Finalmente se secuenciaron nuevamente las construcciones pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 con el oligonucleótido AOX1 5'. El resultado de este análisis mostró que ambas construcciones tienen los insertos adecuados. Entonces, el plásmido pPICZ::SIH2 fue ya incorporado por la levadura, listo para ser inducido y producir la hidrofobina. Por otro lado, ya se cuenta con la clona de *E. coli* que tiene al pPICZ::SIH4 pero aún se requiere digerir a este para después transformar a *P. pastoris*, y posteriormente expresar la hidrofobina.

En el caso de la hidrofobina SIH1, los primeros oligonucleótidos que se diseñaron ponían un codón de paro erróneamente en la mitad de la secuencia, por lo que fue necesario corregirlos y sintetizar nuevos oligonucleótidos. La SIH1 se amplificó con oligonucleótidos específicos a partir del cDNA y se clonó en el vector pJet usando el kit comercial CloneJET PCR Cloning Kit de Thermo Fisher Scientific, se transformaron células competentes y se comprobó la presencia de la construcción mediante PCR de colonia usando oligonucleótidos del kit que amplifican a partir de regiones que colindan al inserto. También se comprobó la inserción del fragmento con los oligonucleótidos específicos para esta hidrofobina, amplificando solamente una colonia como se muestra en la figura 15, la banda obtenida en el segundo carril cercana a los 500 pb es del inserto SIH1, la cual tiene un tamaño de 441 pb. La colonia que fue verificada por PCR fue cultivada para realizar una purificación del plásmido pJet::SIH1 mediante el kit de purificación y se obtuvo una preparación con 3498 ng/uL. Este se digirió con EcoRI y XbaI, se purificó y se cuantificó, obteniendo 96 ng/uL del inserto. Luego se ligó con el vector pPICZ, que también fue previamente digerido con las mismas enzimas, y se transformaron células *E. coli* cepa XL-B competentes, se hizo un tamiz de las colonias obtenidas de la transformación con PCR de colonia usando los oligonucleótidos AOX1 y se obtuvo una banda entre 500 pb y 750 pb como muestra la figura 15. Esta banda tiene un tamaño de 589 pb, lo cual indica que en las

colonias seleccionadas se transformó el plásmido vacío, es decir no se transformó la construcción pPICZ::SIH1. Es posible que en algún paso se haya arrastrado al vector superenrollado, o que una de las enzimas de restricción utilizadas no haya cortado al vector y este se ligó nuevamente sin el inserto. También cabe mencionar que la ligasa utilizada estaba caduca por más de un año por lo que es posible que no esté funcionando eficientemente.

Por tanto, hasta el momento tenemos la construcción SIH2 en *P. pastoris* y la SIH4 lista para ser transformada en *P. pastoris*. Se intentará volver a clonar a la SIH1.

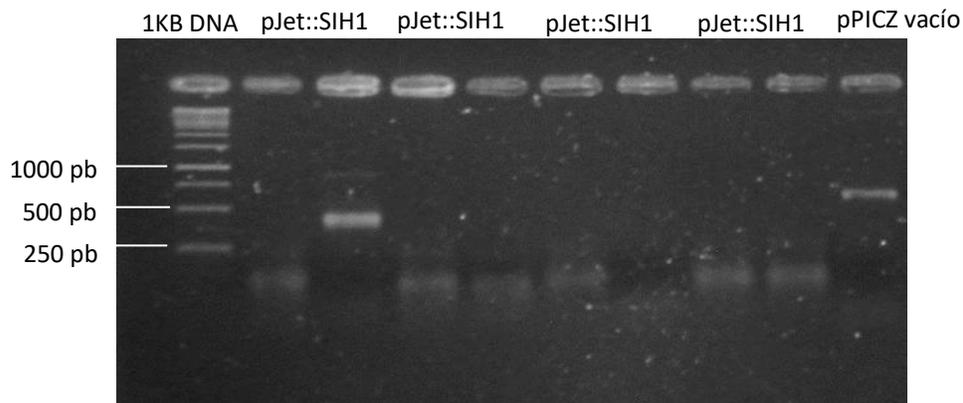


Figura 15: Tamizado de las colonias con pJet::SIH1, usando los oligonucleótidos del kit comercial pJet.

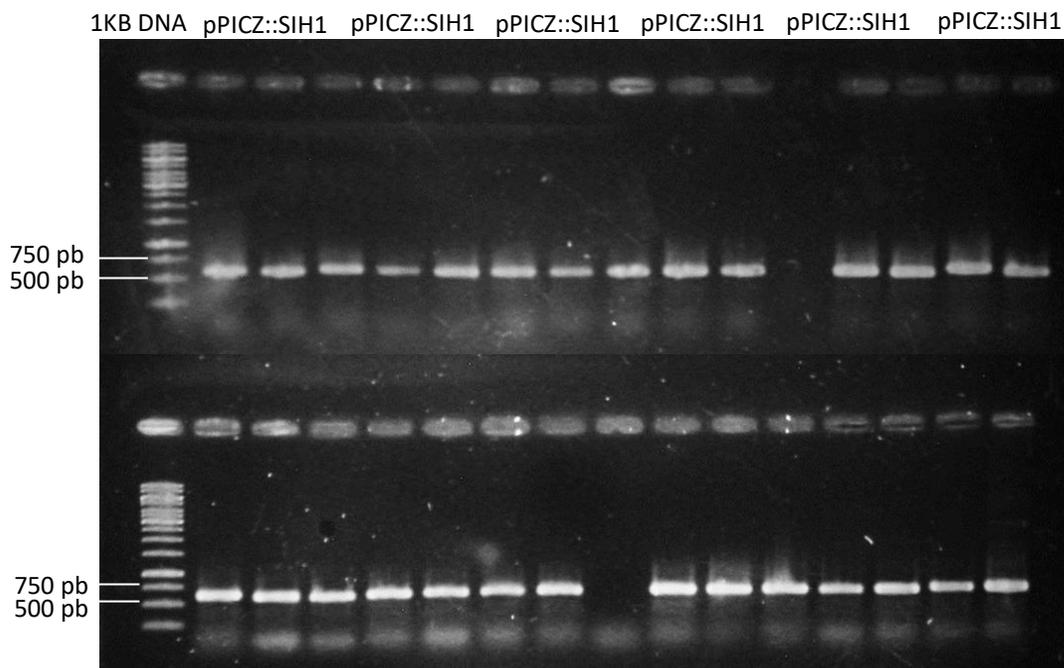


Figura 16: Tamizado de las colonias con pPICZ::SIH1 usando los oligonucleótidos AOX1, fragmento esperado de 961 pb, y se obtuvo un fragmento de 589 pb, lo que significa que no hay inserto en el vector.

Debido a que no se obtuvo adecuadamente la construcción pPICZ::SIH1 se mandó a sintetizar. Por otra parte, se intentó transformar *P. pastoris* con las construcciones pPICZ::SIH2 y pPICZ::SIH4 pero no se obtuvieron colonias transformantes (figura 17) por lo que es necesario repetir este procedimiento.

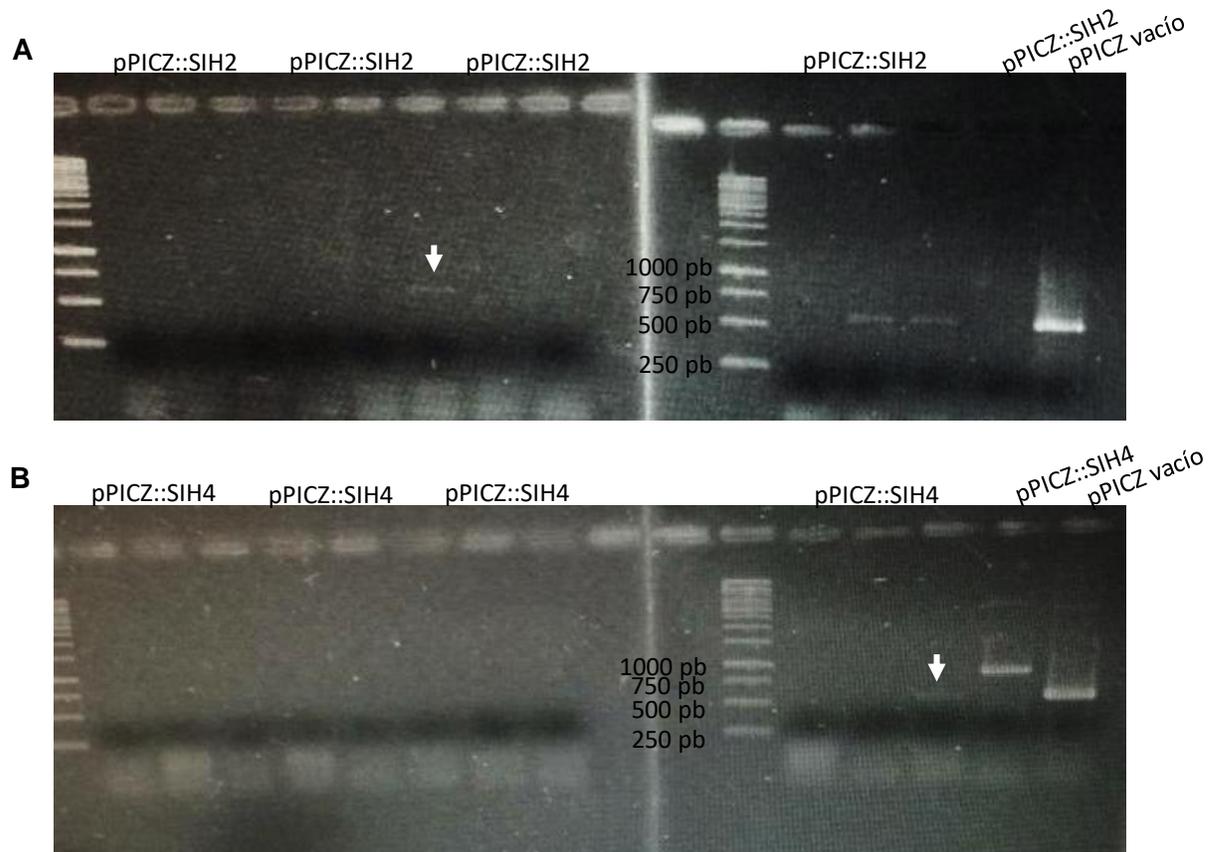


Figura 17: Tamizado de colonias de *P. pastoris* transformadas con (A) pPICZ::SIH2 y (B) pPICZ::SIH4, usando los oligonucleótidos AOX1.

El hecho de no haber obtenido colonias de células transformantes se debe a que no se integró en el genoma de *P. pastoris* el vector lineal. Es posible que la enzima *SacI* no haya cortado al vector y por tanto este no se linealizó, o quizás las células competentes no tenían la eficiencia necesaria y por tanto no se obtienen colonias. Por esto, para futuros experimentos es necesario utilizar otra enzima *SacI*, que esté fresca, y verificar la eficiencia de las células competentes antes de usarlas para transformar con las construcciones.

### 7.3- Análisis de la influencia de la salinidad en el crecimiento de las colonias de *A. sydowii* en medio sólido y líquido.

Las hidrofobinas se ubican en la superficie de la pared celular de los hongos formando monocapas que recubren a la célula, y podrían estar involucradas en la tolerancia a la sal de los hongos halófilos promoviendo la formación de racimos de células, como se ha observado en *W. ichthyophaga* en presencia de altas concentraciones de sal (Kunčič et al., 2010). Conociendo que de manera similar en *A. sydowii* hay expresión de hidrofobinas, decidimos investigar cómo *A. sydowii* cambia el tamaño de las colonias tanto en medios sólidos como líquidos en dependencia de la salinidad. La influencia de la salinidad en el crecimiento de *A. sydowii* se estudió en medio líquido y en medio sólido. Se midió el diámetro de las colonias creciendo en medio sólido (Tabla 4 y figura 18), el cual consiste de medio mínimo suplementado con glucosa al 2% como fuente de carbono y con distintas concentraciones de sal (sin sal, 0.5 M y 2 M). En la condición de 0.5 M fue donde hubo mayor crecimiento durante todo el tiempo del experimento, con un promedio a los 7 días de 2.58 cm, mientras que en 0 M y 2 M se alcanzó 2.21 cm y 1.45 cm respectivamente.

Tabla 4: Diámetro promedio de las colonias en cada día de medición. Los valores de DS corresponde a los valores de desviación estándar de las réplicas.

NaCl (M)	Día 3		Día 5		Día 7	
	Diámetro (cm)	DS	Diámetro (cm)	DS	Diámetro (cm)	DS
0	1.0	0	1.73	0.052	2.21	0.075
0.5	1.28	0.041	2.08	0.041	2.58	0.075
2	0.63	0.052	1.15	0.055	1.5	0.063

Al igual que los datos reportados del crecimiento de esta cepa por Batista y colaboradores en 2014, se obtuvo que la condición de mayor crecimiento fue 0.5 M de NaCl. Sin embargo, con carboximetilcelulosa como fuente de carbono tiene mayor crecimiento que con glucosa, ya que el diámetro de la colonia en el día 7, en el mismo medio de cultivo y con igual temperatura, mide alrededor de 4 cm (Batista et al., 2014).

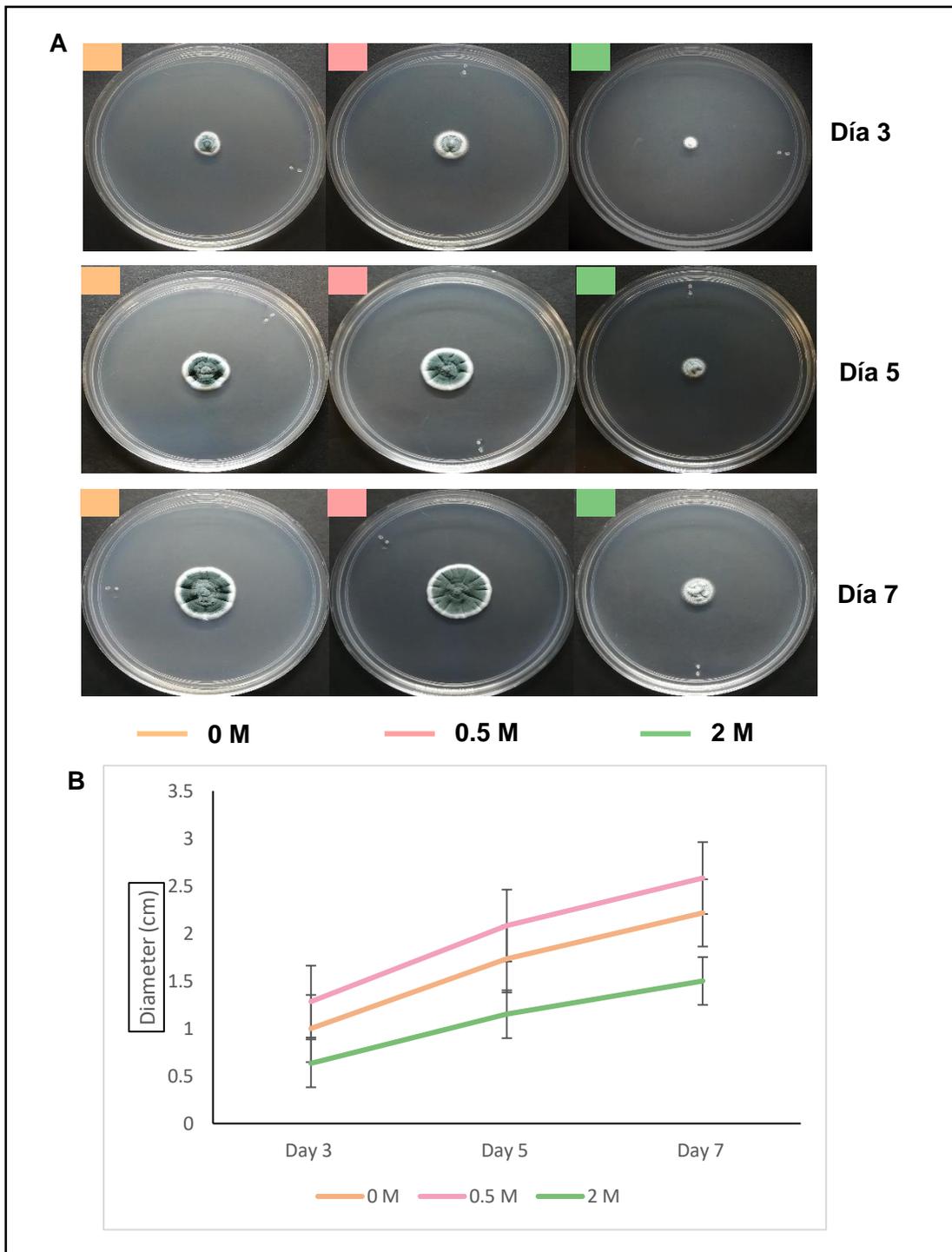


Figura 18: Influencia de la salinidad en el crecimiento de *A. sydowii* en medio mínimo suplementado con glucosa al 2%, a distintas concentraciones de NaCl (sin sal, 0.5 M y 2 M).

También se analizó la influencia de la salinidad en el crecimiento de la colonia en medio líquido, mediante la medición de los aglomerados celulares en cada condición. Al igual que en medio sólido, en medio líquido se monitoreo a los 3, 5 y 7 días para las condiciones: sin sal, 0.5 M y 2 M, pero para la condición de 4 M se midió el día 24 de crecimiento. Las mediciones del tamaño y la cantidad de agrupaciones celulares (pellets) varió dependiendo de la concentración de sal en el medio. En la condición óptima de crecimiento (0.5 M) en el día 3 hubo menor cantidad de agregados celulares, pero tenían mayor tamaño que en las otras condiciones. En cambio, en las condiciones extremas (sin sal y 2 M de NaCl) se observó más abundancia de agregados celulares, pero con menor diámetro que los de la condición óptima. A partir del día 5 se observó que en la condición de 0.5 M, las agrupaciones celulares eran de menor tamaño y más abundantes, en comparación con el día 3. Igualmente ocurrió en la condición de 2 M. Es posible que esta disminución del diámetro se deba a la desagregación de las agrupaciones multicelulares, y consecuentemente hay mayor cantidad en el medio. En la condición de 4 M de NaCl también se formaron agrupaciones celulares, pero se pudieron medir en el día 24 de crecimiento. Es evidente que esta cepa puede crecer a 4 M de NaCl en un período de tiempo mayor, ya que es una concentración de sal muy alta cercana a la concentración más extrema reportada que es 5 M de NaCl. La diferencia en la cantidad de agrupaciones celulares entre cada molaridad se muestra en la figura 19.

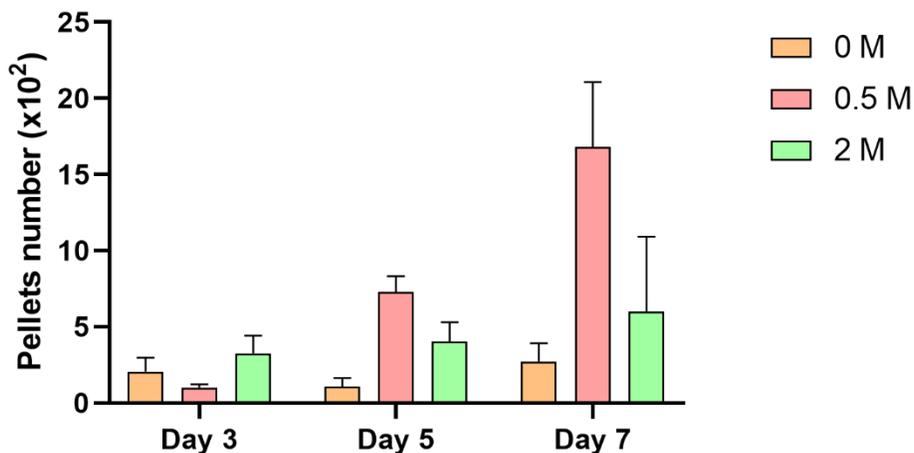


Figura 19: Cantidad promedio de agrupaciones celulares en cada concentración de NaCl, por día.

Se encontraron diferencias significativas entre las distintas condiciones de salinidad en todos los días evaluados (ANOVA  $p < 0.05$ ). Los pellets de la condición de 0.5 M tuvieron un diámetro mayor (4.09 mm) que, en las otras condiciones, en 0 M (3.19 mm) y en 2 M (1.08 mm) en el día 5. *A. sydowii* es un halófilo moderado, con crecimiento óptimo entre 0.5 M y 1 M de NaCl, por lo que es consecuente obtener el mayor crecimiento en la condición de 0.5 M. En el análisis transcriptómico realizado anteriormente mostró la expresión diferencial de las hidrofobinas SIH2 y SIH4 en la concentración de 2 M, y teniendo en cuenta que las hidrofobinas se han visto involucradas en la formación de las agrupaciones multicelulares formadas en medio líquido de hongos halófilos (Gostinčar et al., 2010), es posible que en el caso de *A. sydowii* también estén envueltas en la formación de los pellets en las concentraciones de alta salinidad.

Como se mencionó arriba las agrupaciones fueron mayores en la condición óptima (0.5 M) en los días 3 y 5, pero no en el día 7 donde se observa una disminución en el diámetro de las agrupaciones celulares, este fenómeno se observó en 0.5 M y 2 M, como se muestra en la figura 20. Es posible que esta disminución se deba a la desagregación de las agrupaciones celulares, debido a que alcanzaron un crecimiento máximo y comenzaron a separarse en racimos más pequeños. El diámetro de las agrupaciones en 4 M únicamente se midió el día 24 porque hasta este día que las agrupaciones tenían tamaño suficiente para ser medidas. A pesar de esto los pellets de 4 M son más pequeños que los de 2 M en el día 7.

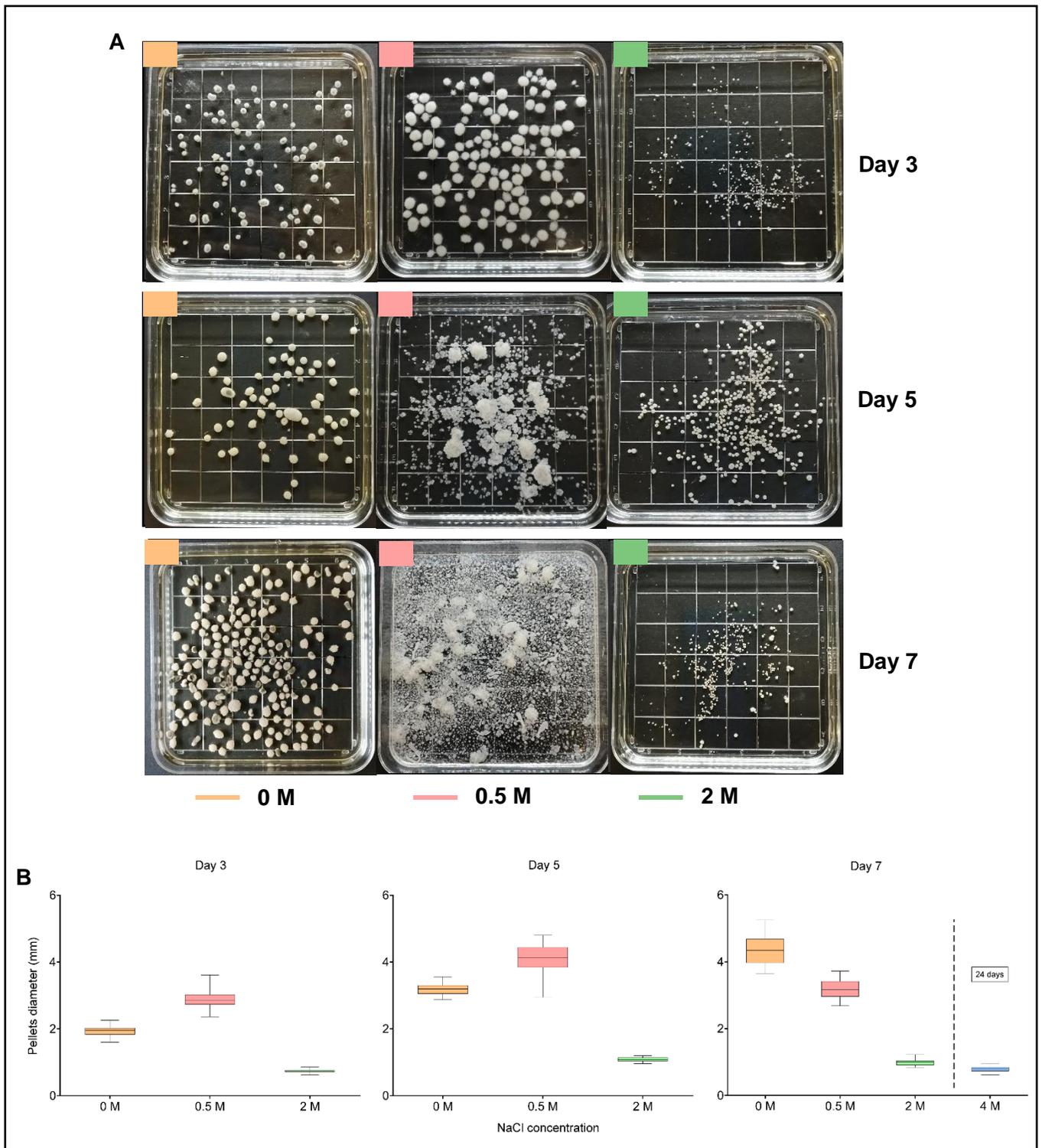


Figura 20: Influencia de la salinidad en el tamaño de las agrupaciones celulares de *A. sydowii*.

#### 7.4- Generación de las construcciones mediante el sistema CRISPR/Cas9 de los genes de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *Aspergillus sydowii*.

Para estudiar el papel biológico de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 es necesario hacer líneas mutantes para estas hidrofobinas en *A. sydowii*, y primero se deben generar las construcciones utilizando la tecnología CRISPR-Cas9. Se obtuvieron dos fragmentos para cada hidrofobina (SIH1, SIH2 y SIH4), uno que contiene el protoespaciador y otro con la secuencia que complementa con el protoespaciador, la unión de ambos da lugar al RNA guía. Estos fragmentos se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, figura 21, las bandas obtenidas corresponden a un fragmento mayor de aproximadamente 545pb que contiene la secuencia que complementa con el protoespaciador, específico para cada hidrofobina, y un fragmento menor de alrededor de 424pb que contiene la secuencia del protoespaciador de la hidrofobina. Estas secuencias son generadas con distintas combinaciones de oligonucleótidos a partir del plásmido pFC334, como se muestra en la figura 10.

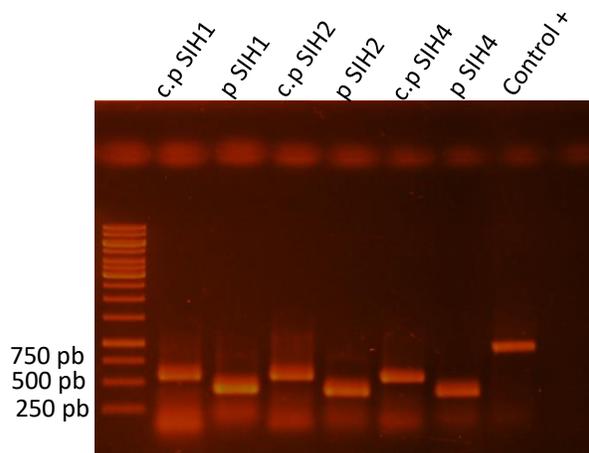


Figura 21: Secuencias para la generación de los RNA guías de cada hidrofobina, c.p- secuencia que complementa con el protoespaciador, p- secuencia del protoespaciador.

Una vez obtenido el fragmento de tamaño adecuado, este se purifica a partir del gel y se cuantifica, las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 5. El vector pFC332 abierto también se purificó y se cuantificó, obteniéndose 118.83 ng/uL. Se ensamblaron todos los fragmentos y se transformaron células XL-Blue. Se seleccionaron nueve colonias con la construcción para la SIH1, dos para SIH2 y una para SIH4, debido a que hubo más colonias para la primera construcción y menos colonias para las otras dos construcciones, las colonias seleccionadas se comprobaron mediante PCR de colonia amplificando el RNA

guía con los oligonucleótidos 3´RNA guía y 5´RNA que flanquean la región del inserto (figura 22).

Tabla 5: Cuantificación de las secuencias que complementan con el protoespaciador y del protoespaciador, para cada hidrofobina.

	Complemento del protoespaciador	Protoespaciador
SIH1	55.76 ng/uL	95.81 ng/uL
SIH2	58.03 ng/uL	64.28 ng/uL
SIH4	65.74 ng/uL	38.84 ng/uL

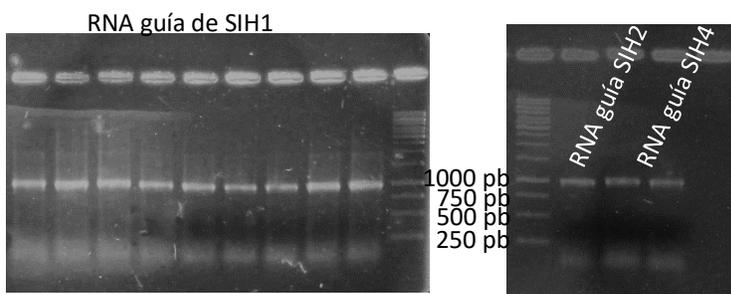


Figura 22: Tamizado de colonias seleccionadas, que contienen el vector pFC332 con el inserto del RNA guía para la SIH1, SIH2 y SIH4, peso molecular aproximado a 940 pb.

A partir de estas colonias se hicieron Miniprep de cada construcción y se enviaron a secuenciar. Los resultados de la secuenciación se vieron a través del programa SnapGene y se comprobó que los fragmentos no se insertaron exitosamente. En la figura 23 se muestra, circulado en color rojo, que no coincide la región secuenciada del protoespaciador para SIH1. Igualmente ocurrió en las otras dos construcciones. La secuencia para el protoespaciador que se obtuvo pertenece a la original del pFC334.



Figura 23: Secuencia obtenida para pFC332::RNA guía de SIH1.

Este resultado sugiere una posible contaminación con el vector original superenrollado (pFC334) y como es de esperar los plásmidos superenrollados tienen una eficiencia de transformación mucho mayor. Por lo tanto, es probable que se haya transformado el plásmido pFC334 y no el vector con el inserto deseado.

Debido a que no se obtuvieron los vectores adecuados para generar cepas mutantes para las hidrofobinas de *A. sydowii* mediante el sistema CRISP/Cas9 se diseñaron oligonucleótidos para usar la metodología tradicional de recombinación homóloga que se ha empleado ampliamente para la generación de mutantes en hongos del género *Aspergillus* (Mizutani et al., 2012; Zhuang et al., 2016). Además de que se realizará una nueva amplificación y ensamble de los fragmentos para ser clonados en el vector pFC332. Es necesario generar estas líneas mutantes para poder estudiar el papel de las hidrofobinas en condiciones tanto de hiposalinidad e hipersalinidad.

## 8- Conclusiones

- Según los modelos obtenidos, las hidrofobinas SIH1 y SIH2 que se expresan en alta salinidad, son estructuralmente similares y ambas presentan un lado cargado negativamente y otro lado donde predominan las cargas positivas y neutras. Sin embargo, la SIH4, que se expresa en la condición sin sal, tiene en ambos lados regiones cargadas con pequeños parches neutros. Estas características observadas en los monómeros de las hidrofobinas estudiadas podrían influenciar sus estructuras cuaternarias y en la formación de las películas.

-Los vectores para la expresión heteróloga en *P. pastoris* de las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 están listos para ser inducidos y purificar las proteínas.

-Los agregados celulares formados por *A. sydowii* en la condición de crecimiento óptimo (0.5 M) son mayores que los de las condiciones de estrés hiper- e hiposalino en los días 3 y 5. Sin embargo, entre el día 5 y 7 ocurre una desagregación resultando en agrupaciones más pequeñas.

-No se obtuvieron los vectores adecuados para la generación de las mutantes para las hidrofobinas SIH1, SIH2 y SIH4 de *A. sydowii*, pero se diseñaron los oligonucleótidos para la generación de las mutantes mediante la metodología de recombinación homóloga.

## 9- Perspectivas

Las hidrofobinas están involucradas en muchas funciones vitales para los hongos filamentosos, sin embargo, aún no se ha comprobado su función en la adaptación a la salinidad del medio. Por esta razón, nos proponemos la evaluación de las funciones de las hidrofobinas de *A. sydowii* en respuesta a la salinidad. Para esto se desarrollarán las siguientes tareas:

1- Análisis bioinformático: Analizar los promotores transcripcionales y elementos reguladores de los genes que codifican para las hidrofobinas de *A. sydowii*.

In silico: Generar posibles modelos de oligomerización de estas hidrofobinas. Identificar sitios potenciales de unión a metales y a carbohidratos.

2- Análisis in vitro: Caracterizar las principales propiedades biofísicas de las hidrofobinas de *A. sydowii* y los cambios de estas propiedades en presencia de NaCl. Se estudiará la estructura secundaria mediante Dicroísmo Circular, la oligomerización a través de la Dispersión Dinámica de la Luz (del inglés DLS) e hidrofobicidad/hidrofilicidad de las películas por Ángulo de Contacto de Agua (del inglés WCA). Se realizará un análisis comparativo con hidrofobinas de otros hongos halófilos y no halófilos para determinar la relevancia funcional de los cambios en estas propiedades y finalmente estudiar la formación de la película de hidrofobinas en diferentes condiciones de salinidad mediante Microscopía de Fuerza Atómica.

3- Análisis in vivo: Construir mutantes de hidrofobinas de la cepa de *A. sydowii*, caracterizar el crecimiento y tolerancia a salinidad, así como la respuesta a otros factores de estrés como temperatura, estrés oxidativo, entre otros. Las construcciones se realizarán mediante recombinación homóloga, posteriormente se generarán cepas de *A. sydowii* simples y dobles mutantes para las hidrofobinas mediante la técnica de protoplastos. Además, analizar el crecimiento y morfología de la colonia en medio sólido y líquido en distintas condiciones de salinidad de las cepas silvestres y mutantes, y finalmente caracterizar los cambios morfológicos de la pared celular a distintas concentraciones de sal, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), de las cepas mutantes. Se analizará el grosor de la pared y la superficie de la pared celular, tanto en la cepa silvestre como en las mutantes.

## 10- Referencias bibliográficas

- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/mubr.00042-09>
- Askolin, S., Penttilä, M., Wösten, H. A. B., & Nakari-Setälä, T. (2005). The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.047>
- Ball, S. R., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2020). Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 425, 29–51. [https://doi.org/10.1007/82\\_2019\\_186](https://doi.org/10.1007/82_2019_186)
- Ball, S. R., Pham, C. L. L., Lo, V., Morris, V. K., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2020). Formation of Amphipathic Amyloid Monolayers from Fungal Hydrophobin Proteins. *Methods in Molecular Biology*, 2073, 55–72. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9869-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9869-2_4)
- Batista-García, R. A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., Atriztán-Hernández, K., Morales-Herrera, C., Rodríguez-Hernández, R., & Folch-Mallol, J. (2014). Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105893>
- Beauvais, A., Fontaine, T., Aïmanianda, V., & Latgé, J. P. (2014). *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia*, 178(5–6), 371–377. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9766-0>
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25(Table 1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., ... Grigoriev, I. V. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. In *Genome Biology* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>

- Dominy, B. N., Perl, D., Schmid, F. X., & Brooks, C. L. (2002). The effects of ionic strength on protein stability: The cold shock protein family. *Journal of Molecular Biology*, 319(2), 541–554. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00259-0)
- Ebbole, D. J. (1997). Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends in Microbiology*, 5(10), 405–408. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01130-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01130-X)
- Free, S. J. (2013). Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In *Advances in Genetics* (1st ed., Vol. 81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M., & Nishikawa, K. (2003). Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 327(2), 347–357. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00150-5)
- Gandier, J. A., Langelaan, D. N., Won, A., O'Donnell, K., Grondin, J. L., Spencer, H. L., Wong, P., Tillier, E., Yip, C., Smith, S. P., & Master, E. R. (2017). Characterization of a Basidiomycota hydrophobin reveals the structural basis for a high-similarity Class I subdivision. *Scientific Reports*, 7(April), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep45863>
- Gostinčar, C., Grube, M., De Hoog, S., Zalar, P., & Gunde-Cimerman, N. (2010). Extremotolerance in fungi: Evolution on the edge. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00794.x>
- Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitaš, A. (2011). Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. *Advances in Applied Microbiology*, 77, 71–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387044-5.00003-0>
- Grant, W. D., Danson, M. J., Scott, D. J., Halling, P. J., Engberts, J. B. F. N., Ho, M. W., & Berendsen, H. J. C. (2004). Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1448), 1249–1267. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1502>
- Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J. C., Diderichsen, B., & Plemenitaš, A. (2003). Extremophilic fungi in arctic ice: A relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28(28–32), 1273–1278. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2003.08.056>
- Gunde-Cimerman, Nina, Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- Gunde-Cimerman, Nina, & Zalar, P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technology and Biotechnology*,

52(2), 170–179.

- Hähl, H., Griffo, A., Safaridehkohne, N., Heppe, J., Backes, S., Lienemann, M., Linder, M. B., Santen, L., Laaksonen, P., & Jacobs, K. (2019). Dynamic Assembly of Class II Hydrophobins from *T. reesei* at the Air-Water Interface. *Langmuir*, 35(28), 9202–9212. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01078>
- Hakanpää, J. (2006). Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI-The structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Science*, 15(9), 2129–2140. <https://doi.org/10.1110/ps.062326706>
- Hakanpää, J., Paananen, A., Askolin, S., Nakari-Setälä, T., Parkkinen, T., Penttilä, M., Linder, M. B., & Rouvinen, J. (2004). Atomic Resolution Structure of the HFBI Hydrophobin, a Self-assembling Amphiphile. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 534–539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309650200>
- Ide-Pérez, M. R., Fernández-López, M. G., Sánchez-Reyes, A., Leija, A., Batista-García, R. A., Folch-Mallol, J. L., & Sánchez-Carbente, M. D. R. (2020). Aromatic hydrocarbon removal by novel extremotolerant *Exophiala* and *Rhodotorula* spp. From an oil polluted site in Mexico. *Journal of Fungi*, 6(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/jof6030135>
- Kis-Papo, T., Weig, A. R., Riley, R., Peršoh, D., Salamov, A., Sun, H., Lipzen, A., Wasser, S. P., Rambold, G., Grigoriev, I. V., & Nevo, E. (2014). Genomic adaptations of the halophilic Dead Sea filamentous fungus *Eurotium rubrum*. *Nature Communications*, 5(May), 3745. <https://doi.org/10.1038/ncomms4745>
- Kogej, T., Gorbushina, A. A., & Gunde-Cimerman, N. (2006). Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological Research*, 110(6), 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.01.014>
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6600–6605. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6600-6605.2005>
- Kunčič, M. K., Kogej, T., Drobne, D., & Gunde-Cimerman, N. (2010). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 329–337. <https://doi.org/10.1128/AEM.02318-09>
- Kwan, A. H. Y., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G.,

- Templeton, M. D., & Mackay, J. P. (2006). Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(10), 3621–3626. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505704103>
- Lenassi, M., Gostinčar, C., Jackman, S., Turk, M., Sadowski, I., Nislow, C., Jones, S., Birol, I., Cimerman, N. G., & Plemenitaš, A. (2013). Whole Genome Duplication and Enrichment of Metal Cation Transporters Revealed by De Novo Genome Sequencing of Extremely Halotolerant Black Yeast *Hortaea werneckii*. *PLoS ONE*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071328>
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., & Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(5), 877–896. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.004>
- Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, *4*(2), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s007920050142>
- Mizutani, O., Masaki, K., Gomi, K., & Iefuji, H. (2012). Modified cre-loxp recombination in *Aspergillus oryzae* by direct introduction of Cre recombinase for marker gene rescue. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(12), 4126–4133. <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-12>
- Moonjely, S., Keyhani, N. O., & Bidochka, M. J. (2018). Hydrophobins contribute to root colonization and stress responses in the rhizosphere-competent insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology (United Kingdom)*, *164*(4), 517–528. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000644>
- Morris, V. K., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2013). Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *Journal of Molecular Biology*, *425*(2), 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.021>
- Nakari-Setälä, T., Aro, N., Ilmén, M., Muñoz, G., Kalkkinen, N., & Penttilä, M. (1996). Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*: Cloning and characterization of the hfb2 gene. *VTT Publications*, *423*(254), 1–15.
- Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>
- Paul, S., Bag, S. K., Das, S., Harvill, E. T., & Dutta, C. (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: Insights from genome and proteome composition of halophilic

- prokaryotes. *Genome Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r70>
- Pérez-Llano, Y., Rodríguez-Pupo, E. C., Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Cai, F., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Gostinčar, C., Kostanjšek, R., Folch-Mallol, J. L., Batista-García, R. A., & Sánchez-Carbente, M. del R. (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells*, 9(3), 525. <https://doi.org/10.3390/cells9030525>
- 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*, 5(MAY), 1–12. <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>
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289–318. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140863>
- Siglioccolo, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., & Pascarella, S. (2011). Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-11-50>
- St. Leger, R. J., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1992). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 120(1), 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90019-L](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90019-L)
- Stringer, M. A., Dean, R. A., Sewall, T. C., & Timberlake, W. E. (1991). Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes and Development*, 5(7), 1161–1171. <https://doi.org/10.1101/gad.5.7.1161>
- Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beaver, R. E., & Mackay, J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron*, 39(7), 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.08.003>
- Tafer, H., Poyntner, C., Lopandic, K., Sterflinger, K., & Piñar, G. (2019). Back to the salt mines: Genome and transcriptome comparisons of the halophilic Fungus *Aspergillus salisburgensis* and its halotolerant relative *Aspergillus sclerotialis*. *Genes*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/genes10050381>

- Talbot, N. J., Ebole, D. J., & Hamer, J. E. (1993). Identification and characterization of *Mpg1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 5(11), 1575–1590. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.11.1575>
- Turk, M., Abramović, Z., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi. *FEMS Yeast Research*, 7(4), 550–557. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00209.x>
- Valsecchi, I., Lai, J. I., Stephen-Victor, E., Pillé, A., Beaussart, A., Lo, V., Pham, C. L. L., Aïmanianda, V., Kwan, A. H., Duchateau, M., Gianetto, Q. G., Matondo, M., Lehoux, M., Sheppard, D. C., Dufrene, Y. F., Bayry, J., Guijarro, J. I., Sunde, M., & Latgé, J. P. (2019). Assembly and disassembly of *Aspergillus fumigatus* conidial rodlets. *Cell Surface*, 5(February), 100023. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100023>
- Wessels, J. G. H. (1992). Gene expression during fruiting in *Schizophyllum commune*. *Mycological Research*, 96(8), 609–620. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80485-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80485-1)
- Wessels, J. G. H. (1997). Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 38). [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60154-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60154-x)
- Wessels, J. G. H., De Vries, O. M. H., Ásgeirsdóttir, S. A., & Schuren, F. H. J. (1991). Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell*, 3(8), 793–799. <https://doi.org/10.2307/3869273>
- Wösten, H. A. B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*, 55, 625–646. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>
- Zajc, J., Liu, Y., Dai, W., Yang, Z., Hu, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: Haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-617>
- Zhuang, Z., Lohmar, J. M., Satterlee, T., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2016). The master transcription factor *mtfA* governs aflatoxin production, morphological development and pathogenicity in the fungus *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/toxins8010029>