



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN  
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PIR DE  
*Neurospora crassa* COMO ANCLAS MOLECULARES  
PARA EL DESPLIEGUE DE PROTEÍNAS EN  
HONGOS FILAMENTOSOS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN  
BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

**IBT. PAUL ALEJANDRO MONTAÑO SILVA**

**DIRECTOR:** Dr. JORGE ALBERTO VERDÍN RAMOS

**ASESOR:** Dr. BENJAMÍN RODRÍGUEZ GARAY

**ASESOR:** Dr. JORGE ALBERTO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

Zapopan, Jalisco, AGOSTO DEL 2019



Zapopan, Jalisco, 8 de agosto de 2019

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Desarrollo del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollados pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Desarrollo del Estado de Jalisco, A.C y en el mismo tenor, reconozco que si derivasen de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán, en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Paul Alejandro Montaña Silva



Zapopan, Jalisco, 8 de agosto del 2019

**CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.**

**PRESENTE**

Los que suscriben miembros del comité tutorial del estudiante PAUL ALEJANDRO MONTAÑO SILVA, una vez leída y revisada la tesis titulada **"Evaluación de las proteínas PIR de *Neurospora crassa* como anclas moleculares para el despliegue de proteínas en hongos filamentosos"** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los ocho días del mes de agosto del año dos mil diecinueve.

Dr. Jorge Alberto Verdín Ramos  
Director

Dr. Benjamín Rodríguez Garay  
Asesor

Dr. Jorge Alberto Rodríguez González  
Asesor



## LIBERACIÓN DEL SÍNODO


Zapopan, Jalisco, 8 de agosto del 2019

Mtra. Fátima Ordoñez de la Cruz  
Coordinador Académico de la Maestría en Ciencias en Innovación tecnológica  
Guadalajara, Jalisco

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado del estudiante PAUL ALEJANDRO MONTAÑO SILVA una vez leída y revisada la tesis titulada **“Evaluación de las proteínas PIR de *Neurospora crassa* como anclas moleculares para el despliegue de proteínas en hongos filamentosos”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 8 días del mes de agosto del año 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Benjamín Rodríguez Garay  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Alberto Rodríguez González  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Leticia Casas Godoy  
Vocal

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de maestría en su programa de posgrados.

Hago un agradecimiento especial al Dr. Jorge Verdín quien fue mi director de tesis que a su vez fue mi mentor y guía durante todo el recorrido. Gracias por dejarme claro que siempre hay que trabajar con los estándares más altos posibles si queremos destacar en lo que hacemos. Gracias por todas sus enseñanzas.

Al Dr. Benjamín Rodríguez y al Dr. Jorge Rodríguez por sus aportaciones y que además fueron parte del comité tutorial.

A la Dra. Meritxell Riquelme y su equipo de trabajo por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo durante la estancia en el laboratorio de Microbiología del CICESE.

Al proyecto Fondo sectorial de Sustentabilidad Energética, SENER-CONACYT (245750) por el financiamiento de esta investigación.

A todo el “Equipo Verdín” quienes fueron parte importante durante el proceso, quienes de una u otra manera aportaron lo suficiente al compartir sus estrategias de trabajo que ayudaron en gran medida a optimizar los tiempos.

A Saul Ezequiel, Xitlalli Hernández, Gladys Páez, Rafael León y Nabor Haro quienes me ofrecieron su amistad y apoyo durante todo el trayecto.

A mi mamá, quien con su apoyo incondicional a estado siempre para mí. Sin ella nada.

# Contenido

Capítulo 1 .....	6
1. Antecedentes .....	6
1.1 Sistemas de despliegue en la superficie celular .....	6
1.2. Componentes de un sistema de despliegue. ....	7
1.2.1. La pared celular fúngica.....	8
1.2.2. Anclas moleculares.....	14
1.2.3. Huésped.....	16
1.3. Diversidad, función y evolución de las manoproteínas en hongos.....	18
Capítulo 2.....	20
2.1 Justificación .....	20
2.2. Hipótesis .....	21
2.3. Objetivo general.....	21
2.3.1. Objetivos específicos .....	21
Capítulo 3.....	22
3. Materiales y métodos .....	22
3.1. Reactivos y equipos. ....	22
3.2. Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento. ....	22
3.3. Análisis bioinformático .....	24
3.3.1. Búsqueda de ortólogos PIR en hongos .....	24
3.3.2. Caracterización estructural por inferencia bioinformática .....	24
3.3.3. Agrupamiento por clanes .....	25
3.3.4. Alineamiento de secuencias. ....	25
3.3.5. Edición del alineamiento múltiple.....	25
3.3.6. Reconstrucción filogenética .....	25
3.4 Estudios microbiológicos.....	26
3.4.1 Determinación de la velocidad de crecimiento y patrones de ramificación. .....	26
3.4.2 Ensayo de susceptibilidad a <i>Calcofluor White</i> (CFW).....	26
3.5 Métodos moleculares .....	27
3.5.1 Técnicas moleculares .....	27

3.5.2. Caracterización molecular de las cepas mutantes.....	28
3.5.3 Construcción de casetes de expresión .....	30
3.5.4 Transformación de conidios de <i>N. crassa</i> .....	34
3.6 Microscopia .....	34
Capítulo 4.....	35
4. Resultados y discusión.....	35
4.1. Clasificación y caracterización de las secuencias de proteínas PIR putativas .....	35
4.1.1 Clúster 1 .....	36
4.1.2 Clúster 2 .....	38
4.1.3 Clúster 3 .....	39
4.1.4 Clúster 4 .....	41
4.1.5 Clúster 5 .....	41
4.1.6 Clúster 6 .....	42
4.1.7 Clúster 7 .....	43
4.1.8 Clúster 8 .....	45
4.2. Relación filogenética entre las proteínas PIR de <i>N. crassa</i> con las de levaduras y otros hongos filamentosos.....	46
4.3 PIR espejo asociado al dominio de cisteínas.....	46
4.4. Evaluación del compromiso funcional de las proteínas PIR-1 (NCU_04033) y PIR-2 (NCU_07569) de <i>N. crassa</i> .....	49
4.4.1 Análisis fenotípico de la cepa $\Delta pir-1$ y $\Delta pir-2$ muestran mayor velocidad de crecimiento que la cepa silvestre.....	51
4.5. Construcción de cepas transgénicas que expresen la proteína verde fluorescente unidas a las proteínas PIR-1 (NCU 04033) y PIR-2 (NCU 07569) 54	
4.5.1 Construcciones de vectores recombinantes para el etiquetado de la proteína PIR1.....	55
4.5.2 Construcciones de vectores recombinantes para el etiquetado de la proteína PIR-2 .....	61
4.6 Expresión y localización de las proteínas PIR fusionadas a GFP.....	64
Apéndice 1. Participación en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica .....	83
Apéndice 2. Publicación de la revisión: Cell surface display of proteins on filamentous fungi.....	85





## Índice de figuras

Figura 1 Estructura de las proteínas GPI y PIR de pared celular de hongos .....	13
Figura 2 Distribución por clase y homología de las proteínas PIR putativas.....	39
Figura 3 Reconstrucción filogenética del total de secuencias de proteínas PIR putativas.....	47
Figura 4 Las proteínas PIR de hongos con dominio de cisteínas asociado a la pared celular tienen un motivo PIR invertido.....	48
Figura 5. Caracterización molecular de las cepas mutantes y cepa silvestre. ....	50
Figura 6) Comparación de los patrones de ramificación de las cepas mutantes $\Delta$ pir-1 y $\Delta$ pir2 y WT. ....	52
Figura 7 Ensayo de susceptibilidad de la pared celular de <i>N. crassa</i> a CFW. ....	54
Figura 8 . Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pGEM:NPIR-1, pGEM:NPIR-1 Kex, pGEM:CPIR-1 y pGEM:CPIR-1 $\Delta$ GPI.. ....	57
Figura 9 Representación gráfica de los casetes de expresión insertados el plásmido pGEM.....	58
Figura 10 Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pMF272:NPIR-1, pMF272:NPIR-1 Kex, pMF272:CPIR-1 y pMF272:CPIR-1 $\Delta$ GPI. ....	59
Figura 11 Representación gráfica de los casetes de expresión insertados en el plásmido pMF272 entre el sitio de corte NotI y BstBI.....	60
Figura 12. Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pGEM:NPIR-2 y pGEM:CPIR-2.....	62
Figura 13. Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pMF272:NPIR-2 y pMF272:CPIR-2.....	63
Figura 14. Micrografías confocales de hifas vegetativas de <i>N. crassa</i> en la zona apical.....	67
Figura 15. Micrografías confocales de hifas vegetativas de <i>N. crassa</i> .....	68

## Índice de tablas

Tabla 1. Cepas fúngicas utilizadas en este trabajo .....	23
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. ....	23
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo .....	28
Tabla 4. Especies con proteínas PIR hipotéticas para estudio de vías de secreción alterna. ....	44

# Capítulo 1

## 1. Antecedentes

### 1.1 Sistemas de despliegue en la superficie celular

El despliegue de proteínas en la superficie celular (DPSC) es una técnica de expresión de proteínas diana en la superficie de un microorganismo a través de una fusión co-traducciona con una proteína de anclaje residente en la pared celular (Samuelson et al., 2002).

Estas fusiones pueden ser tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal de la proteína ancla. En las fusiones N-terminal, el extremo amino terminal de la proteína de anclaje está genéticamente fusionado al extremo C-terminal de la proteína diana, por lo que se fusiona una secuencia señal para la secreción al extremo N-terminal de la proteína diana. Mientras que en las fusiones C-terminal, el extremo carboxilo terminal de la proteína de anclaje se fusiona genéticamente con el extremo N-terminal de la proteína diana (Tanaka y Kondo, 2015).

Este tipo de sistemas tienen por objetivo funcionalizar la pared celular del huésped, con lo que se logra dotarlo de nuevas funciones catalíticas o proveerlo de nuevas características de interés biotecnológico (Abe et al., 2003; Kuroda y Ueda, 2013a; Qu et al., 2015; Tanaka y Kondo, 2015; Ueda, 2016; Wei et al., 2018). Por ello, se sugieren una gran cantidad de aplicaciones: obtención de vacunas y desarrollo de anticuerpos, bioconversiones y bioabsorción (Lee et al., 2003; Löfblom, 2011).

La ingeniería de la superficie celular, en conjunto con la ingeniería de proteínas, constituyen una herramienta biotecnológica innovadora para la construcción de nuevos biocatalizadores de célula completa ya que, en comparación con el uso de enzimas libres, los biocatalizadores de células completas pueden reducir la cantidad de enzima utilizada y evitar el paso de la purificación de la proteína, reduciendo los costos en el proceso. Además, se ha visto que las enzimas desplegadas en la superficie celular llegan a tener ventajas que no se encuentran en los enfoques convencionales. Estas enzimas presentan las mismas ventajas de las de las proteínas inmovilizadas en matrices inertes, como el incremento en la actividad

enzimática, mejoramiento en la selectividad y una mayor estabilidad. Además, no se requieren de purificación ni concentración. (Chen et al., 2012; Matsumoto et al., 2004; Moura et al., 2015; Yang et al., 2017).

El primer sistema de despliegue en la superficie fue desarrollado en un bacteriófago (George P. Smith, 1985). A partir de esto, la técnica fue utilizada en otros fagos, sin embargo, las proteínas desplegadas en la superficie de los fagos estaban limitadas al tamaño del huésped (Li, 2000). Para resolver esta problemática se inició con la extrapolación de estas técnicas a organismos más complejos, como bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas (Chen et al., 2009; Isticato et al., 2001; Jose et al., 2002; Lee et al., 2003; Maurer et al., 1997; Richins et al., 1997; Shimazu et al., 2001; Suzuki et al., 1995; Werné Rus et al., 2001).

En seguida, el sistema pasó de bacterias a las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* fue la primer levadura en la que se desarrolló esta tecnología (Kuroda y Ueda, 2013b). Posteriormente, otras levaduras de interés biotecnológico fueron utilizadas para la obtención de nuevos sistemas de despliegue en su superficie celular (Tanino et al., 2006; Wang et al., 2008, 2007; Yuzbasheva et al., 2011), de los cuales un gran número de casos de éxito han sido reportados. Sorpresivamente, en hongos filamentosos, hasta el momento, no ha sido explotado este tipo de sistemas. A la fecha se conocen solo tres hongos que han sido utilizados para generar sistemas de despliegue de proteínas en su superficie celular. Adachi et al. (2008) y Tabuchi et al. (2010) utilizaron al hongo ascomiceto *Aspergillus oryzae*. Donat et al. (2012) utilizó *Aspergillus fumigatus* y Pan et al. (2014) a *Aspergillus niger*.

## 1.2. Componentes de un sistema de despliegue.

En el despliegue de proteínas, la proteína diana es fusionada genéticamente a una proteína que tendrá la función de ancla molecular y la proteína de fusión es expresada e inmovilizada en la superficie de la célula huésped seleccionada (Tanaka y Kondo, 2015). La célula huésped seleccionada, la composición de la pared celular, la proteína ancla y la proteína diana juegan un papel importante en el

despliegue de proteínas por lo que son considerados los cuatro componentes principales en estos sistemas.

### 1.2.1. La pared celular fúngica

Conocer la composición de la pared celular del huésped es una de las etapas más importantes al momento de hacer la elección del huésped en el que se va a desarrollar un sistema de despliegue en la superficie celular. Sin embargo, entender y conocer la estructura, dinámica y composición de la pared celular es una actividad que se ha venido dejando de lado. La pared celular se utilizará como andamio para el despliegue de proteínas. Se sabe que la composición y estructura de la pared celular de hongos es muy variable y dinámica, pero en general, la pared celular contiene quitina, quitosano,  $\beta$ -1,3-glucanos,  $\beta$ -1,4-glucanos,  $\alpha$ -1,3-glucanos y galactomanoproteínas (Bacon et al., 1968; Bowman y Free, 2006; Grün et al., 2005). Y ésta tiene la función de proteger a la célula de la presión osmótica y otros factores de estrés ambientales, además, provee de protección contra otros microbios (Free, 2013).

La quitina y la matriz de glucanos se entrecruzan entre ellos para formar una matriz de quitina/glucano que se encuentra más próxima a la membrana plasmática. Estas dos moléculas son los componentes más abundantes en la pared celular: en *S. cerevisiae* se encuentra entre el 1-2 % de quitina y un 50-55% de  $\beta$ -1,3-glucanos, mientras que en *Neurospora crassa* la quitina representa un 4% y los  $\beta$ -1,3-glucanos pueden llegar a representar un 87% en peso seco de la pared celular (Bowman y Free, 2006; Kapteyn et al., 2000).

Los  $\beta$ -1,3-glucanos son el componente mayoritario en la matriz de glucanos, y puede incluir otros tipos de glucanos como  $\beta$ -1,6-glucanos y  $\alpha$ -1,3-glucanos (Klis et al., 2006). Estos están interconectados mediante enlaces  $\beta$ -1,6 que son sintetizados por glucano sintetasas asociadas a la membrana plasmática que exportan polímeros de glucanos lineales recién sintetizados a través de la membrana plasmática hacia la pared celular (Roncero, 2002; Ruiz-Herrera et al.,

2006). La quitina es sintetizada por quitina sintasas asociadas también a la membrana plasmática, que es sintetizada en polímeros lineales para posteriormente ser incorporados a la pared celular. Los monómeros de quitina pueden ser deacetilados por quitinas deacetilasas para generar quitosano, uno de los componentes menos abundantes de la pared celular de los hongos (Roncero, 2002).

Los  $\beta$ -1,6-glucanos interconectan los  $\beta$ -1,3-glucanos con quitina y algunas manoproteínas, constituyendo el llamado bloque de construcción principal de la pared celular en levaduras. Estos parecen ser exclusivos de levaduras ya que no se ha detectado el polisacárido ni una enzima  $\beta$ -1,6-glucano sintasa putativa en hongos filamentosos (Fontaine et al., 2000; Maddi et al., 2012; Samar et al., 2015).

Sobre la matriz de polisacáridos unidos a quitina se encuentran las glicoproteínas, una serie de proteínas residentes de la pared (CWP). Klis et al (2009), menciona que con estudios del proteoma se ha predicho la presencia de alrededor de 20 proteínas diferentes unidas covalentemente a la pared celular de *Candida albicans*, y que el perfil de las CWP puede cambiar dependiendo de las condiciones ambientales. Estas proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico y son depositadas en la pared a través de la ruta normal de secreción. Existen dos clases de manoproteínas. Una son las N-glicosiladas en el que unas pocas cadenas largas de  $\alpha$ -1,6 manosas, con cadenas laterales  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3, están unidas a través de dos unidades de N-acetilglucosamina al nitrógeno del grupo amino libre del residuo de asparagina en la proteína. El segundo grupo de proteínas son las O-glicosiladas, en el que muchos oligosacáridos de manosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3 están unidos a un átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de residuos de serina o treonina (Carlile et al., 2001)

Los mananos y galactomananos son importantes constituyentes de la pared celular, estos forman la capa más externa de la pared celular de levaduras y hongos filamentosos, respectivamente (Brul et al., 1997). Estos polímeros pueden representar hasta el 20 % de la masa de la pared celular (Lesage y Bussey, 2006). Estos polímeros son añadidos a las glicoproteínas como modificaciones postraduccionales. Son de tal importancia que debido a defectos en este proceso

se podrían generar defectos a nivel estructural en la pared celular, afectando el crecimiento y la viabilidad de las células (Henry et al., 2016; Jin, 2012; Loibl y Strahl, 2013; Maddi et al., 2012). La adición de manosas o galactomananos, en hongos filamentosos, es esencial para la incorporación de proteínas a la pared celular (Deshpande et al., 2008).

En términos del despliegue en la superficie celular, los mananos son el único polisacárido que ha sido modificado con la finalidad de mejorar la eficiencia de estos sistemas de despliegue de proteínas en la superficie celular. Matsuoka et al. (2014) evaluó la eficiencia del despliegue y el desempeño de las  $\beta$ -glucosidasas de *Rhizopus oryzae*.

### **Proteínas con modificaciones glicosilfosfatidilinositol (proteínas GPI)**

Las proteínas de pared celular (CWP) se clasifican como covalentemente y no covalentemente unidas a la pared. Entre las CWPs de unión covalente se encuentran las proteínas con motivo de unión GPI (glicosil fosfatidil inositol). Este tipo de proteínas se pueden encontrar unidas en la pared celular o en la membrana plasmática. Sin embargo, hasta el momento no se sabe con exactitud cuál es la señal adicional que permite que, en hongos filamentosos, una proteína GPI sea translocada a la pared celular o sea unida a la membrana plasmática (figura 1a) (Matthew B Frieman y Cormack, 2004; Mao et al., 2008).

Las proteínas GPI son las más abundantes y mejor caracterizadas. Se estima que pueden llegar a representar alrededor del 50% de las proteínas unidas covalentemente a la pared (Bowman y Free, 2006; Weig et al., 2004a). El anclaje GPI es una estructura de glicolípidos que consiste en un residuo fosfatidil-inositol (PI), un residuo de glucosamina (GlcN), tres manosas, un residuo de fosfato de etanolamina (EtNP) que funcionan para anclar proteínas en la parte externa de la membrana plasmática (figura 1a) (Ferguson et al., 2009; Fujita y Kinoshita, 2012; Paulick y Bertozzi, 2008). La localización final de las GPI-proteínas, ya sea la membrana plasmática o la pared celular, parece ser esencial para su función celular (Matthew B. Frieman y Cormack, 2004).

Las proteínas con anclaje GPI contienen una región de entre 8 y 18 aminoácidos hidrofóbicos en su extremo C-terminal que retiene a la proteína recién sintetizada en el lumen del retículo endoplásmico. En la región inmediata al N-terminal de los 8-18 aminoácidos hidrofóbicos, se encuentra el aminoácido o sitio  $\omega$  que está flanqueado por una región intrínsecamente desordenada. La adición del ancla GPI ocurre cuando el sitio omega es escindido entre el  $\omega$  y  $\omega + 1$  y la proteína se une a un residuo de etanolamina en el GPI (ver figura 1a) (Cheung et al., 2014; Free, 2013; Fujita y Kinoshita, 2012; Kinoshita et al., 2013).

### **Proteínas con repeticiones internas (proteínas PIR)**

Las proteínas con repeticiones internas (PIR, por sus siglas en inglés) son proteínas residentes de la pared celular pertenecientes a la familia de proteínas unidas a través de un enlace álcali-sensible con los  $\beta$ -1,3-glucanos (Mrsa y Tanner, 1999) . Estas proteínas se han reportado en diversas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zigosaccharomyces rouxii* (Toh-e et al., 1993), *Kluyveromyces lactis* (Backhaus et al., 2010), *Candida albicans* (Kandasamy et al., 2000; Kapteyn et al., 1999), *Yarrowia lipolytica* (Jaafar et al., 2003), *Pichia pastoris* (Pal Khasa et al., 2011), y *Candida glabrata* (Weig et al., 2004b). Por lo anterior, se podría inferir que estas proteínas son exclusivas para los ascomicetos. Por otro lado, en hongos filamentosos la presencia de estas proteínas ha sido inferidas bioinformáticamente. En *N. crassa* se ha inferido la presencia de dos proteínas PIR putativas, así como en *Botrytis cinerea* y *Trichoderma reesei* (De Groot et al., 2005). Sin embargo, en *Aspergillus nidulans* y *Ustilago maydis* no se identificaron este tipo de proteínas.

Las proteínas PIR tienen un péptido señal (PS) que permite que la proteína se incorpore a la vía de secreción para ser exportada a la pared celular. Además, en la mayoría de estas proteínas se encuentra un sitio de procesamiento Kex2 (KK, KR), que escinde el propéptido y permite la liberación de la proteína y continuar con el proceso de maduración. Posterior a estos dos sitios previamente descritos (sitio de corte del péptido señal y sitio Kex2) se encuentran una serie de secuencias repetidas que consisten de 18-19 residuos de aminoácidos de los cuales ocho están altamente conservados (Ser, Gln, Asp, Gly, Gln, Ala) (Yang et al., 2014).

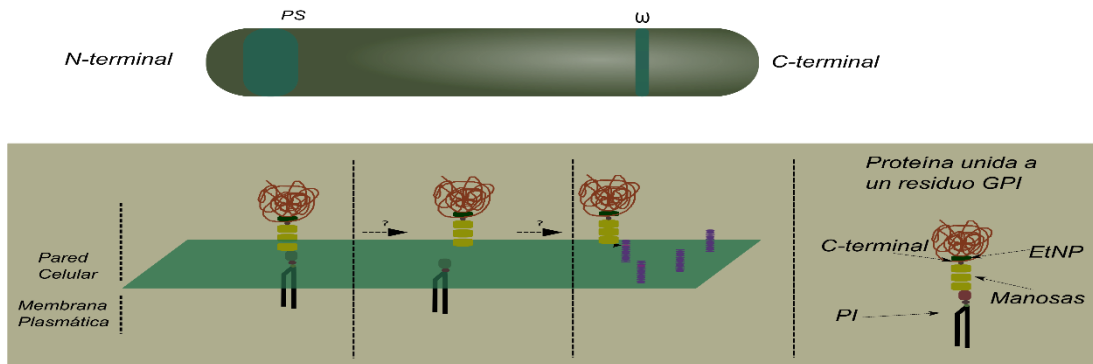


Adicionalmente, en el extremo C-terminal se encuentra un dominio conservado de cuatro cisteínas (figura 1b) (Jaafar et al., 2003; Mrsa y Tanner, 1999; Toh-e et al., 1993). La unión de estas proteínas con los  $\beta$ -1,3-glucanos está dada por un residuo de glutamina específico de la repetición interna, que, después de una reacción de transglutaminación, se convierte en ácido glutámico y reacciona con el grupo hidroxilo de las glucosas de los  $\beta$ -1,3-glucanos (Ecker et al., 2006). Cada repetición interna dentro de la proteína forma un enlace éster, pero con sólo uno es necesario para que la proteína sea unida a la pared. La fuerza de unión a la pared es proporcional al número de repeticiones que tenga una proteína (Castillo et al., 2003; Ecker et al., 2006; Sumita et al., 2005).

Se han reportado cinco proteínas diferentes de la familia PIR en *S. cerevisiae* con un número variable de secuencias internas repetidas (Mrsa y Tanner, 1999; Toh-e et al., 1993). Mientras que en *N. crassa* las dos proteínas reportadas tienen una estructura atípica respecto a las proteínas PIR de levaduras; el dominio conservado de cisteínas se encuentra más próximo al N-terminal, mientras que las repeticiones internas se distribuyen más próximas al C-terminal, contrario a las de levaduras (Weig et al., 2004a). Se sabe que estas glicoproteínas son esenciales para mantener la estructura de la pared y que están directamente asociadas a la resistencia a choques térmicos en levaduras (Castillo et al., 2003; Martínez et al., 2004).

# a

## GPI-proteínas



# b

## PIR-proteínas

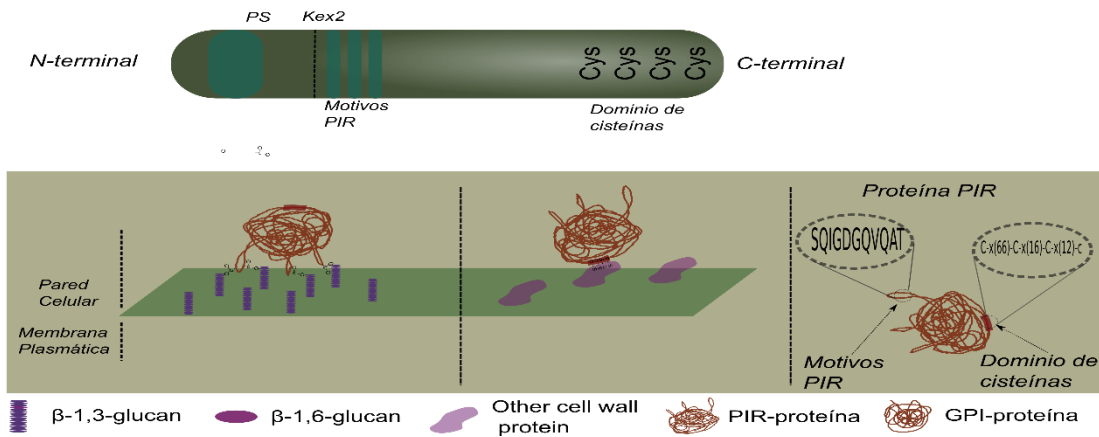


Figura 1 Estructura de las proteínas GPI y PIR de pared celular de hongos

A) Estructura de las GPI-proteínas y mecanismo de unión. Las GPI proteínas tienen un péptido señal en el extremo N-terminal que permite su transporte hacia la membrana plasmática. En el extremo C-terminal se encuentra una cola hidrofóbica de entre 18-19 aminoácidos que contiene una señal GPI. El sitio omega ( $\omega$ ) corresponde al aminoácido en donde se hará el procesamiento para la adición del residuo GPI. La señal para la localización final de una GPI-proteína entre la membrana y la pared aún no se conoce. B) Estructura de las PIR-proteínas. Las proteínas PIR tienen un péptido señal en el extremo N-terminal, seguido por un sitio de procesamiento Kex2. Próximos al extremo N-terminal se localizan una serie de unidades de repeticiones internas (motivos PIR) y más próximos al C-terminal, un dominio de cuatro cisteínas.

### 1.2.2. Anclas moleculares

Las proteínas de la pared celular con funciones de ancla son uno de los componentes más importantes en los sistemas de despliegue de proteínas ya que el uso de proteínas funcionales como anclas podría conducir a defectos en el crecimiento o desestabilizar la integridad de la pared celular. Para que un ancla sea considerada ideal debe tener una secuencia señal que medie el transporte a la superficie celular, una estructura fuerte de anclaje para mantener las proteínas de fusión en la superficie de la célula sin desprendimiento, no debe interferir con la estabilidad de la proteína desplegada, debe ser compatible con la proteína pasajero a fusionar y debe ser resistente a la actividad de proteasas presentes en el espacio periplásmico o en el medio extracelular (Lee et al., 2003).

Muchas manoproteínas de la pared celular han sido utilizadas como anclas moleculares: proteínas con modificaciones glicosilfosfatidil inositol (GPI), proteínas de pared no-covalentemente unidas y proteínas con repeticiones internas (PIR) (Kim et al., 2002).

Una serie de GPI-proteínas (Sed1, Gas1, TIP1, Cwp1) han sido utilizadas con éxito como anclas moleculares sin afectar la integridad de la pared en levaduras (Abe et al., 2004, 2003; Inokuma et al., 2014; Kim et al., 2002; Wang et al., 2008).

Inokuma et al (2014), utilizó el dominio de anclaje de SED1 y su promotor *Psed1* para llevar a cabo un doble despliegue en *S. cerevisiae*. Se desplegó la endoglucanasa II (EGII) de *Trichoderma reesei* y una  $\beta$ -glucosidasa (BGL1) de *Aspergillus oculeatus*. En donde reportaron una alta eficiencia en la integración de las proteínas de despliegue en la pared celular al utilizar este casete. Además, reportaron que la actividad  $\beta$ -glucosidasa se incrementó 8.4 veces. Por otro lado, Van Der Vaart et al (1994), utilizó el extremo C-terminal las proteínas Cwp1p, Cwp2p, Tip1p y Ag $\alpha$ 1p como anclas moleculares para desplegar  $\alpha$ -galactosidasa en la pared celular de *S. cerevisiae* y evaluar los niveles de expresión heteróloga de las proteínas y la eficiencia de anclaje para cada una de las anclas. En este trabajo encontraron que el uso de un dominio de anclaje grande no necesariamente resulta

en una mejor exposición de la enzima inmovilizada en la superficie celular de levaduras.

Por otro lado, las proteínas PIR son las segundas proteínas de pared más abundantes y una de las más utilizadas como anclas en sistemas de despliegues ya que permiten configuraciones de despliegue tanto en N como en C-terminal (Yang et al., 2014).

Abe et al (2003), desplegó la enzima  $\alpha$ -1,2-galactosiltransferasa proveniente de *Schizosaccharomyces pombe* utilizando la proteína Pir1p de *S. cerevisiae* mediante una fusión C-terminal y, adicionalmente, desplegó la  $\alpha$ -1,3-manosiltransferasa utilizando también el extremo C-terminal de Pir2p. Con esto se demostró que Pir1p y Pir2p pueden ser utilizadas como anclas para la inmovilización simultánea de algunas glicosiltransferasas en la superficie celular de levaduras.

Aunque las proteínas PIR han sido utilizadas como proteínas de anclaje para el despliegue de proteínas en la superficie de levaduras, aún se encuentran bastantes escollos por superar para hacer un uso eficiente y completo de ellas. Uno de los principales problemas de las proteínas ancla es que a menudo se secretan al medio; otro de los problemas es que las proteínas de fusión han mostrado baja expresión. Por lo que la búsqueda de nuevas alternativas para el despliegue de proteínas utilizando como anclas a las proteínas PIR es conveniente, particularmente en hongos filamentosos donde el despliegue de proteínas está poco desarrollado.

La búsqueda de nuevas alternativas de proteínas como anclas moleculares, lleva consigo problemas intrínsecos por resolver, entre ellos, determinar su localización *bona fide*, y este es el primer paso en el proceso de selección. Recientemente ha habido un gran interés por entender más a fondo la dinámica de las proteínas en un microorganismo. El uso de proteínas reportero se ha convertido en una de las herramientas más prometedoras para intentar dilucidar procesos internos de la célula. La proteína verde fluorescente, GFP, es una de las proteínas más ampliamente utilizadas como reportero lo que abre las puertas para poder utilizar a esta proteína para conocer la localización de una proteína con potencial para ser utilizada como ancla (Freitag et al., 2004).

### 1.2.3. Huésped

Los sistemas de expresión en superficie inicialmente fueron desarrollados en virus (un fago filamentoso) (Scott y Smith, 1990); sin embargo, el uso de virus era poco eficiente para la expresión de proteínas o péptidos de mayor tamaño. El uso de la superficie celular de bacterias resultaba más prometedor en cuanto al despliegue de proteínas más complejas y un mayor número de ellas en la superficie celular (Georgiou et al., 1997, 1993). A pesar del gran número de casos de éxito que el uso de bacterias tuvo, principalmente en la construcción de librerías de ligandos, antígenos y anticuerpos (Desvaux et al., 2006), éstas no fueron útiles en procesos industriales como la industria de los alimentos y farmacéuticos debido a que generalmente deben ser utilizados microorganismos considerados como “GRAS”.

*Saccharomyces cerevisiae* ha sido uno de los microorganismos más ampliamente utilizados. Ésta levadura reconocida como “GRAS” se ha utilizado como huésped para el DPSC. Además, *S. cerevisiae* permite la expresión correcta de proteínas heterólogas de eucariotas gracias a su sistema de modificaciones postraduccionales y a que puede ser sujeto a manipulaciones genéticas (Kondo y Ueda, 2004).

Hasunuma y Kondo (2012) han desplegado celulasas en la superficie celular de *S. cerevisiae* para la producción de etanol. Por otro lado, Sakuragi et al., (2013) han utilizado esta misma levadura para el despliegue de xilosa isomerasa en su superficie celular para la fermentación de xilosa. Muria et al. (1999) reportaron la inmovilización de dos enzimas amilolíticas en la superficie celular de levaduras utilizando  $\alpha$ -glutinina como ancla.

Otras levaduras de interés industrial también han sido utilizadas para del DPSC; entre ellas *P. pastoris*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces boulardii*, *Yarrowia lipolytica*, en las que se han desplegado LipB de *Candida antártica* (Moura et al., 2015),  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus aculeatus* (Yanase et al., 2010) , MIC2 de *Eimeria tenella* (Wang et al., 2014), Lip-2 de *Y.lipolytica* (Yuzbasheva et al., 2011), respectivamente. Por otro lado, el reducido espacio de la pared celular de las

levaduras hace que el desarrollo de un sistema de DPSC sea limitado. Si bien, se han utilizado diferentes técnicas con la finalidad de incrementar la cantidad de proteínas ancladas a la superficie, los esfuerzos no han sido suficientes.

Los hongos filamentosos parecen ser un huésped con el potencial de desarrollar sistemas de despliegue altamente eficientes; sin embargo, llevar a cabo un despliegue de proteínas en la superficie celular de un hongo filamentosos podría representar un gran reto.

El poco entendimiento de la dinámica de la pared celular y su composición son los principales factores que limitan el uso de estos microorganismos en el DPSC. Además, es necesario entender mejor las rutas de secreción y la localización final de las proteínas que puedan ser utilizadas como anclas moleculares. Por lo tanto, la falta de proteínas de pared bien caracterizadas imposibilita la elección del ancla más adecuada para el DPSC en hongos filamentosos.

El uso de hongos filamentosos para el DPSC está limitado, increíblemente, a cinco casos en donde se han utilizado los hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus fumigatus*. Adachi et al. (2008) han utilizado el sistema de despliegue de proteínas en *Aspergillus oryzae* empleando una proteína GPI como ancla. En este estudio se reportó que, de acuerdo con la eficiencia de integración de la proteína fusionada en la superficie, será la actividad para la totalidad del sistema. Pan et al. (2014) reportaron la construcción de un biocatalizador de célula completa utilizando la CwpA de *A. niger* como ancla para el despliegue de CALB, una lipasa de *C. antarctica*, en *A. niger*. donde observaron un incremento de hasta 400 y 240 U/g de biomasa seca para la actividad hidrolítica y la actividad de síntesis, respectivamente. Con base a esos resultados, demostraron el uso eficiente de CwpA, una GPI-proteína, como ancla molecular para el despliegue de enzimas en *A. niger* (Pan et al., 2014).

Tabuchi et al. (2010) demostraron el uso eficiente de un módulo de unión a carbohidratos (CBM) proveniente de *S. cerevisiae*, en un sistema de DPSC en *A. oryzae*. Mediante el despliegue de GFP como proteína reportero y posteriormente el despliegue de una triacilglicerol lipasa (tgIA) tanto en el extremo N- como en el C-

terminal, demostraron el uso de CBM como la primer proteína ancla que permite la fusión de una proteína en ambos extremos (Tabuchi et al., 2010).

A pesar de los éxitos reportados del uso de algunos hongos filamentosos en el despliegue de proteínas, éstos no han sido explotados. Además, a diferencia de las levaduras, los hongos filamentosos ofrecen ventajas respecto al desarrollo de biocatalizadores basados en despliegues superficiales en términos de eficiente expresión homóloga y heteróloga de genes y su alta actividad lignocelulolítica que algunos de ellos tienen. Aunado a esto, en la mayoría de los hongos filamentosos, la manipulación genética es, hasta el momento, un tanto complicada y relativamente poco desarrollada.

Debido a las características favorables de *Neurospora crassa* y a las abundantes herramientas que han sido desarrolladas para estudiarla, este hongo ha tenido recientemente un auge como hongo biotecnológico, particularmente enfocado en el estudio de su maquinaria lignocelulolítica para la producción de biocombustibles (Shrestha et al., 2011; Znameroski et al., 2012).

Gracias al desarrollo de herramientas moleculares como las técnicas de transformación del material genético en *Neurospora crassa* (Mishra y Tatum, 1973), que a su vez permitió el desarrollo de técnicas de silenciamiento de genes (Silker et al., 1987) y la integración de promotores inducibles y constitutivos (Cambell J, Enderline C, 1994; McNally y Free, 1988), ha sido posible la creación de toda una biblioteca de deleciones de su genoma (Colot et al., 2006).

### 1.3. Diversidad, función y evolución de las manoproteínas en hongos

Las levaduras tuvieron una aparición muy temprana en el curso de la evolución eucariótica, mientras que los hongos ascomicetos y basidiomicetos filamentosos divergieron mucho más tarde a través de un ancestro común. Una serie de proteínas se han ido especializando a lo largo de los ciclos de evolución. Otras proteínas han ido surgiendo, marcando las bases de las diferencias entre ordenes o filos. A nivel de secuencia de aminoácidos, los dominios o motivos funcionales en una proteína

se consideran pequeñas unidades de evolución. Y estos pueden variar en número, desde uno hasta más de 10 repeticiones. Los mecanismos que subyacen a la ganancia o pérdida de dominios pueden ser varios, entre los principales; retroposición, fusión de genes mediante la unión de exones de genes adyacentes, recombinación de ADN y duplicación (Arguello et al., 2007; Nasir et al., 2017; Wang y Caetano-Anollés, 2006; Yang et al., 2008).

Entender y conocer la trayectoria evolutiva de los dominios o motivos funcionales de proteínas ayuda a entender los roles que desempeñan y sus cambios funcionales durante el curso de la evolución (Zhang et al., 2015).

Zhang et al. (2015) demostró cómo los dominios CFEM son únicos para los hongos y, además, lograron trazar una trayectoria evolutiva de éstos y proporcionaron nuevo conocimiento para el entendimiento sobre el intercambio funcional de las proteínas. Por otro lado, Muszewska et al. (2017) reportaron una proteína (Ssy) perteneciente a la familia de las serinproteasas como una innovación presente en los subfilos Agaromycota y Agaromycotina.

Las proteínas de pared suelen tener un contenido inusualmente alto de repeticiones en tándem y no-tándem, y una alta frecuencia de cambios en el número de repeticiones tanto en parálogos como entre ortólogos de cepas conespecíficas (Xie y Lipke, 2010). Por otro lado, la rápida diversificación de las proteínas de pared ayuda a los hongos a responder a diferentes estímulos y adaptarse a ellos. Sin embargo, las enzimas encargadas de la construcción y remodelación de la pared se han venido conservando. Las transglicosidasas de la familia GAS/GEL/PHR presentes en ascomicetes y basidiomicetes, son ejemplos de proteínas de pared altamente conservadas (Arroya et al., 2007).

Otro mecanismo de evolución-adaptación es la regulación de la expresión, donde los cambios de la composición proteica de la pared celular tienen una gran relevancia biológica e industrial; que permite una mejor respuesta hacia su entorno.



## Capítulo 2

### 2.1 Justificación

Los sistemas de despliegue de proteínas en la superficie celular se han venido desarrollando ampliamente por la gran cantidad de aplicaciones que estos sistemas presentan, incluyendo vacunas, desarrollo de anticuerpos, bioconversiones, también como sistemas de bioadsorción, entre otros. Esta tecnología ha sido desarrollada principalmente en bacterias y levaduras; sin embargo, el despliegue de proteínas está poco desarrollado en hongos filamentosos.

*N. crassa* ha sido utilizada como organismo modelo para muchas investigaciones gracias a características como requerimientos nutricionales simples, rápido crecimiento, conocimiento completo de su genoma y la existencia de una gran variedad de herramientas moleculares para manipularla. Por otro lado, *N. crassa* presenta una gran capacidad lignocelulolítica la cual puede ser acoplada a la síntesis de moléculas biotecnológicamente interesantes por las enzimas desplegadas, de las cuales las proteínas PIR representan una alternativa muy prometedora para el desarrollo de esta tecnología.

Es bien sabido que debido a las características de las proteínas PIR de *N. crassa*, es posible que estas proteínas puedan ser utilizadas como anclas moleculares dado que, por la presencia de un dominio de 5 cisteínas en el extremo N-terminal y la presencia de secuencias repetidas en el extremo C-terminal, confieren una mayor sujeción a la pared celular ya que se unen por medio de un enlace disulfuro o mediante un enlace a  $\beta$ -1,3-glucano, respectivamente. La presencia del enlace con  $\beta$ -1,3- glucosa hace aún más atractivo el uso de estas proteínas como anclas ya que este enlace es fácilmente dissociado con una solución ligeramente alcalina. Además, en *N. crassa* el dominio de cisteínas está conformado por cinco residuos, lo que podría conferir mayor estabilidad a la unión con la pared. Sumando estas dos características, podemos decir que se podría obtener un sistema de despliegue con una eficiencia mayor que en otros organismos y, además, debido a la fácil disociación del complejo de despliegue, se traduciría en un sistema versátil para su aplicación como biocatalizador o bioadsorbente de célula completa.

Por todo esto que representa el uso de *N. crassa* en estos sistemas es que se propone la identificación y caracterización de las proteínas PIR, ya que hasta hoy en día lo que se sabe sobre estas proteínas en hongos filamentosos sólo ha sido inferido bioinformáticamente.

## 2.2. Hipótesis

Las proteínas PIR-1 (NCU\_04033) y PIR-2 (NCU\_07569) de *Neurospora crassa* son proteínas que residen en la pared celular que pueden ser utilizadas como anclas moleculares para el despliegue superficial de proteínas.

## 2.3. Objetivo general

Evaluar las proteínas PIR-1 (NCU\_04033) y PIR-2 (NCU\_07569) de *Neurospora crassa* como anclas moleculares para el despliegue de proteínas en hongos filamentosos.

### 2.3.1. Objetivos específicos

1. Determinar la relación filogenética de las proteínas PIR putativas de *N. crassa* con las de levaduras y las de otros hongos filamentosos.
2. Evaluar el compromiso funcional de las proteínas PIR-1 (NCU\_04033) y PIR-2 (NCU\_07569) de *N. crassa*.
3. Construir cepas transgénicas de *N. crassa* que expresen las proteínas PIR seleccionadas fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor *Ptef-1*.

## Capítulo 3

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Reactivos y equipos.

Calcofluor White M2R (Sal disódica de 4,4'-bis(4-anilino-bis(beta-hidroxiethyl) amino-s-triazina-2-ylamino)-2,2'-estilbeno di sulfónico ácido) (Sigma). Agar bacteriológico (BD Bioxon), D-sacarosa (J.T.Baker), Sorbitol (Sigma), Sorbosa (Sigma), Glucosa (Sigma), Fructosa (Golden bell), Alcohol isopropílico (Sigma), Etanol grado molecular (Sigma), Biotina (Sigma), Agarosa (Invitrogen), NEBuilder (New England BioLabs Inc).

#### 3.2. Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Las cepas de *N. crassa* utilizadas en este estudio se enlistan en la tabla 1. Todas las cepas fueron incubadas a 30°C con periodos de luz y oscuridad controlados. Se utilizó medio mínimo de Vogel (VMM) (Vogel, 1956) en todos los casos sin modificaciones, a excepción del medio utilizado en los ensayos de susceptibilidad a CFW, donde el pH fue ajustado a 7.0 con KOH 10N.

Para la obtención de conidios, las cepas se cultivaron en matraces de 500 mL con 50 mL de VMM sólido a 30 °C durante 14 días en condiciones de luz/oscuridad (12/12). Una vez maduros, los conidios se suspendieron en 50 mL de agua destilada estéril y fría, y se filtraron a través de tela "Magitel" estéril para eliminar el micelio. La suspensión de conidios se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. El concentrado de conidios se lavó dos veces con sorbitol 1 M para eliminar sales del medio. Finalmente, los conidios fueron contados en cámara de Neubauer. La preservación de los conidios fue en sorbitol 1M a -20°C.

Tabla 1. Cepas fúngicas utilizadas en este trabajo

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
FGSC 9013 (WT)	OR74A mat A	FGSC
FGSC 9717	$\Delta mus-51::bar+$ ; <i>his-3</i> mat A	FGSC
FGSC 16451	$\Delta pir-1::hph$	FGSC
FGSC 17985	$\Delta pir-2::hph$	FGSC
N PIR1	<i>Ptef-1::ps-pir-1::egfp::v5::pir-1</i>	Este trabajo
N PIR1- $\Delta$ KEX	<i>Ptef-1::pir-1</i> (1–243):: <i>egfp::v5::pir-1</i> (244–1155)	Este trabajo
C PIR1	<i>Ptef-1::pir-1::v5::egfp</i>	Este trabajo
C PIR1- $\Delta$ GPI	<i>Ptef-1::pir-1</i> (1–1027):: <i>v5::egfp</i>	Este trabajo
N PIR2	<i>Ptef-1::ps-pir-2::egfp::v5::pir-2</i>	Este trabajo
C PIR2	<i>Ptef-1::pir-2::v5::egfp</i>	Este trabajo

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
<i>E. coli</i> top 10®		Invitrogen
<i>E. coli</i> pGEM:n pir-1	<i>Ptef-1::ps::egfp::v5::pir-1</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pGEM:n pir-1 kex	<i>Ptef-1::pir-1</i> (1-243):: <i>egfp::pir-1</i> (244-1155)	Este trabajo
<i>E. coli</i> pGEM:c pir-1	<i>Ptef-1::pir-1::v5::egfp</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pGEM:c pir-1 $\delta$ gpi	<i>Ptef-1::pir-1</i> (1-1027):: <i>v5::egfp</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pGEM:n pir-2	<i>Ptef-1::ps::egfp::v5::pir-2</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pGEM:c pir-2	<i>Ptef-1::pir-2::v5::gfp</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pmf272:n pir-1	3' <i>his-3-flank::ptef-1::ps::egfp::v5::pir-1::5' flank</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pmf272:n pir-1 kex	3' <i>his-3-flank::ptef-1::pir-1</i> (1-243):: <i>egfp::v5::pir-1</i> (244-1155):: <i>5' flank</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pmf272:c pir-1	3' <i>his-3-flank::pir-1::v5::egfp::5' flank</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> PMF272:C PIR-1 $\delta$ GPI	3' <i>his-3-flank::pir-1</i> (1-1027):: <i>v5::egfp::5' flank</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pmf272:n pir-2	3' <i>his-3-flank::ptef-1::ps::egfp::v5::pir-2::5' flank</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> pmf272:c pir-2	3' <i>his-3-flank::pir-2::v5::egfp::5' flank</i>	Este trabajo

### 3.3. Análisis bioinformático

#### 3.3.1. Búsqueda de ortólogos PIR en hongos

La búsqueda de secuencias ortólogas PIR en hongos se realizó a través de la identificación de motivos PIR de levaduras (IPR000420) bajo el modelo de diagnóstico HMM (Hidden Márkov Model) (Finn et al., 2016). La identificación se realizó con ayuda del servidor HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>), el cual es un paquete de cuatro softwares para la búsqueda de similitudes de secuencias de proteínas utilizando métodos probabilísticos. La búsqueda se realizó contra la base de datos *Ensembl Genomes Fungi*. En particular, se utilizó el software *hmmsearch* para la búsqueda de secuencias con motivos PIR, el cual toma un perfil HMM y lo busca contra la base de datos de secuencias blanco (Finn et al., 2011). Se utilizó un E-value de  $1 \times 10^{-4}$  en todos los casos de búsqueda. El total de secuencias obtenidas bajo estos criterios de búsqueda fueron inspeccionados manualmente haciendo énfasis en la eliminación de secuencias repetidas debido a la presencia de más de una cepa de la misma especie. La identificación de repeticiones se realizó mediante alineamientos entre las proteínas de diferentes cepas de la misma especie (ver sección 3.3.3).

#### 3.3.2. Caracterización estructural por inferencia bioinformática

Además de la identificación de motivos PIR en las secuencias de proteínas se realizaron búsquedas de dominios funcionales con la finalidad de inferir su potencial función a nivel celular. Primero, la predicción del péptido señal se llevó a cabo con el servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2008), la búsqueda de señal GPI se realizó con ayuda del servidor big-PI Fungal predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) (Eisenhaber et al., 2004) y con la finalidad reducir el número de posibles falsos positivos en cuanto a la predicción de la señal GPI también se utilizó el servidor PredGPI predictor (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>) (Pierleoni et al., 2008).

### 3.3.3. Agrupamiento por clanes

Para el agrupamiento de las secuencias identificadas por clanes de homología se utilizó el software MMseqs2 (Steinegger y Söding, 2017) localizado en el servidor Bioinformatics toolkit del Instituto Max Planck (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/mmseqs2>). Los parámetros utilizados para el agrupamiento fueron los siguientes: cobertura máxima de alineamiento (CMA): “0.5”, mínima identidad de alineamiento: “0.3”.

### 3.3.4. Alineamiento de secuencias.

En este trabajo se utilizó Clustal X como algoritmo de alineamiento múltiple de secuencias (Thompson et al., 1997). Todos los alineamientos se realizaron con los siguientes parámetros de ajustes: *gap opening*: “10”, *gap extension*: “1”, *Delay divergent sequence (%)*: “30”, *protein weight matrix*: “Blosum series”.

### 3.3.5. Edición del alineamiento múltiple.

La edición de todos los alineamiento múltiples se realizó con ayuda del software JalView versión 2.10.4b1 (Waterhouse et al., 2009). La edición consistió en eliminar los gaps entre las secuencias conservando la continuidad de las secuencias de aminoácidos.

### 3.3.6. Reconstrucción filogenética

Una vez realizada la edición del alineamiento múltiple se procedió con la reconstrucción de la filogenia del total de las secuencias en estudio. Para llevar a cabo este paso se utilizó el software Mega 7 versión 7.0.9 (Kumar et al., 2016). Primeramente, se unieron todos los alineamientos de los clústeres previamente editados en un solo archivo para ser convertidos al formato .meg. Posteriormente, se alimentó al programa Mega 7 con este archivo. El criterio para la reconstrucción filogenética fue el criterio de distancias *Neighbor-joining* (NJ) (Saitou y Nei, 1987). La confiabilidad del árbol fue estimada por la prueba *Bootstrapping* con 1000

réplicas. Las distancias genéticas entre las secuencias fueron estimadas por el método p-distance. La tasa entre sitios fue uniforme y el tratamiento de los gaps fue por eliminación por pares.

### 3.4 Estudios microbiológicos

#### 3.4.1 Determinación de la velocidad de crecimiento y patrones de ramificación.

La velocidad de crecimiento se determinó mediante la extensión radial de la colonia. Las cajas fueron inoculadas con ayuda de un palillo de madera e incubadas a 30 °C durante 16 horas. Posteriormente se procedió a realizar mediciones del radio de la colonia en intervalos de 2 horas. En total se realizaron cuatro mediciones por caja dando como resultado un total de 12 muestras (tres cajas por cepa).

Para determinar los patrones de ramificación se contaron el número de ramas que se encontraban entre la ramificación más próxima al ápice y los siguientes 500 µm hacia la zona distal de la hifa.

#### 3.4.2 Ensayo de susceptibilidad a *Calcofluor White* (CFW)

Para realizar el ensayo de susceptibilidad a *Calcofluor White* se probaron cuatro concentraciones diferentes desde 0.250 mg/mL hasta 1 mg/mL con incrementos de 0.250 mg/mL y cinco concentraciones de inóculo, partiendo de  $5 \times 10^0$  hasta  $5 \times 10^4$  con incrementos de una potencia. El ensayo se realizó por triplicado para todos los tratamientos. La prueba se realizó en cajas Petri de 9 cm de diámetro (25 ml) con VMM a pH 7.

Primeramente, se estandarizaron las condiciones del medio para los ensayos de sensibilidad a CFW ya que este agente químico baja el pH del medio haciendo que el CFW precipitara en el medio. Se estableció un pH 7 como valor de trabajo.

Una vez establecido el valor del pH de trabajo se prepararon las cajas Petri con medio VMM más CFW. La preparación previa del CFW fue de acuerdo con el

protocolo establecido por Ram y Klis (2006): se preparó una solución concentrada de CFW al 1% (peso/vol.) a una concentración final de 10 mg/mL disuelto en KOH 0.5% y glicerol 83% (vol./vol. La solución se esterilizó por filtración.

Seguido de la preparación del CFW, con ayuda de un tubo Falcon, se prepararon todas las cajas con las diferentes concentraciones del reactivo. Para las cajas con 0.250 mg/mL de CFW se agregó 0.625 mL de la solución concentrada, para la concentración de 0.5 mg/mL se utilizaron 1.25 mL de solución concentrada. En el caso del ensayo a concentración de 0.750 mg/mL de CFW se añadió 1.875 mL de la solución concentrada. Por último, para obtener una concentración de 1 mg/mL de CFW se añadieron 2.5 mL. En todos los casos el volumen final fue de 25 mL.

### 3.5 Métodos moleculares

#### 3.5.1 Técnicas moleculares

##### PCR

En las mezclas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron las siguientes concentraciones finales de cada componente: GoTaq G2 Green Master Mix 2X (PROMEGA), 1x; oligonucleótidos, 0.2  $\mu$ M (T4 OLIGO); templado, 2.5 ng (GoTaq se utilizó únicamente para PCR's de caracterización). Para todos los casos de amplificación de los fragmentos de interés para clonación se utilizó la Taq Platinum HiFi (ThermoFisher). El programa de termociclación se describe enseguida: desnaturalización inicial a 94°C/60 s; 25/30 ciclos de desnaturalización a 94 °C/30 s, el alineamiento de los oligonucleótidos se llevó a cabo durante 30 segundos y la temperatura de hibridación de los cebadores estuvo en función de la  $T_m$  de cada uno de ellos (Tabla 2). Tanto la temperatura como el tiempo de elongación de la PCR fueron determinados en concordancia con lo establecido por el proveedor de la DNA polimerasa (GoTaq G2 Green Master Mix, temperatura óptima de 72 °C y amplificación de 1kb por minuto; PlatinumTaq polimerasa de alta fidelidad, temperatura óptima de 68 °C y amplificación de 1Kb por minuto) (Promega, México). Por último, un ciclo adicional de acabado se llevó a cabo a 67



°C/72 °C durante 5 min. La secuencia y la Tm de cada uno de los oligonucleótidos se pueden encontrar en la Tabla 2.

### 3.5.2. Caracterización molecular de las cepas mutantes.

Para confirmar que las cepas FGSC #16451 y FGSC# 17985 proporcionadas por el *Fungal Genetics Stock Center* fueran, efectivamente, cepas mutantes del gen correspondiente  $\Delta pir-1$  (NCU04033) y  $\Delta pir-2$  (NCU07569), respectivamente, se realizó una caracterización molecular mediante PCR genómico.

Primero, para confirmar la ausencia de los genes en las cepas *KO* se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos (T4 Oligo, México) con ayuda del software *ApE-A plasmid Editor v2.0.53c* (Wayne, 2018): fPir-1/rPir-1 y fPir2/rPir2, una por cada gen *pir-1* y *pir-2*, respectivamente. Por otra parte, para confirmar la inserción del casete *hph* de forma adecuada para cada una de las cepas mutantes,  $\Delta pir-1$  y  $\Delta pir-2$ , se diseñó el cebador  $\phi 5'hph-flank$  que hibrida con el extremo 5' (forward) del sitio de la inserción de *hph* y uno más que hibrida dentro del gen *hph* ( $\phi hph$ , reverse).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
pTEF-1_NotI_f	5' GCGGCCGCAACTACACTAGTCTAGAGTG 3'	61
PIR-1_BstBI_r	5' AGCTCGTTTCGAATCAGATGAACCGCATG 3'	61
PIR-2_BstBI_r	5' AGCGTTCGAACTAGAACTGGCCATCG 3'	61
GFP_BstBI_r	5' AGCTCGTTTCGAATTACTTGTACAGCTCGTC 3'	60
CPIR1-3	5' ATTGCTTCATTTTGACGGTTGATGTGCTGAC 3'	61
CPIR1-4	5' AACCGTCAAATGAAGCAATATCAGATCCTGACTC 3'	60
CPIR1-5	5' GGTTCGCGATGAACCGCATGCCAC 3'	60
CPIR1-6	5' GGTTTCATCGGCAAACCGATTCCGAAC 3'	60
NPIR1-1	5' TGCTTCATTTTGACGGTTGATGTGCTG 3'	61
NPIR1-2	5' ACCGTCAAATGAAGCAATATCAGATCCTGACTCTTCTT GCCTGCGTGGCCTCGGCGCTGCCAGGGTGTACGG CCGTGAGCAAGGG3'	61

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
<b>NPIR1-3</b>	5'CCCTTGCTCACGGCCGTGACACCCTGGGCAGCGGCCG AGGCCACGCAGGCAAGAAGAGTCAGGATCTGATATTGC TTCATTTTGACGGT3'	61
<b>NPIR1-4</b>	5' GGCCGTGAGCAAGGGCGAGG 3'	60
<b>NPIR1-5</b>	5' GCGATCTTGGTGCTATCCAGGCC 3'	60
<b>NPIR1-6</b>	5' ATAGCACCAAGATCGCCCCGAAG 3'	60
<b>PIR-1 Kex2_r</b>	5' CCTTGCTCACGACCTGCTGTTGTACGG 3'	60
<b>GFPkex2_f</b>	5' GCAGGTCGTGAGCAAGGGCGAG 3'	60
<b>GFP:V5Kex2_r</b>	5' TGGCACTGGCGGGTGCTATCCAG 3'	60
<b>PIR1s/PS+kex2</b>	5' CACCCGCCAGTGCCATGGC 3'	60
<b>PIR1_GPI_r</b>	5' GGTTTGCCGGTGATCACGACGCTGG 3'	60
<b>V5:GFP_GPI_f</b>	5' GTGATCACCGCAAACCGATTCCGAACC 3'	60
<b>CPIR2-1</b>	5' AGACTTCATTTTGACGGTTGATGTGCTG 3'	61
<b>CPIR2-2</b>	5' ACCGTCAAATGAAGTCTTTCACCTTGTCCG 3'	60
<b>CPIR2-3</b>	5' GTTTGCCGAACCTGGCCATCGTTGC 3'	60
<b>CPIR2-4</b>	5' GCCAGTTCGGCAAACCGATTCCGAAC 3'	60
<b>NPIR2-1</b>	5' AGACTTCATTTTGACGGTTGATGTGCTG 3'	60
<b>NPIR2-2</b>	5'ACCGTCAAATGAAGTCTTTCACCTTGTCCGGCGTTCT CGCCGCTCTCACTGCCACCGCTGCCGTCCAGGCCCAGA CCTACACCGTGAGCAA3'	60
<b>NPIR2-3</b>	5'TTGCTCACGGTGTAGGTCTGGGCCTGGACGGCAGCGG TGGCAGTGAGAGCGGCGAGAACGCCGGACAAGGTGAAA GACTTCATTTTGACGGT3'	60
<b>NPIR2-4</b>	5' CCTACACCGTGAGCAAGGGCGAGG 3'	60
<b>NPIR2-5</b>	5' GCCATCTTGGGTGCTATCCAGGCC 3'	60
<b>NPIR2-6</b>	5' GATAGCACCAAGATGGCCCTTTCAACC 3'	60
<b>PIR1Forward</b>	5' GATCCTGACTCTTCTTGCCTGC 3'	59
<b>PIR1Reverse</b>	5' AGATGAACCGCATGCCACC 3'	59
<b>PIR2Forward</b>	5' TCTTTCACCTTGTCCGGCG 3'	59
<b>PIR2Reverse</b>	5' GAACTGGCCATCGTTGCTTTG 3'	58
<b>fHPH</b>	5' CACTGACGGTGTCTGCCATC 3'	59
<b>PIR1-hph-rev</b>	5' CACGCCCCACTTCTTCGG 3'	59
<b>PIR2-hph-rev</b>	5' CCGATCAGGAGACGAAGGCTG 3'	59
<b>F_pGEM</b>	5' GTTTTCCAGTCACGACG 3'	56
<b>R_pGEM</b>	5' CAGGAAACAGCTATGACCATG 3'	56
<b>Uni-BstB1pMF272r</b>	5' TCAGCATCCGTCTTGAGC 3'	54
<b>Uni-Not1pMF272-f</b>	5' GCGAACGAAACCCCTGAAAC 3'	58

### 3.5.3 Construcción de casetes de expresión

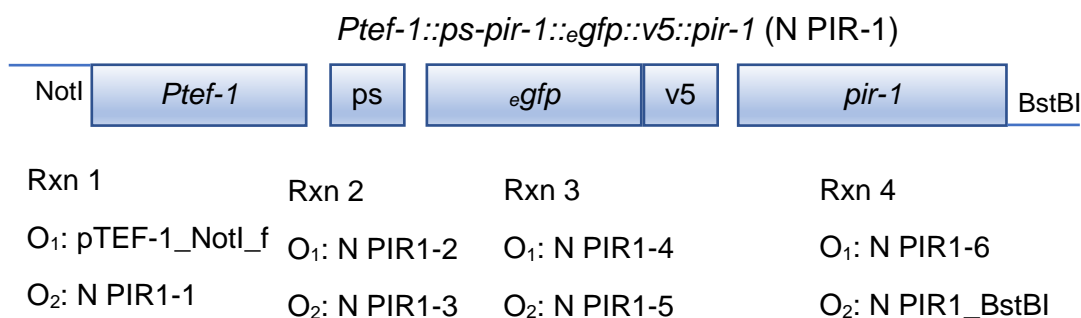
Para generar los casetes de expresión se trabajó con la metodología de ensamblado de Gibson (Gibson et al., 2009). Dicha técnica consiste en dotar de una región de homología a los fragmentos que se desea ensamblar.

Primeramente, se amplificaron y purificaron cada uno de los fragmentos de interés con cebadores especiales para proporcionar una zona de homología con el fragmento adyacente a ellos. En seguida, los fragmentos se ensamblaron en una mezcla de reacción según el protocolo proporcionado por NebBuilder® (New England Biolabs), seguido por una reacción de PCR con los cebadores correspondientes para insertar los sitios de restricción Not I en el extremo 5' del ensamble y BstBI en el 3'. La adición de estos sitios de restricción en los extremos de los ensambles permiten ligarlos con el plásmido pMF272 (Freitag et al., 2004) que dota a cada ensamble de las secuencias que permitirán la recombinación homóloga en el locus *his-3*.

En el siguiente esquema se muestran detalladamente las etapas y estrategias que se llevaron a cabo para la obtención de cada una de las construcciones para la transformación.

#### A. Fusión N-terminal de la proteína verde fluorescente GFP a las proteínas PIR putativas PIR-1 y PIR-2.

1. Paso 1. Cada uno de los fragmentos que componen el ensamble se amplificó por separado con los oligonucleótidos correspondientes (O = Oligonucleótido). Para todos los casos, el péptido señal se sintetizó como un oligómero, a excepción de la construcción N PIR-1\_Kex.



*Ptef-1::ps-pir-2::egfp::v5::pir-2* (N PIR-2)



Rxn 5	Rxn 6	Rxn 7	Rxn 8
O <sub>1</sub> : pTEF-1_NotI_f	O <sub>1</sub> : N PIR1-2	O <sub>1</sub> : N PIR1-4	O <sub>1</sub> : N PIR1-6
O <sub>2</sub> : N PIR1-1	O <sub>2</sub> : N PIR1-3	O <sub>2</sub> : N PIR1-5	O <sub>2</sub> : N PIR1_BstBI

Para el caso de la fusión interna *Ptef-1::pir-1<sub>(1-243)</sub>::egfp::v5::pir-1<sub>(244-1155)</sub>* (N PIR-1\_Kex2) se amplificó la región 5' del gen *pir-1* desde la base 1 hasta la 243, que cubre hasta 3 aminoácidos río abajo del sitio putativo de procesamiento Kex2 en la proteína.



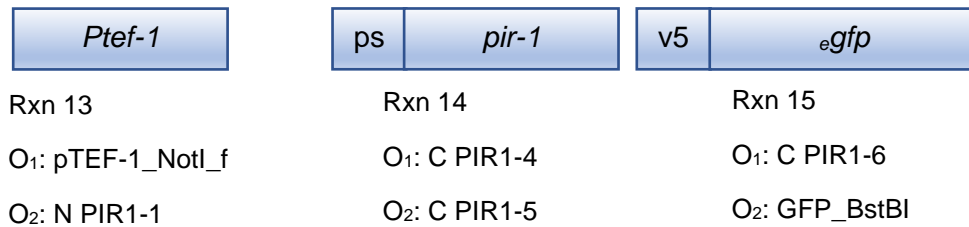
Rxn 9	Rxn 10	Rxn 11	Rxn 12
O <sub>1</sub> : pTEF-1_NotI_f	O <sub>1</sub> : CPIR1-4	O <sub>1</sub> : GFP-Kex	O <sub>1</sub> : PIR1s/Ps+kex
O <sub>2</sub> : N PIR1-1	O <sub>2</sub> : PIR1-Kex	O <sub>2</sub> : GFP:V5kex2	O <sub>2</sub> : PIR1-BstBI

## B. Fusiones C-terminales de la proteína verde fluorescente GFP a las proteínas PIR putativas PIR-1 y PIR-2.

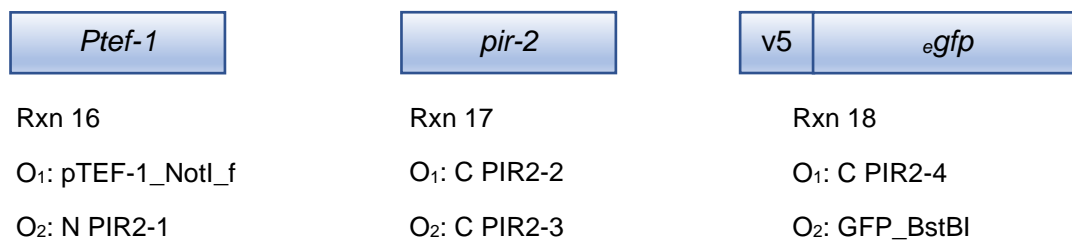
Al igual que en las construcciones N-terminal, en las fusiones C-terminal cada uno de los fragmentos fue amplificado por separado para posteriormente ser ensamblados. Para la proteína Pir1 se diseñó una construcción adicional que llamamos C PIR1 ΔGPI, ya que en una búsqueda previa al diseño in silico, esta proteína dio positivo a la predicción de la señal GPI utilizando el servidor big-PI fungal predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) (Eisenhaber et al., 2004). Sin embargo, utilizando el servidor de predicción PredGPI (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/predgpi/>) (Pierleoni et al., 2008) el resultado fue negativo. Cabe destacar que big-PI fungal predictor utiliza un método especializado en proteínas GPI de hongos mientras que PredGPI es de uso general. Por ello, con

la finalidad de evitar esta posible modificación se construyó el casete C PIR1 ΔGPI donde se utiliza una secuencia trunca de la proteína (aa 1-1027).

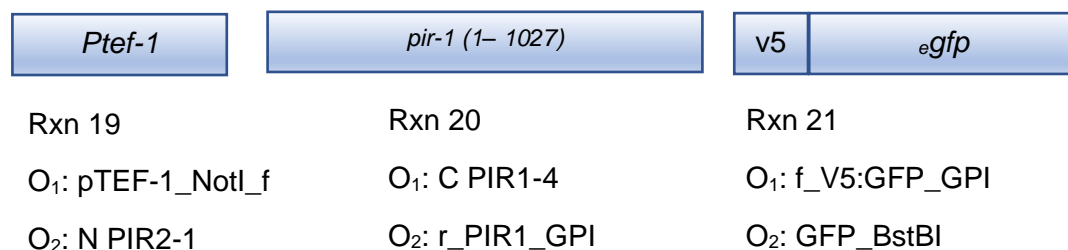
*Ptef-1::pir-1::v5::egfp* (C PIR-1)



*Ptef-1::pir-2::v5::egfp* (C PIR-2)



*Ptef-1::pir-1<sup>(1-1027)</sup>::v5::egfp* (C PIR-1 ΔGPI)



2. Paso 2. Una vez obtenidos los sub-ensambles, se ligaron en el plásmido pGEM T-Easy (Promega), con el que se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 (ThermoFisher). El proceso de ligación en pGEM T-Easy vector se hizo de acuerdo con el protocolo

establecido en el kit: En un tubo de PCR se colocaron 5  $\mu$ L de 2X Rapid ligation buffer, 50 ng del vector pGEM®-T Easy, 150 ng del producto de PCR, 3 unidades de T4 DNA ligase. El volumen final de la reacción se llevó a 10  $\mu$ L. Finalmente, la reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y 16 horas a 4 °C para incrementar la eficiencia. (<https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>).

3. Paso 3. Las células transformantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina y por su capacidad de hidrolizar X-Gal (colonias azules). Adicionalmente, por PCR de colonias se confirmó la presencia o ausencia del inserto de interés. De las colonias positivas se seleccionó una y se cultivó en medio LB líquido suplementado con ampicilina (1mg/mL). Se incubó a 37 °C durante toda una noche (16 horas) a 220 rpm. Posteriormente, se realizó una miniprep para la purificación del plásmido. El producto de la miniprep fue caracterizado por análisis de restricción, BamHI y XbaI para las construcciones N-terminal, BamHI, XbaI y BstBI para las construcciones C-terminales y por secuenciación. Las digestiones se realizaron a 37 °C, 1 hora.
4. Paso 4. El plásmido obtenido por miniprep, para todos los casos, fue digerido con las enzimas NotI y BstBI (Anza, ThermoFisher, Scientific, USA) con el fin de obtener el fragmento de interés. Por otro lado, el plásmido pMF272 también se digirió con las mismas enzimas para que permitiera una sub-clonación dirigida. Para la ligación en pMF272 se utilizó la ligasa T4 (New England, BioLabs inc, USA). Las condiciones de ligación fueron las siguientes: 2 horas a temperatura ambiente y 16 horas a 16°C, más un periodo adicional de inactivación a 65 °C por 10 minutos. La sub-clonación de estos plásmidos se llevó a cabo de la misma manera que como se mencionó anteriormente.

### 3.5.4 Transformación de conidios de *N. crassa*

Para todos los casos se utilizaron las mismas condiciones de transformación. Se tomó una alícuota de conidios ( $1.25 \times 10^8$  conidios) de la cepa FGSC #9717 y se transformaron mediante electroporación con su respectiva construcción (1  $\mu$ g). Posteriormente, la mezcla de los conidios con el DNA se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm y se electroporaron bajo los siguientes parámetros: 1.5kv, 600  $\Omega$  y 25  $\Omega$ . Inmediatamente después del choque eléctrico, las células se resuspendieron en 900  $\mu$ L de sorbitol 1 M. En seguida, el total del volumen se dividió en cuatro alícuotas iguales y se plaquearon en cajas Petri con medio sólido FGS (Fructosa, Glucosa, Sorbosa) (Margolin et al., 1997) y se incubaron a 30 °C durante cinco días. En todos los casos se seleccionó por prototrofia a histidina.

### 3.6 Microscopia

Las transformates protótrofas de *N. crassa* fueron preliminarmente escrutadas para detectar la señal de fluorescencia de GFP en un microscopio confocal vertical Leika TCS SPE RGBV en el Laboratorio de Microscopía Confocal del CIATEJ. Las imágenes fueron adquiridas con el software LAS X y posteriormente analizadas con el software LAS X v3.4.218368. Para mejorar la calidad de las observaciones, se utilizó un microscopio confocal invertido OlympusFluoview FV-1000 en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada-CICESE utilizando la técnica del bloque de agar invertido (Hickey et al., 2002). Las muestras fueron observadas con el objetivo apocromático 60X/1.40 usando aceite de inmersión. Para visualizar la señal de la proteína GFP se utilizó un láser de xenón con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un filtro para la proteína EGFP, la emisión fue en el rango de los 505-605 nm. La captura de las imágenes se realizó con el programa FV-10 ASW 4.1 viewer. La edición de las imágenes se realizó con el software libre ImageJ (Schneider et al., 2012).

## Capítulo 4

### 4. Resultados y discusión

#### 4.1. Clasificación y caracterización de las secuencias de proteínas PIR putativas

Con el fin de determinar la relación filogenética que hay entre las proteínas PIR de *N. crassa* con las de levaduras y las de otros hongos filamentosos, se realizó una búsqueda en la base de datos *Ensembl Genome Fungi* utilizando el HMM (modelo oculto de Markov) del motivo Yeast PIR (PF00399). Además de esta base de datos, también se realizaron búsquedas en las bases de datos Reference Proteomes, UniprotKB, Swiss Prot, Ensembl (all), y Ensembl Genome (all). Se consideraron todas aquellas secuencias con un E-value menor a  $1 \times 10^{-4}$ . En total, se obtuvieron 375 secuencias ya depuradas, todas pertenecientes al reino fungi, específicamente al filo de los Ascomycota, en los tres subfilos (Pezizomicotina, Saccharomicotina y Taphrinomicotina) y distribuidas en seis clases: Saccharomycetes (234), Sordariomycetes (41), Dothideomycetes (46), Eurotiomycetes (39), Leotiomycetes (14), Pezizomycetes (1) (figura 2a). En el subfilo Taphrinomicotina únicamente se predijo la existencia de un solo organismo con una proteína PIR. Este resultado podría deberse a que el número de genomas secuenciados y anotados de microorganismos de este subfilo es muy limitado. A pesar de las reiteradas búsquedas en las diferentes bases de datos, no se logró localizar ninguna secuencia con el motivo Yeast PIR (PF00399) entre basidiomicetos, ni en animales, plantas o procariotes. Con lo que se puede inferir que este motivo es exclusivo de hongos del filo de los Ascomycota, lo que coincide con lo reportado por Ruiz-Herrera (2008). Sin embargo, no todos los organismos de este filo lo tienen. Zhang et al. (2015), demostraron que los dominios CFEM son también dominios exclusivos de los hongos y reportaron que la distribución de los dominios CFEMs en Ascomycota muestran una gran diversidad al igual que los motivos PIR. Por otro lado, Muszewska et al. (2017), habla sobre una familia de serin-proteasas (S64) que son exclusivas para hongos Ascomycotas y Agaricomycotina. El arreglo de la secuencia



de aminoácidos en una proteína puede ir marcando la ruta de evolución de ésta. Abordamos dos posibles situaciones que en términos evolutivos pudieron ocurrir con los motivos PIR dentro del filo de los Ascomycota; 1) los motivos PIR tiene un ancestro común reciente de los Ascomycotas y se perdieron en algunas clases conforme fueron evolucionando; 2) los motivos PIR se generaron en eventos independientes entre las diferentes clases. Cabe destacar que no se observó una correlación aparente entre el número de genes codificantes para proteínas PIR ni del número de motivos respecto al estilo de vida de los diferentes hongos.

Con el fin de identificar sub-grupos funcionales se llevó a cabo un agrupamiento por homología. El programa utilizado para este agrupamiento (MMseqs2) arrojó un total de 17 grupos, de los cuales nueve fueron secuencias únicas y los ocho restantes contenían dos o más secuencias. Las nueve secuencias únicas fueron descartadas para este estudio. La caracterización de los ocho clústeres restantes se realizó mediante una búsqueda adicional de dominios funcionales diferentes a PIR; además, se determinó la presencia de señal GPI (GPI), péptido señal (PS), regiones transmembranales (RTM), dominio de cisteínas asociado a proteínas PIR, sitio de procesamiento Kex2 y composición de aminoácidos. La representación gráfica de la estructura de las secuencias de cada uno de los clústeres generados se puede ver en la figura 2b.

#### 4.1.1 Clúster 1

El clúster 1 es un grupo de secuencias muy reducido, tres en total, todas pertenecientes al género *Aureobasidium* (*A. subglaciale*: AUEXF2481DRAFT\_43981; *A. pollulans*: M438DRAFT\_338067; *A. namibiae*: M436DRAFT\_67802); sin embargo, se considera un grupo interesante ya que cuenta con todas las señales estudiadas: presencia de PS, señal GPI, RTM y 23% de Ser/Thr, a excepción del sitio de corte Kex2 y el dominio de cuatro cisteínas típico de las PIR de levaduras. Los dos motivos PIR encontrados se localizan próximos al extremo C-terminal; en contraposición a la localización característica de los motivos

PIR de las proteínas de *S. cerevisiae* (Ecker et al., 2006; Toh-E et al., 1993), y se encuentran uno seguido del otro separado por una secuencia de ~10 aminoácidos. Actualmente solo hay un reporte en el que se ha predicho la presencia de señal GPI en un grupo de proteínas PIR (Urbar-Ulloa, 2018). Sin embargo, estas proteínas resultarían complicadas de explicar tanto en términos evolutivos como funcionales. La presencia del péptido señal, un 23% de Ser/Thr y la señal GPI sugieren que son proteínas GPI auténticas de acuerdo con los criterios establecidos por De Groot et al., (2003). Aunado a eso, la presencia de motivos PIR refuerza la hipótesis de que éstas son proteínas de pared. Sin embargo, la predicción de un dominio transmembranal sugiere la disposición final de estas proteínas en la membrana plasmática. Se sabe que en levaduras existe una señal intrínseca dentro de la señal GPI que define si una proteína llega a la membrana plasmática o es translocada a la pared celular (de Groot et al., 2003). Por otro lado, se ha visto que la presencia de un dominio rico en ser/thr en la familia de proteínas Iff en *Candida albicans* puede anular la señal de la región proximal del sitio  $\omega$  impidiendo su procesamiento (Boisramé et al., 2011).

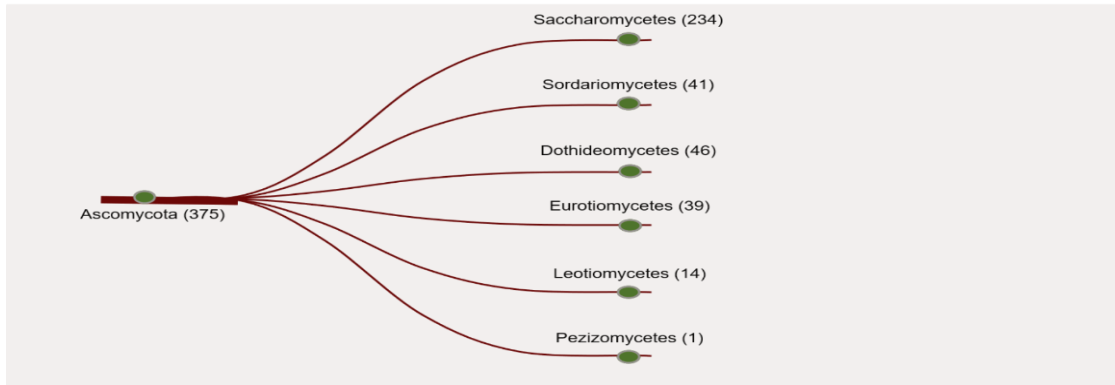
Basado en estas observaciones se podría justificar la conservación de los motivos PIR en estas proteínas, ya que, de ser anulada la señal GPI la proteína podría utilizar los motivos PIR para su unión a la pared celular. Sin embargo, la presencia de un dominio transmembranal en el extremo C-terminal anula la hipótesis anteriormente planteada sugiriendo que, de no ser procesado el GPI, la proteína podría ser anclada a la membrana plasmática eliminando la posibilidad de unión a la pared celular mediante los motivos PIR. Pero en términos evolutivos ¿por qué y para qué una proteína necesitaría tener tantas señales a la vez? Una potencial explicación se podría dar basándonos en las GPI-proteínas llamadas moléculas de adhesión celular (CAMs), específicamente en las NCAM de ratón. Se ha reportado que estas proteínas tienen diferentes mecanismos de anclaje; mediante dominios transmembranales o en forma de GPI-proteínas, incluso se han observado de manera extracelular (Goridis y Wille, 1988). Goridis y Wille (1988) sugieren que la diversidad estructural de estas proteínas provenientes de un solo gen es debido a variaciones post-transcripcionales o *splicing alternativo* brindando así una mejor

respuesta de adaptación de las células, es decir, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre la célula será la versión de la proteína que se sintetizará. La versatilidad de las proteínas en un hongo patógeno es esencial para el proceso de patogénesis. Los diferentes posibles mecanismos de estas proteínas sugieren que podrían ser proteínas importantes relacionadas con el proceso de patogénesis del hongo permitiendo una mejor respuesta y adaptación al contraataque del huésped.

#### 4.1.2 Clúster 2

El clúster 2, al igual que el clúster 1, es un grupo pequeño de proteínas PIR putativas, tres secuencias, que pertenecen a la levadura dimórfica *Candida glabrata* (AO438\_004599, AO443\_004447 y CAGL0M03773g). Este pequeño grupo, a diferencia del clúster 1, no tiene una región transmembranal, pero si cuenta con un péptido señal, una señal GPI y, de igual manera, tampoco presenta un sitio de corte Kex2 ni dominio de cuatro cisteínas. Por otro lado, para este grupo de secuencias se pudo determinar que la composición de Ser/Thr es superior al 30 %, conservándose en su mayoría próxima al extremo N-terminal. Los motivos PIR predichos para estas secuencias fueron dos, distribuidos próximos al extremo C-terminal. La presencia de un alto porcentaje de serina/treonina sugiere que son proteínas que se translocan a la pared, ya que se ha demostrado que repeticiones internas ricas en Ser/Thr son necesarias para la localización de algunas GPI-CWPs en la pared celular (Matthew B. Frieman y Cormack, 2004).

A



B

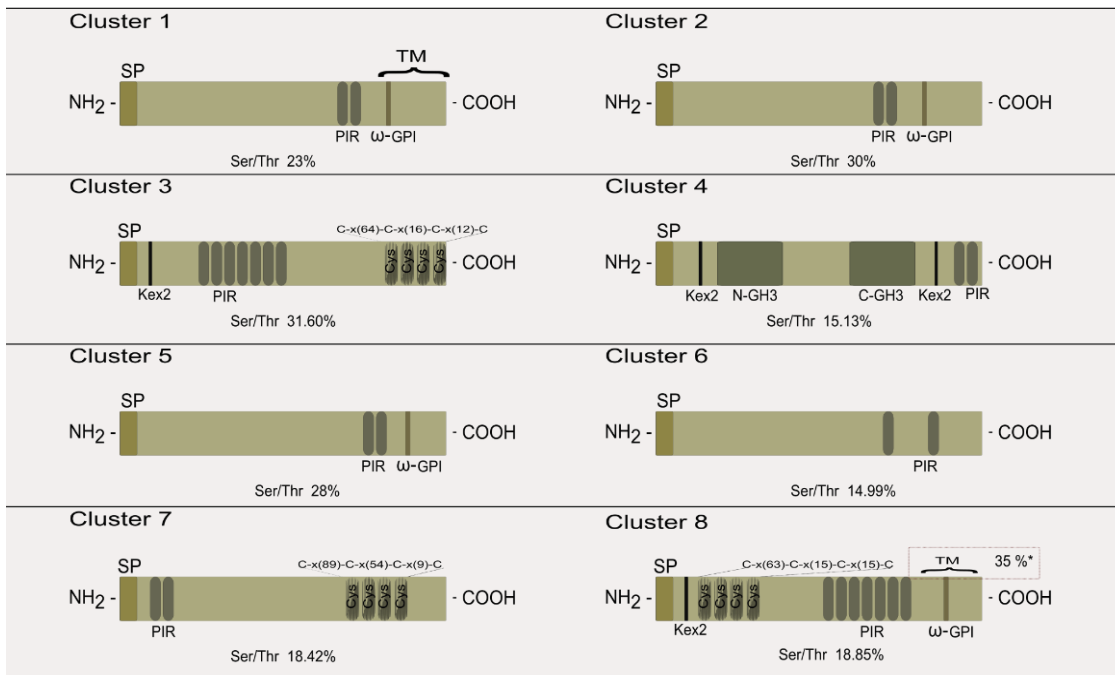


Figura 2 Distribución por clase y homología de las proteínas PIR

A) Distribución de proteínas PIR hipotéticas por clase. B) Representación gráfica de la estructura principal de los diferentes clústeres creados por homología.

#### 4.1.3 Clúster 3

Este clúster es uno de los más grandes de todos los clústeres obtenidos, representa cerca del 63% del total de secuencias analizadas. Se pudo predecir, en la mayoría, la presencia de un péptido señal, seguido por un sitio de procesamiento Kex2, además se detectó una gran variabilidad en el número de motivos PIR entre las diferentes secuencias (desde los 2 a los 10 motivos); todos éstos, próximos al

extremo N-terminal. Además, próximo al extremo C-terminal, se localizó un dominio muy conservado de cuatro cisteínas con la expresión regular C-x(64)-C-x(16)-C-x(12)-C, el cual corresponde a lo ya reportado para las proteínas PIR de la levadura *S. cerevisiae* (Jaafar et al., 2003; Mrsa y Tanner, 1999; Toh-e et al., 1993). Cabe destacar que las cuatro proteínas PIR de *S. cerevisiae* se encuentran en este grupo. Interesantemente, se identificó un posible motivo de función desconocida entre la primer y segunda cisteína del dominio de las cuatro cisteínas, asemejándose a un motivo PIR pero este de forma invertida (Figura 4b), al que llamamos PIR espejo. En este clúster se pueden encontrar PIRs de algunas levaduras de interés como *Pichia kudriavzevii*, *C. glabrata*, *T. delbrueki*, *S. cerevisiae*, *T. phaffii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *N. castellii*, *Z. rouxii*, *L. thermotolerans*, *L. fermentati*, *H. opuntiae*, *H. ovarum*, *L. lansarotensis*, *K. africana*, *C. tenuis*, *C. auris*, *D. seriata*, *N. parvum*, *C. arabinofermentans*, *B. bruxellensis*, *S. boulardii*, *W. ciferri*, *L. mirantina*, *H. osmophila* entre otras. Por otro lado, dentro de este grupo se identificaron 36 secuencias correspondientes a 16 géneros y 21 especies (ver tabla 2), con la presencia de motivos PIR con variaciones desde uno a las 12 repeticiones, distribuidos todos próximos al extremo N-terminal. Además, se cuenta con el dominio de cuatro cisteínas en el extremo C-terminal; sin embargo, son carentes del péptido señal, RTM y señal de GPI. La presencia de estas dos características (motivos PIR y dominio de cisteína) sugieren que es una proteína de pared, pero la ausencia de una señal de secreción no permite predecir si efectivamente es una proteína de pared. Se podría especular que son proteínas que siguen una vía alterna (no convencional) para su translocación en la pared celular. Lopez-Villar et al, (2006) demostraron en una serie de experimentos que una enolasa sin una señal de secreción en el extremo N-terminal puede ser exportada a la pared celular (López-Villar et al., 2006). Por otro lado, se ha demostrado que algunas proteínas de choque térmico en la levadura *C. albicans* pueden llegar a la pared celular sin una señal de secreción convencional (Faria-Oliveira et al., 2015; Miura y Ueda, 2018).

#### 4.1.4 Clúster 4

Las secuencias agrupadas en este clúster fueron consideradas muy peculiares ya que como resultado de la predicción de dominios funcionales con la base de datos de Pfam se predijeron dos dominios (N y C-terminales) asociados a la función glicosil hidrolasa de la familia 3 y un dominio fibronectina tipo III. Además, se predijo la presencia del péptido señal y dos motivos PIR localizados en el extremo C-terminal. Interesantemente, estas secuencias parecen tener dos sitios putativos de procesamiento Kex2, uno posterior al péptido señal y el otro ~104 aminoácidos río arriba del motivo PIR encontrado. Aparentemente, el sitio de procesamiento Kex2 escindiría el motivo PIR impidiendo que la proteína madura tenga un sitio de anclaje a la pared. Por otro lado, se localizaron ocho cisteínas altamente conservados en todas las secuencias con la siguiente expresión regular: C-x(15)-C-x(56)-C-x(32)-C-x(59)-C-x(10)-C-x(178)-C-x(4)-C. El motivo PIR espejo no fue identificado en estas secuencias.

#### 4.1.5 Clúster 5

Es un grupo de 10 secuencias que se caracteriza por la ausencia del dominio de cisteínas. Los motivos PIR varían desde las dos hasta las nueve repeticiones, todas ellas próximas al extremo C-terminal. Además, se detectó la presencia de señal GPI. Este clúster incluye proteínas PIR putativas de levaduras pertenecientes al género *Lachancea* (*L. mirantina*: LAMI\_0G04126G; *L. mayersii*: LAME\_0G16446G; *L. dasiensii*: LADA\_0G10770G; *L. lanzarotensis*: LALA0\_S02e02608g; *L. thermotolerans*: KLTH0D05676g; *L. fermentati*: LAFE\_0F07646G), *Kluyveromyces* (*K. marxianus*: KMAR\_50198), *Hanseniospora* (*H. osmophila*: AWRI3579\_g1373) y *Torulospora* (*T. delbrueckii*: TDEL\_0A02600). En este caso se determinó un 28.82 % de Ser/Thr. A diferencia del clúster 3, y a pesar de ser proteínas PIR putativas de levaduras, este grupo no contiene el dominio de cuatro cisteínas, pero mantienen una señal GPI. Las proteínas PIR de levaduras se caracterizan por tener una serie de motivos PIR repetidos distribuidos en el extremo N-terminal y un dominio de cuatro cisteínas próximos al extremo C-terminal (Jaafar et al., 2003; Toh-e et al.,

1993); sin embargo, atípicamente estas proteínas putativas no cuentan con todas las señales características. Urbar-Ulloa., (2018) reportó el primer grupo de proteínas PIR con señal GPI; sin embargo, su análisis fue limitado a la presencia y ausencia de esta señal. Se ha reportado que estas proteínas (proteína PIR) pueden unirse a la pared celular a través de los motivos PIR o las cisteínas (Ecker et al., 2006; Mrsá et al., 1997). Sin embargo, hasta el momento no se han esclarecido cuáles son los mecanismos por el que una proteína puede unirse a través de uno o el otro sitio de anclaje. Para el caso de este clúster, se podría predecir un escenario más complejo de entender: los sitios de unión PIR se encuentran próximos al extremo C-terminal al igual que la señal GPI; por lo tanto, ¿mediante qué mecanismos podría diferenciar el sitio de anclaje a elegir? ¿Existiría un impedimento estérico que bloquee a uno de los dos mecanismos? De ser así, ¿cuál de los dos prevalecería? Por otro lado, en términos evolutivos, se sabe que las proteínas PIR son ineficientes al momento de ser ancladas a la pared (Sumita et al., 2005) y que estas son sobre-expresadas en periodos de daño de la pared celular en *S. cerevisiae* (Boorsma et al., 2004; Lagorce et al., 2003) por lo que su función es la de proteger a la célula. Entonces, ¿podría ser la señal GPI un mecanismo adaptado para estas proteínas con la finalidad de aumentar su eficiencia al momento de proteger a la célula? En contraste a estas suposiciones, se sabe que las proteínas PIR, en comparación a las GPI-proteínas, éstas se encuentran uniformemente distribuidas a través de la capa interna de polisacáridos de la pared (Kapteyn et al., 1999, 2000), lo que sugeriría que al anclarse mediante GPI perderían la propiedad de su distribución al ser los  $\beta$ -1,6 glucanos el punto de anclaje del GPI, quienes se encuentran en menor proporción respecto a los  $\beta$ -1,3 glucanos (polisacáridos de unión de los dominios PIR).

#### 4.1.6 Clúster 6

El clúster 6 es solo la colección de dos secuencias de aminoácidos, ambas pertenecen a especies del género *Neurospora* (*N. crassa*: NCU 07569 (PIR-2); y *N. tetrasperma*). Estas proteínas hipotéticas únicamente dieron positivo para el péptido señal y motivos PIR, que se encuentran localizados próximos al extremo C-terminal.

Estos resultados concuerdan con lo ya reportado por De Groot et al., (2005) donde menciona la distribución atípica de la estructura secundaria de las proteínas PIR de *N. crassa*, *Gibberella zeae* y *Magnaporthe grisea*.

#### 4.1.7 Clúster 7

Es un grupo reducido de tres secuencias, dos de ellas (AUEXF2481DRAFT\_42647 y M436DRAFT\_57116) pertenecientes a especies del género *Aureobasidium* y una más (LY89DRAFT\_743396) al género *Phialocephala* (*P. scopiformis*). Se predice la presencia de un péptido señal y un dominio conservado de cuatro cisteínas con la expresión regular C-x(89)-C-x(54)-C-x(9)-C. Curiosamente, estas cuatro cisteínas se encuentran localizadas más al centro de la secuencia de aminoácidos comprendida entre el aminoácido 306 y 450. Algo que resulta interesante es que para estas secuencias tampoco se encuentra presente el motivo PIR espejo. Por lo que se podría sugerir que estas cisteínas no están asociadas a mecanismos de unión a pared; sin embargo, se requiere de más evidencia que sustente nuestra hipótesis. Se discutirá la relación de lo que llamamos PIR espejo con las cisteínas involucradas a la unión de pared en el apartado 4.3.



Tabla 4. Especies con proteínas PIR hipotéticas para estudio de vías de secreción alterna.

	Gen ID	Dominio de 4 cisteínas	PIR espejo	Motivos PIR	Kex2
<i>Acidomyces richmondensis</i>	M433DRAFT_151342	Sí	Sí	2	No
<i>Babjeviella inositolovora</i>	ODQ81314	Sí	Sí	8	No
<i>Candida tenuis</i>	CANTEDRAFT_129279	Sí	Sí	8	N y C
<i>Exophiala aquamarina</i>	A109_08375	Sí	Sí	1	No
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	Ecym_5166	Sí	Sí	7	N
<i>Eremothecium sinecaudum</i>	AW171_hschr42265	Sí	Sí	5	N
<i>Hyphopichia burtonii</i>	HYPBUDRAFT_158135	Sí	Sí	6	N y C
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	HANVADRAFT_94861	Sí	Sí	7	No
<i>Kazachstania naganishii</i>	KNAG_0C01100	Sí	Sí	10	N y C
<i>Kazachstania naganishii</i>	KNAG_0C02460	Sí	Sí	9	N
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	PGUG_01804	Sí	Sí	5	N
<i>Naumovozya castellii</i>	NCAS_0B08250	Sí	Sí	7	N
<i>Naumovozya dairenensis</i>	NDAI_0B00190	Sí	Sí	12	N
<i>Naumovozya dairenensis</i>	NDAI_0A01000	Sí	Sí	9	N
<i>Ogataea parapolyomorpha</i>	HPODL_00828	Sí	Sí	8	N
<i>Pichia kudriavzevii</i>	JL09_g2880	Sí	Sí	7	N
<i>Pichia kudriavzevii</i>	JL09_g1786	Sí	Sí	5	No
<i>Pichia kudriavzevii</i>	BOH78_4642	Sí	Sí	6	N
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	DI49_3217	Sí	Sí	8	N
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	DI49_3218	Sí	Sí	12	N y C
<i>Tetrapisispora blattae</i>	TBLA_0F00670	Sí	Sí	6	N
<i>Tetrapisispora blattae</i>	TBLA_0A00870	Sí	Sí	4	N
<i>Tetrapisispora blattae</i>	TBLA_0H03100	Sí	Sí	4	N
<i>Tetrapisispora blattae</i>	TBLA_0A01190	Sí	Sí	2	N
<i>Tetrapisispora blattae</i>	TBLA_0H03080	Sí	Sí	3	N
<i>Tetrapisispora blattae</i>	TBLA_0A04270	Sí	Sí	7	N
<i>Tetrapisispora blattae</i>	TBLA_0C05850	Sí	Sí	8	N y C
<i>Tetrapisispora phaffii</i>	TPHA_0E03270	Sí	Sí	5	N
<i>Tetrapisispora phaffii</i>	TPHA_0A02840	Sí	Sí	3	N
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	Kpol_2001p21	Sí	Sí	3	N
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ZBAI_03261	Sí	Sí	9	N
<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	BZL39_I03140	Sí	Sí	11	N
<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	BZL39_O03110	Sí	Sí	9	N
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ZYGR_0BB00100	Sí	Sí	3	No
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ZYRO0G18304g	Sí	Sí	7	N
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ZYGR_0AD05320	Sí	Sí	9	N y C

No, sin presencia de señal para procesamiento por Kex2; N, presencia de señal de procesamiento por Kex2 en el extremo N terminal; C, presencia de señal de procesamiento por Kex2 en el extremo C terminal.

#### 4.1.8 Clúster 8

El clúster 8 es el segundo grupo más grande con 103 secuencias en total. Para el total de las proteínas se predijo la presencia de la señal GPI en el *servidor big-PI fungal predictor*; sin embargo, en PredGPI cinco de ellas no fueron positivas para esta señal, entre ellas la proteína hipotética PIR1 de *N. crassa* (NCU04033). Cerca del 35% de las secuencias que conforman a este clúster se predice al menos una región transmembranal y en su totalidad comparten un dominio conservado de cuatro cisteínas con la expresión regular C-x(63)-C-x(15)-C-x(15)-C en el extremo N-terminal lo que coincide con lo ya reportado por De Groot et al., (2005) para algunos hongos filamentosos (*N. crassa*, *B. graminis*, *G. zeae* y *M. grisea*). El motivo PIR espejo se encontró presente en todas las secuencias, localizado entre la cisteína uno y dos. Estudios anteriores habían reportado el extremo C-terminal de las proteínas PIR de levaduras como altamente conservado (De Groot et al., 2005; Weig et al., 2004a), en el presente trabajo incrementamos el número de especies de hongos filamentosos. Es importante recalcar que este dominio de cisteínas se encuentra próximo al extremo N-terminal, cosa contraria al clúster 3. Cabe destacar que, en su mayoría, los organismos presentes en este clúster pertenecen a la clase de los *Sordariomycetes*; *C. militaris* (CCM\_02893), *V. gallapava* (PV09\_00679), *N. crassa* (NCU04033:Pir1), *M. brunneum* (MBR\_02265), entre otras; *Dothidiomycetes*: *B. zeicola* (COCCADRAFT\_41310), *B. oryzae* (COCMIDRAFT\_49634) y, en menor proporción, se encuentran organismos de la clase *Leotiomycetes*: *B. graminis* (CCU795989), *O. maius*, y *Ascomycetes*: *E. necátor* (EV44\_g0408). Los motivos PIR varían en el número de repeticiones desde los dos hasta los 12 distribuidos próximos al extremo C-terminal. El sitio de procesamiento Kex2 se hace presente en la mayoría de las secuencias y próximo al extremo N-terminal. La caracterización de cada uno de los clústeres nos alienta a asumir que la familia de proteínas PIR es una familia de proteínas muy diversa con variaciones en estructura.

## 4.2. Relación filogenética entre las proteínas PIR de *N. crassa* con las de levaduras y otros hongos filamentosos.

Una vez obtenidos los clústeres y caracterizado cada uno de ellos, la segunda pregunta fue ¿cuál es la relación filogenética que existe entre cada uno de los ocho clústeres obtenidos? Una segunda pregunta que nos dimos a la tarea de contestar fue, ¿qué tan distantes son nuestras proteínas de estudio (NCU07569 y NCU04033) respecto a las proteínas PIR de *S. cerevisiae*? ¿Confieren alguna ventaja competitiva a estos hongos respecto a aquellos que no las tienen?

En el análisis filogenético se obtuvieron dos clados principales (Ver figura 3). En el clado A, se encuentran distribuidos siete de los ocho clústeres analizados (1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8), mientras que en el clado B se encuentra solo el clúster 3 que en su mayoría pertenece solo a levaduras del orden de los *Saccharomycetes*. Con esto, nos dimos cuenta de que las proteínas PIR hipotéticas de *N. crassa* (NCU04033 y NCU07569), en términos filogenéticos, están muy distantes entre sí, pero mucho más distantes de las proteínas PIR de *S. cerevisiae*.

## 4.3 PIR espejo asociado al dominio de cisteínas

Con el fin de entender más a fondo qué es lo que sucedía a nivel de secuencia entre los diferentes clústeres se llevó a cabo un alineamiento entre el total de las secuencias. El clúster 3 y 8 son los clústeres más grandes y representativos del total de las secuencias. Como resultado de este estudio se encontró que el extremo C-terminal del clúster 3 se alineaba con el extremo N-terminal del clúster 8 y que el dominio de las cuatro cisteínas se encuentra parcialmente conservado para todas las secuencias (Ver figura 4a). No obstante, la región entre la cisteína uno y la cisteína dos se encontró que está altamente conservada y corresponde a lo que hemos llamado PIR espejo. Para conocer de manera más certera esta región conservada, se construyó un perfil HMM. En la figura 4b se puede observar la representación gráfica del perfil HMM creado.

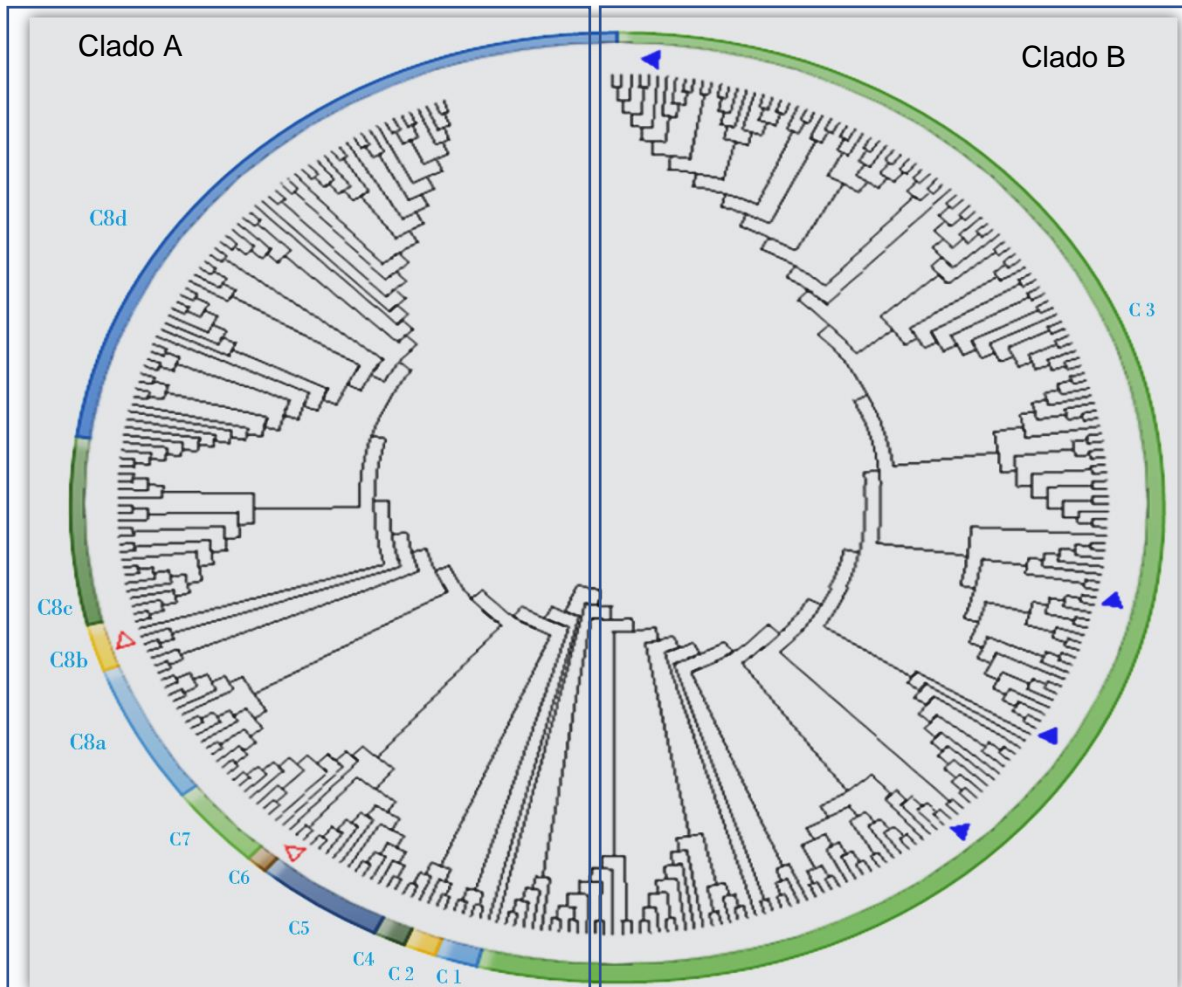


Figura 3 Reconstrucción filogenética del total de secuencias de proteínas PIR putativas. Los triángulos azules localizan a las proteínas PIR de *S. cerevisiae*. Los triángulos rojos localizan a las proteínas PIR de *N. crassa*. La letra c representa a cada clúster generado por agrupación por homología y su número respectivo.

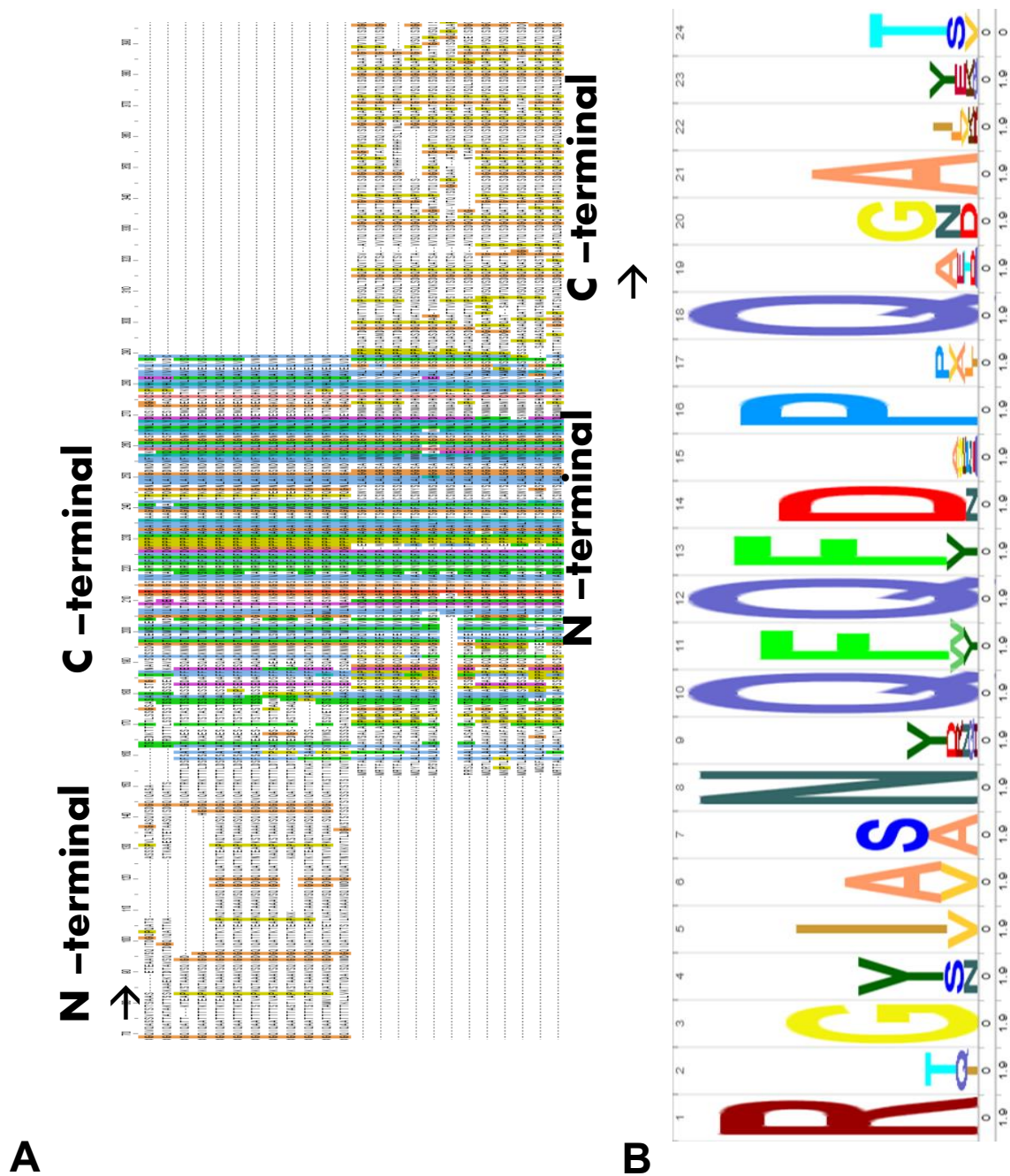


Figura 4 Las proteínas PIR de hongos con dominio de cisteínas asociado a la pared celular tienen un motivo PIR invertido. A) Alineamiento mostrando la región más conservada entre las secuencias del clúster 3 y clúster 8 correspondientes al dominio de cisteínas. B) Logo del perfil HMM representando los aminoácidos más conservados entre la cisteína uno y dos del dominio.

Partiendo de la premisa de que si existe una región muy conservada dentro de una secuencia esta podría tener cierto valor a nivel de la funcionalidad de la proteína, se utilizó este nuevo perfil HMM para realizar una búsqueda en las bases de datos anteriormente mencionadas. De manera interesante, cerca de 900 secuencias fueron localizadas, de las cuales alrededor de 300 no contienen el motivo PIR de levaduras y muchas de ellas han sido anotadas por medios bioinformáticos como proteínas potencialmente constituyentes de la pared. Debido a estos datos preliminares planteamos la hipótesis de que este motivo PIR espejo está asociado al dominio de cisteínas que interactúan con la pared celular.

#### 4.4. Evaluación del compromiso funcional de las proteínas PIR-1 (NCU\_04033) y PIR-2 (NCU\_07569) de *N. crassa*.

Se evaluaron dos cepas *knock-out* proporcionadas por el *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, por sus siglas en inglés),  $\Delta pir-1$  (FGSC 16451) y  $\Delta pir-2$  (FGSC 17985). Esto se llevó a cabo con la finalidad de saber qué sucedería a nivel celular si la proteína ancla queda completamente inhabilitada debido a la proteína pasajero. Como referencia para este estudio se utilizó la cepa silvestre (WT) (FGSC 9103).

La caracterización molecular mediante PCR genómico confirmó la delección del gen *pir-1* (FGSC# 16451) y *pir-2* (FGSC# 17985) (Ver materiales y métodos). Esta caracterización molecular se consideró necesaria ya que es importante confirmar que las cepas que se están evaluando sean auténticas. En la figura 5a, el carril 1 y 2 corresponden al producto de PCR para el gen *pir1* (1114 pb) y *pir2* (1178 pb), respectivamente, presentes en la cepa WT. Los carriles 3 y 4 corresponden a la cepa  $\Delta pir-1$ ; en el carril 3 no se observa amplificación, lo que confirma la ausencia del gen que codifica para PIR-1; por otro lado, la banda en el carril 4 confirma la presencia del gen que codifica para la proteína PIR-2 en esta misma cepa. El carril cinco y seis corresponde a la cepa  $\Delta pir2$ , en donde se confirma la ausencia del gen

*pir2* y la presencia del gen *pir1*. Para todos los casos se utilizó el promotor *Pccg-1* como control de carga (Ver figura 5a).

Por otro lado, una vez confirmada la ausencia de estos genes en las cepas correspondientes, se continuó con la confirmación de la inserción del casete de eliminación que incluye un gen para resistencia a higromicina, *hph*, para ello se generaron un par de cebadores, uno de ellos (fwd) hibrida en el flanco del sitio de inserción y otro (rev) hibrida al centro del gen *hph*. Para ambos casos se confirmó la inserción del casete (Ver figura 5b).

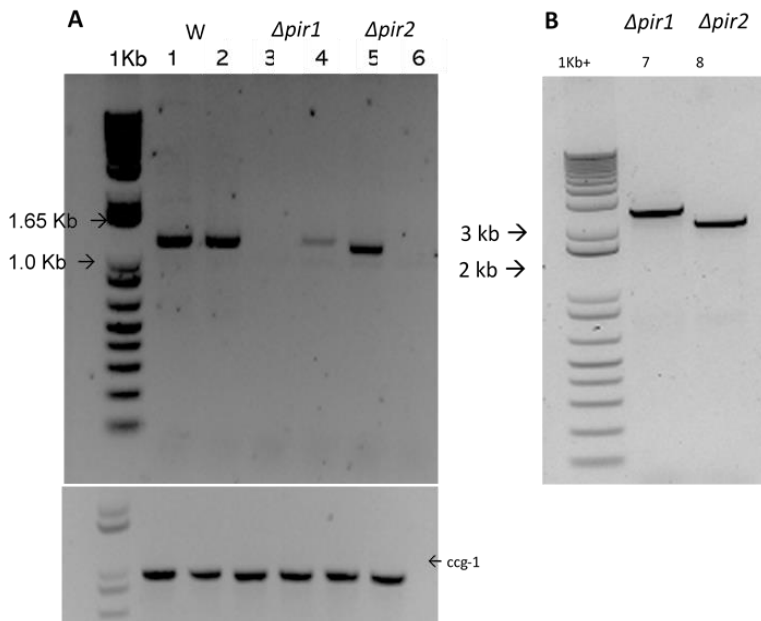


Figura 5. Caracterización molecular de las cepas mutantes y cepa silvestre.

**A)** Carriles 1-2: producto de PCR de *pir-1* y *pir-2*, respectivamente, a partir de ADN genómico de *N. crassa* WT (FGSC #1901); carriles 3-4: producto de PCR de *pir-1* y *pir-2*, respectivamente, a partir de ADN genómico de *N. crassa*  $\Delta$ *pir-1* (FGSC #16451); carriles 5-6: producto de PCR de *pir-1* y *pir-2*, respectivamente, a partir de ADN genómico de *N. crassa*  $\Delta$ *pir-2* (FGSC #17985). Como control de carga se amplificó el promotor *ccg-1* de ADN genómico para todos los casos. **B)** Carril 7-8, producto de PCR para la confirmación de la inserción del gen *hph* en la construcción de las cepas *knock-out* para *pir-1* (FGSC #16451) y *pir-2* (FGSC #17985).

#### 4.4.1 Análisis fenotípico de la cepa *Δpir-1* y *Δpir-2* muestran mayor velocidad de crecimiento que la cepa silvestre.

Con el fin de explorar la función de las proteínas PIR de *N. crassa*, se evaluaron fenotípicamente las cepas *knock-out* (KO), *Δpir-1* (FGSC# 16451) y *Δpir-2* (FGSC# 17985). A nivel de colonia, se pudo apreciar que no hay diferencias entre las cepas (WT, *Δpir-1*, *Δpir-2*), tanto en la morfología de la hifa como en el patrón de ramificación, que fueron, en su mayoría, dicotómicas (Ver figura 6a, b, c, d, e y f). Inesperadamente, la velocidad de crecimiento fue mayor en ambas cepas KO (*Δpir-1*:  $0.288 \pm 0.06$  mm/h; *Δpir-2*:  $0.27 \pm 0.06$  mm/h) que en la cepa silvestre, FGSC# 1901 ( $0.238 \pm 0.06$  mm/h) (Ver tabla 4). El análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre las cepas KO y la WT (Ver figura 6h). Por otro lado, los patrones de ramificación no mostraron diferencias significativas entre *Δpir-1* y la cepa WT ( $2.33 \pm 0.84$  br/500  $\mu$ m;  $3.06 \pm 0.73$  br/500  $\mu$ m, respectivamente). Sin embargo, la cepa *Δpir-2* muestra una frecuencia de ramificación significativamente mayor ( $3.70 \pm 0.98$  br/500  $\mu$ m) que el de las otras dos cepas (Ver figura 6i).

Hasta el día de hoy no se habían estudiado las proteínas PIR en hongos filamentosos. Sin embargo, en lavaduras se ha visto que están directamente relacionadas con la pared y fungen como accesorio de protección. Además, brindan estabilidad a la pared celular, por ejemplo, se sabe que estos genes son inducibles por calor (sensibles a choque térmico) (De Groot et al., 2005; Toh-e et al., 1993) o que están involucrados en respuesta a estrés por presión osmótica (Jaafar et al., 2003; Kapteyn et al., 1999; Martínez et al., 2004; Mrsa y Tanner, 1999; Weig et al., 2004a). También pueden determinar la resistencia a osmotina, una proteína antifúngica de plantas (Yun et al., 1997). Con base en los resultados obtenidos se podría sugerir que, al estar estas proteínas relacionadas con la rigidez de la pared (Castillo et al., 2003; Ecker et al., 2006), su ausencia permite una mayor flexibilidad a la misma y, por consecuencia, una velocidad de crecimiento mayor que la de la cepa WT.

Por otro lado, en aplicaciones biotecnológicas se sabe que la secreción de proteínas en hongos filamentosos sucede en la punta (Wosten et al., 2009), lo que en términos



de expresión y secreción de proteínas se podría esperar que las cepas con fondo genético  $\Delta pir-2$  pueda ser un buen candidato para la expresión heteróloga de proteínas. He et al. (2016) demostraron que no necesariamente debe haber mayor producción de biomasa acompañada de hiperramificación para que ocurra una sobreproducción de enzimas. En su trabajo comparan dos cepas que se sabe que son productoras de enzimas (RUT C30 y DES-15), pero una de ellas tiene un patrón de ramificación magnificado (DES-15) y durante la comparación de la producción de biomasa observaron que a pesar de que RUT C30 producía más, DES-15 tenía una mayor actividad enzimática en el medio.

Tabla 4 Caracterización fenotípica de las cepas *knock-out*

Cepa	Vel. de crecimiento (cm/h)	Frecuencia de ramificación (#ramas/500 $\mu$ m)
WT (1901)	0.238 $\pm$ 0.06	3.06 $\pm$ 0.73
$\Delta pir-1$ (16451)	0.288 $\pm$ 0.07	2.33 $\pm$ 0.84
$\Delta pir-2$ (17985)	0.27 $\pm$ 0.06	3.70 $\pm$ 0.98

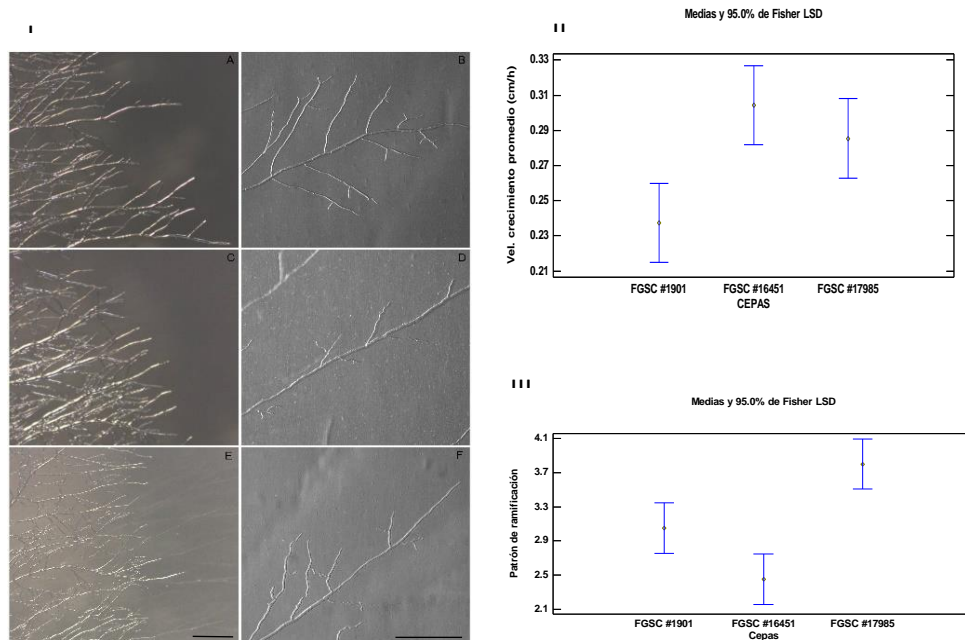


Figura 6) Comparación de los patrones de ramificación de las cepas mutantes  $\Delta pir-1$  y  $\Delta pir-2$  y WT. I (a-b) *N. crassa* WT (FGSC #1901; c-d); *N. crassa* FGSC 16451( $\Delta pir-1$ ); e-f); *N. crassa* FGSC #17985 ( $\Delta pir-2$ ). II). Prueba ANOVA para las frecuencias de ramificación de las cepas: WT,  $\Delta pir-1$  y  $\Delta pir-2$ . III) Prueba ANOVA para la frecuencia de ramificación de las cepas en estudio.

Con base en estos resultados, ahora la pregunta obligada era ¿de qué manera la delección de una de las dos proteínas PIR afecta a la pared celular a tal grado que permite un mayor crecimiento? Para ello, con el fin de saber si estas delecciones ocasionaban una alteración a nivel estructural se llevó a cabo un ensayo con *Calcofluor White* (CFW) esperando exacerbar cualquier posible daño a nivel de pared y confirmar si las delecciones afectan su integridad. Esta molécula interfiere con la biosíntesis y construcción de la pared celular, uniéndose a las cadenas de quitina en síntesis y por lo tanto inhibiendo el ensamblado enzimático que une la quitina a los  $\beta$ -1,3-glucanos y  $\beta$ -1,6-glucanos (Ram y Klis, 2006; Roncero y Duran, 1985; Yin et al., 2005).

Como resultado de este experimento encontramos que la concentración mínima inhibitoria de CFW para la cepa WT era de 1 mg/mL, mientras que para ambas cepas mutantes (KO) fueron inhibidas a una concentración de 0.75 mg/mL (Ver figura 7). La inestabilidad de la pared celular ante CFW u otros agentes estresores ya se ha reportado en una serie de trabajos. Se ha observado que en *S. cerevisiae* la disrupción de genes de la familia *PIR* resulta en un incremento de la sensibilidad a algunos agentes químicos o estresores físicos (Hsu et al., 2015; Mrsa y Tanner, 1999; Sumita et al., 2005; Toh-e et al., 1993). Hsu et al., (2015) reportó que la delección del gen *hsp150p/pir2p* en *S. cerevisiae* generó un incremento en la sensibilidad a CFW y Rojo Congo (CR) y, a su vez, la sobre-expresión de este mismo gen ocasionó un aumento en la resistencia a estos mismos agentes estresores. De igual manera, Toh-e et al., reportó que, si bien, sólo la ausencia de la proteína HSP150/PIR2 no generó sensibilidad en las células al choque térmico, una doble *knock-out* (*pir1* y *pir2*) presentó un fenotipo sensible al mismo. Dicho comportamiento lo relacionan con un efecto compensatorio por el resto de las proteínas de la familia PIR. Y sugieren el efecto que estas proteínas tienen en el mantenimiento de la integridad y viabilidad de la célula.

El patrón de comportamiento similar del fenotipo de las cepas mutantes de *N. crassa* al de *S. cerevisiae* en relación con la inhibición del crecimiento por CFW, sugieren que tanto PIR-1 como PIR-2 juegan un papel importante en la integridad de la pared

celular. Para entender aún mejor la función de estas proteínas en la pared celular se recomienda hacer un estudio de sensibilidad con las proteínas sobre expresadas esperando observar una mayor resistencia a agentes estresores.

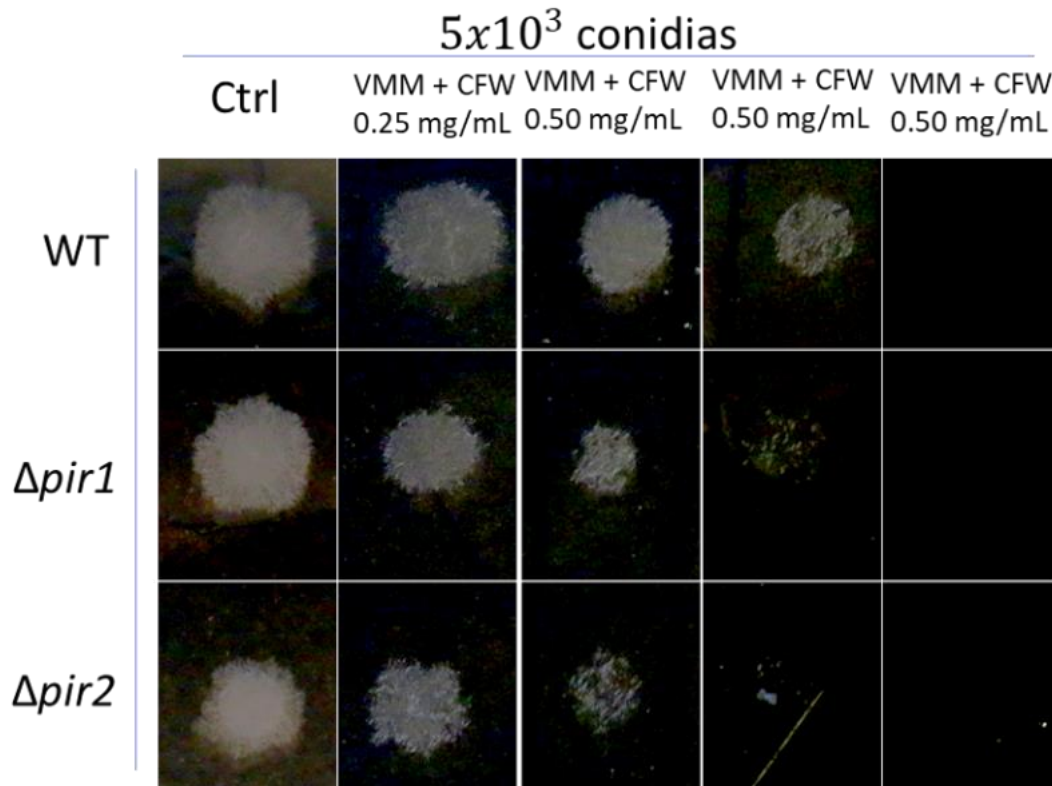


Figura 7 Ensayo de susceptibilidad de la pared celular de *N. crassa* a CFW. 5x  
 $10^3$  conidias fueron inoculados en cajas con medio mínimo de Vogel (pH 7). Se evaluaron cuatro concentraciones de CFW, iniciando en 0.25 mg/mL hasta 1mg/mL con incrementos de 0.25mg/mL.

#### 4.5. Construcción de cepas transgénicas que expresen la proteína verde fluorescente unidas a las proteínas PIR-1 (NCU 04033) y PIR-2 (NCU 07569)

Con la finalidad de conocer la localización de las dos proteínas PIR putativas de *N. crassa* se fusionó co-traduccionalmente la proteína verde fluorescente (GFP) a las proteínas de interés. Además, con la finalidad de probar la eficiencia de anclaje de los diferentes mecanismos de unión de las proteínas PIR-1 y PIR-2 y su potencial uso como anclas moleculares para el despliegue de proteínas en la superficie

celular de *N. crassa*, se realizaron fusiones en posición N- y C-terminales para las dos proteínas. Adicional a esto, en el caso de la proteína PIR-1, para la que se ha predicho la presencia de un sitio de corte para la proteasa Kex2 seis aminoácidos río arriba de la primera cisteína del dominio conservado de las cuatro cisteínas y una señal GPI en el extremo C-terminal, el gen de la proteína GFP se colocó en una posición interna, entre el aminoácido 243 y 244 para la fusión N-terminal, tres aminoácidos después del sitio Kex2. Para la fusión carboxilo terminal de la proteína GFP a la proteína PIR-1 se deletó el potencial propéptido con la señal GPI (aa 1028-1155).

En total, se obtuvieron seis construcciones que fueron clonadas en pMF272, ya que permite dirigir el inserto de interés al locus del gen para la biosíntesis de histidina (*his-3*) y posteriormente transformadas en la cepa FGSC 9717 cuya cepa tiene una mutación en *his-3* que la hace auxótrofa a histidina. pMF272 a su vez, funciona como un marcador de selección ya que revierte la prototrofia y permite seleccionar las colonias transformantes (Margolin et al., 1997), obteniendo los plásmidos pMF272-N PIR-1, pMF272-N PIR-1 Kex, pMF272-C PIR-1, pMF272-C PIR-1  $\Delta$ GPI, pMF272:N PIR-2 y pMF272:C PIR-2. Cada construcción fue verificada por digestión y secuenciadas parcialmente para confirmar la inserción correcta de los casetes.

#### 4.5.1 Construcciones de vectores recombinantes para el etiquetado de la proteína PIR1

Para determinar la localización celular de la proteína PIR-1 en *N. crassa*, ésta se etiquetó con la proteína verde fluorescente (GFP). La fusión se realizó co-traduccionalmente. Con el fin de evaluar la eficiencia de anclaje a través de los diferentes mecanismos de unión a la pared de esta proteína (motivos PIR, dominio de cisteína y potencialmente GPI) se realizó un etiquetado tanto N como C-terminal. Se realizaron dos etiquetados en el extremo N-terminal; 1) tres aminoácidos posteriores al sitio de reconocimiento de la proteasa Kex2 para evitar que, durante el procesamiento, la proteína pasajero fuera escindida y perder el marcaje; 2) con la finalidad de cuantificar la eficiencia del procesamiento del propéptido Kex en esta proteína en *N. crassa* (*NcPIR1*), se etiquetó con GFP inmediatamente después de

la señal de secreción. En cuanto al etiquetado C-terminal, se realizaron dos marcajes: 1) tres aminoácidos río arriba del sitio  $\omega$ , deletando la señal GPI para impedir que ocurra el debido procesamiento e inhabilite a la proteína pasajero, permitiendo así evaluar la eficiencia de anclaje a través del dominio de cisteínas en el extremo N-terminal; 2) para confirmar si el procesamiento postraduccional para la adición del ancla GPI ocurre o no en esta proteína, se fusionó la proteína GFP en el extremo C-terminal de manera canónica (eliminando únicamente el codón de paro).

Para la construcción del plásmido pMF272:N PIR-1, pMF272:N PIR-1 Kex, pMF272:C PIR-1 y pMF272:C PIR-1 $\Delta$ GPI, primeramente se obtuvo el subensamble *Ptef-1::ps-pir-1::gfp::v5::pir-1*, *Ptef-1::pir-1<sub>(1-243)</sub>::gfp::v5::pir-1<sub>(244-1113)</sub>*, *Ptef-1::pir-1::v5::gfp*, *Ptef-1::pir-1<sub>(1-1027)</sub>::v5::gfp* para cada uno de los plásmidos, respectivamente. En todos los casos se les añadieron sitios de corte para las enzimas NotI y BstBI en el extremo 5' y 3', respectivamente. Posteriormente, los ensamblajes fueron clonados en el vector pGEM T-easy (para la estrategia de construcción ver materiales y métodos), por lo que se obtuvieron los plásmidos pGEM:NPIR-1, pGEM:NPIR-1 Kex, pGEM:CPIR-1 y pGEM:CPIR-1 $\Delta$ GPI (ver figura 9). La confirmación de las construcciones se realizó por patrones de restricción; pGEM:NPIR-1, pGEM:CPIR-1 y pGEM:NPIR-1 Kex se caracterizaron con las enzimas NotI y BstBI (ver figura 8 A). El plásmido pGEM:CPIR-1 $\Delta$  fue caracterizado con las enzimas BamHI y DraI (ver figura 8 B). Con la finalidad de detectar alguna posible mutación durante la construcción de los plásmidos, todos fueron caracterizados por secuenciación. Como resultado, se confirmaron los ensamblajes y la ausencia de mutaciones que comprometan la funcionalidad del casete de expresión.

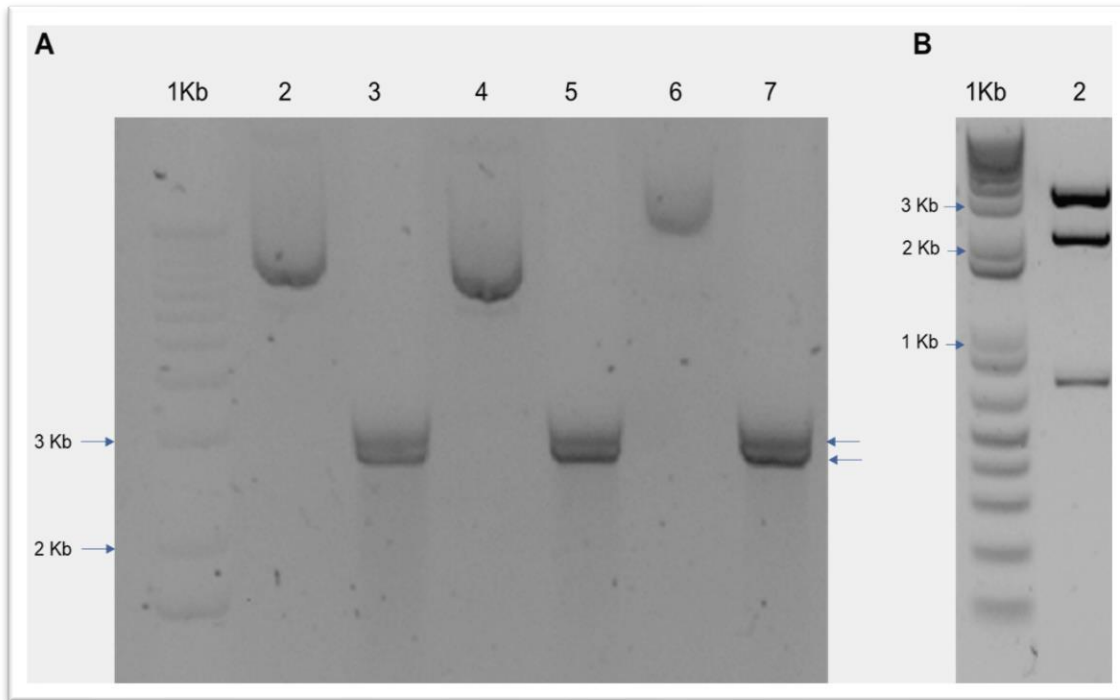


Figura 8 . Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pGEM:NPIR-1, pGEM:NPIR-1 Kex, pGEM:CPIR-1 y pGEM:CPIR-1ΔGPI. A) Carril 1, marcador de peso molecular, carril 2, 4 y 6, plásmidos sin digerir (pGEM:NPIR-1, pGEM:NPIR-1 Kex, pGEM:CPIR-1, respectivamente). Carril 3, 5 y 7, plásmidos digeridos con las enzimas NotI y BstBI (pGEM:NPIR-1 (3) y pGEM:CPIR-1 (5): 3015 pb y 2800 pb; pGEM:NPIR-1 Kex (7): 2813 pb y 2792 pb). B) Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, pGEM:CPIR1-ΔGPI digerido con las enzimas Dra I y BamHI (2903 pb, 2064 pb, 692 pb y 19 pb).

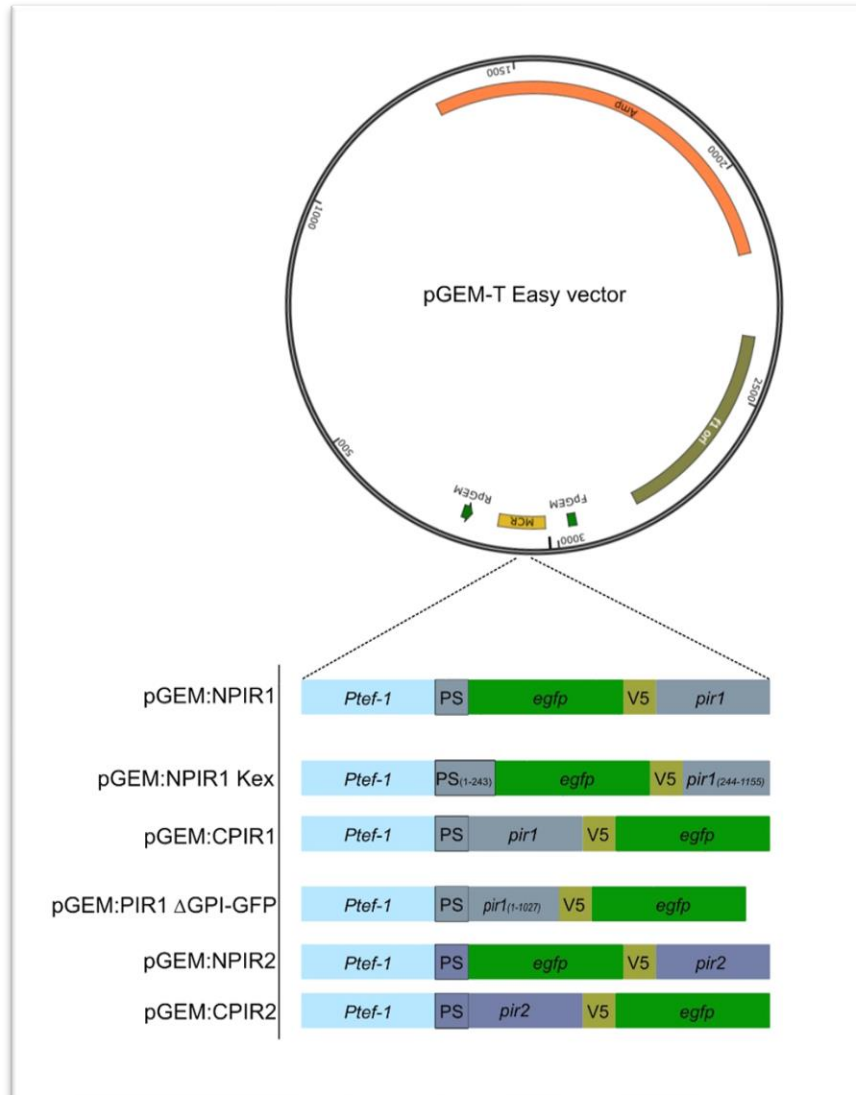


Figura 9 Representación gráfica de los casetes de expresión insertados el plásmido pGEM. A) pGEM:NPIR-1; B) pGEM:NPIR-1 Kex; C) pGEM:CPIR-1; D) pGEM:CPIR-1ΔGPI.

Una vez obtenidas todas las construcciones clonadas en pGEM T-Easy se realizó una sub-clonación en pMF272 (Margolin et al., 1997). Para esto, cada uno de los plásmidos anteriormente mencionados se digirieron con las enzimas Anza NotI y BstBI, al igual que el plásmido pMF272 y se ligaron. Con el producto de la ligación se realizó la transformación de cepas de *E. coli Top10*, con lo que se obtuvieron los plásmidos pMF272:NPIR-1, pMF272:NPIR-1 Kex, pMF272:CPIR-1 y pMF272:CPIR-1ΔGPI (para la estrategia de construcción de los plásmidos pMF272:X ver el apartado de materiales y métodos). Todos plásmidos previamente

mencionados fueron caracterizados por patrones de restricción con las enzimas Anza BamHI, Anza BstBI y Anza XbaI (ver figura 10). En la figura 11 se pueden ver las representaciones gráficas de los plásmidos construidos a partir de pMF272.

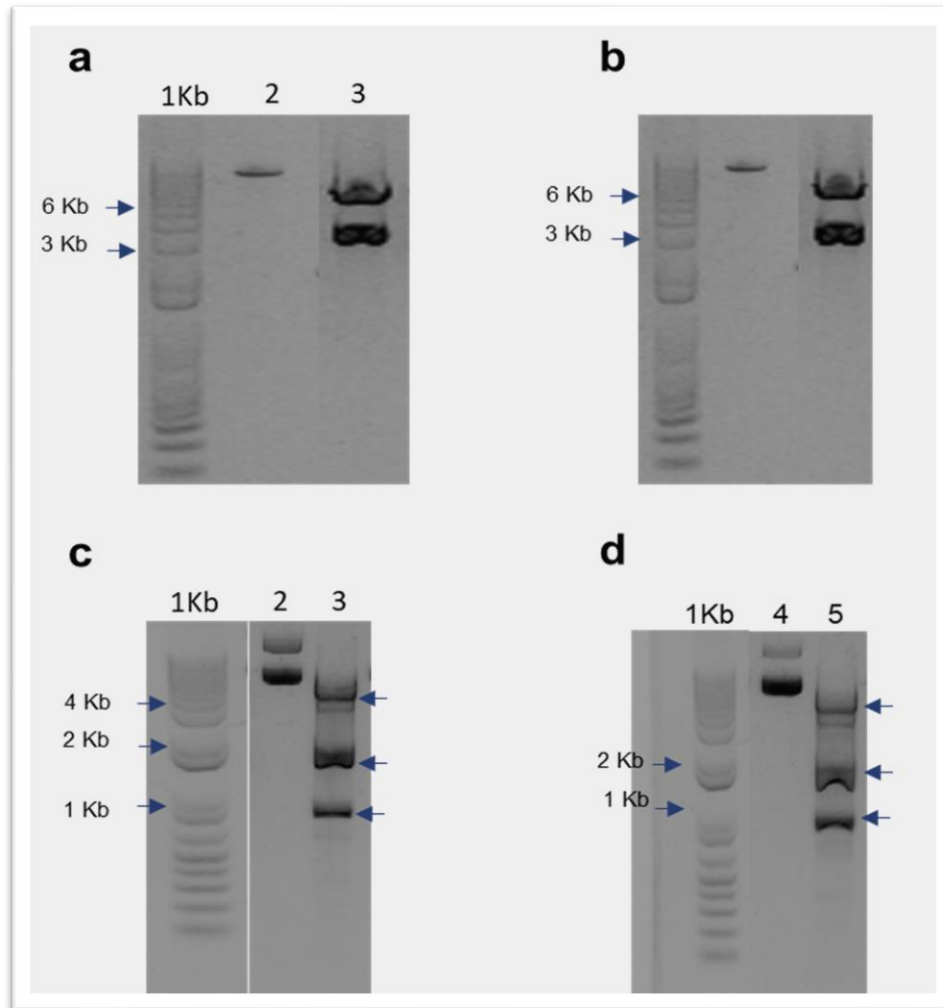


Figura 10 Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pMF272:NPIR-1, pMF272:NPIR-1 Kex, pMF272:CPIR-1 y pMF272:CPIR-1ΔGPI. A) Confirmación del plásmido pMF272:NPIR-1; carril 1Kb, marcador de peso molecular; 2, plásmido sin digerir (circular); 3, plásmido con triple digestión con las enzimas BamHI, BstBI y XbaI (6211 pb, 2549 pb y 165 pb). B) Confirmación del plásmido pMF272:NPIR-1 Kex; carril 1Kb, marcador de peso molecular; 2, plásmido sin digerir (circular); 3, patrón de digestión con las enzimas BamHI, BstBI y XbaI (6211 pb, 2549 pb y 165 pb). C) Confirmación del plásmido pMF272:CPIR-1; carril 1Kb, marcador de peso molecular; carril 2, plásmido sin digerir; carril 3, plásmido digerido con las enzimas BamHI, BstBI y XbaI (6211 pb, 1793 pb y 921 pb). D) Confirmación del plásmido pMF272:CPIR1ΔGPI; carril 1Kb, marcador de peso molecular; carril 2, plásmido sin digerir (circular); 3, patrón de digestión con las enzimas BamHI, BstBI y XbaI (6211 pb, 1793 pb y 849 pb).



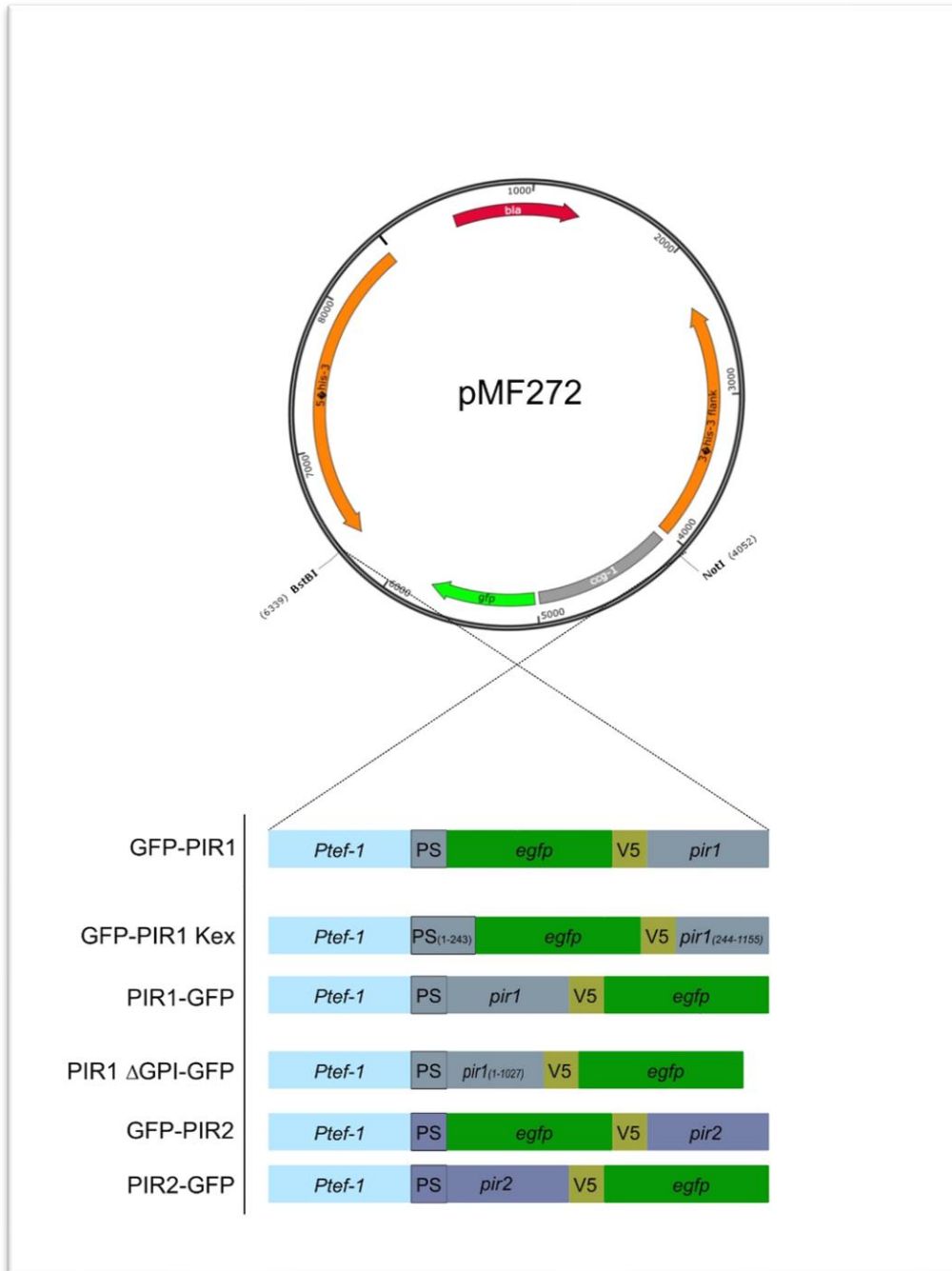


Figura 11 Representación gráfica de los casetes de expresión insertados en el plásmido pMF272 entre el sitio de corte NotI y BstBI.

#### 4.5.2 Construcciones de vectores recombinantes para el etiquetado de la proteína PIR-2

La proteína putativa PIR-2 de *N. crassa* únicamente tiene los motivos PIR próximos al extremo C-terminal. Esta proteína carece del dominio de las cuatro cisteínas y el sitio de procesamiento Kex2 (De Groot et al., 2005). Con el objetivo de conocer su localización se etiquetó con la proteína GFP en el extremo C-terminal. Como se abordó anteriormente, se ha dicho que la presencia de una proteína pasajero puede llegar a impedir su correcto anclaje a la pared celular en levaduras haciendo aún más ineficiente el proceso y permitiendo que una gran cantidad de la proteína ancla sea secretada al medio. Para determinar si este efecto también ocurre en el caso de los hongos filamentosos e intentar cuantificar este problema, se diseñó una construcción que permitió la fusión de la proteína GFP en el extremo N-terminal lo que permitirá determinar el grado de afectación por el impedimento estérico que la proteína GFP ocasione.

Para la construcción del plásmido pMF272:NPIR-2 y pMF272:CPIR-2, primeramente, se obtuvieron los subensambles *Ptef-1::ps-pir-2::gfp::v5::pir-2* y *Ptef-1::pir-2::v5::gfp*. A ambos subensambles se le añadieron sitios de restricción para las enzimas NotI y BstBI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Posteriormente, se clonaron en el plásmido pGEM T-Easy y se obtuvieron los plásmidos pGEM:NPIR-2 y pGEM:CPIR-2 (ver figura 9). La confirmación de las construcciones de dichos plásmidos se verificó por el análisis de sus patrones de restricción. Ambos se digirieron con las enzimas BamHI y DraI (ver figura 12). Por secuenciación se confirmó la ausencia de mutaciones que pudieran comprometer la funcionalidad del constructo.

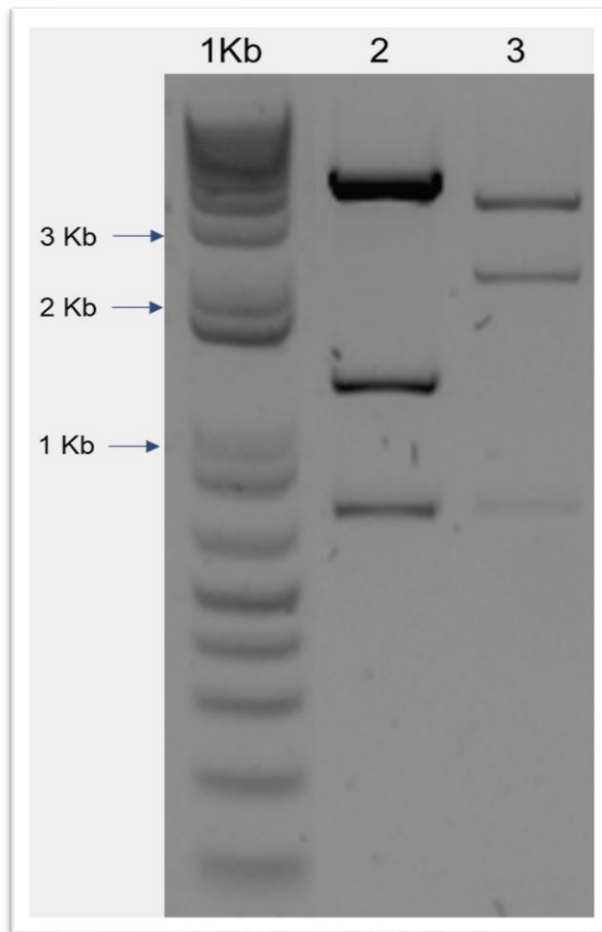


Figura 12. Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pGEM:NPIR-2 y pGEM:CPIR-2. Carril 1Kb, marcador de peso molecular; 2, pGEM:NPIR-2 con doble digestión con las enzimas BamHI y DraI (3801 pb, 1307 pb, 692 pb y 19 pb). 3, pGEM:CPIR-2 con doble digestión con las enzimas BamHI y DraI (3047 pb, 2069 pb, 692 pb y 19 pb).

Una vez obtenida la clonación de los ensamblajes de interés en pGEM T-Easy se realizó una subclonación en pMF272. Primero, cada uno de los plásmidos anteriormente mencionados se digirieron con las enzimas NotI y BstBI al igual que el plásmido pMF272, y posteriormente fueron ligados. La clonación se llevó a cabo en células quimiocompetentes de *E. coli* Top10. Como resultado se obtuvieron los plásmidos pMF272:NPIR-2 y pMF272:CPIR-2 (para ver la estrategia de construcción de los plásmidos pMF272:Y ir al apartado de materiales y métodos). La caracterización molecular de los plásmidos anteriormente mencionados se

realizó mediante patrones de restricción con la enzima Dral (ver figura 13). En la figura 11 se encuentra la representación gráfica de los casetes de expresión insertados en el plásmido pMF272.

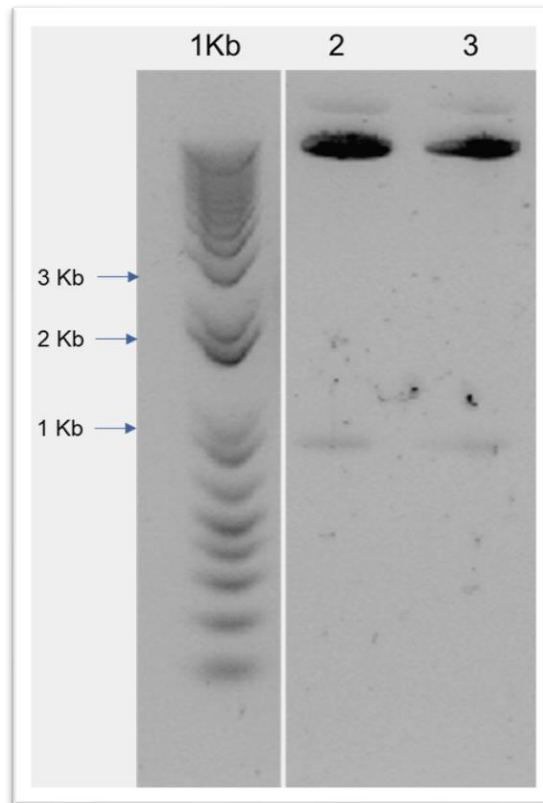


Figura 13. Caracterización molecular de la construcción de los plásmidos pMF272:NPIR-2 y pMF272:CPIR-2. Carril 1, marcador de peso molecular; 2 y 3, patrón de digestión (8281 pb, 692 pb y 19 pb) de los plásmidos pMF272:NPIR-2 y pMF272:CPIR-2 obtenidos con la enzima Dral.

#### 4.6 Expresión y localización de las proteínas PIR fusionadas a GFP.

##### **PIR1 se localiza en la periferia celular de hifas vegetativas en *N. crassa*.**

Las proteínas PIR han sido ampliamente estudiadas en levaduras y se ha reportado su presencia en la pared celular en una serie de hongos levaduriformes: *S. cerevisiae* (Mrsa y Tanner, 1999), *C. albicans* (Kandasamy et al., 2000), *Y. lipolytica* (Jaafar et al., 2003), *P. pastoris* (Pal Khasa et al., 2011), *C. glabrata* (De Groot et al., 2008). En hongos filamentosos, el estudio de estas proteínas se ha limitado a análisis bioinformáticos (De Groot et al., 2005). Por ello, en este trabajo enfocamos nuestros esfuerzos por rastrear dos genes *pir* putativos en *N. crassa* para demostrar la existencia de estas proteínas y su localización a nivel celular. El presente trabajo es el primero en reportar la presencia de proteínas PIR en la periferia celular de un hongo filamentoso.

Se construyó la fusión de la proteína PIR1 etiquetada con GFP en el extremo N y C terminales para monitorear su localización celular. Se confirmó que estas cuatro fusiones son capaces de llegar hasta la periferia celular con diferentes intensidades de fluorescencia cuando son expresadas bajo el control del promotor *Ptef-1*. Esta fluorescencia no fue contundente en zonas próximas al ápice aún en condiciones de alta sensibilidad del detector del microscopio confocal utilizado. Observaciones similares fueron hechas en *A. fumigatus* al estudiar tres proteínas, dos de membrana y una de pared celular (Muraosa et al., 2019; Ouyang et al., 2013), y en *A. oryzae* (Tabuchi et al., 2010). Sin embargo, en las cepas GFP-PIR1<sub>(244-1155)</sub>, PIR1-GFP  $\Delta$ GPI se observó un patrón de fluorescencia en el domo apical que sugiere la presencia de GFP en esta región y siendo más notorio en la cepa GFP-PIR2 (Figura 14).

La acumulación de la señal de GFP aparece claramente en la zona distal de la hifa, aproximadamente a 700  $\mu$ m de la punta (Figura 15). En la cepa Nc PIR-1 $\Delta$ GPI::GFP se puede apreciar una mayor intensidad en la fluorescencia respecto a la cepa Nc GFP:PIR-1, Nc GFP:PIR-1 Kex, Nc PIR-1:GFP (Figura 15).

Al comparar visualmente la fluorescencia acumulada en la superficie de las hifas vegetativas entre las cepas Nc GFP::PIR-1 y Nc GFP::PIR-1<sub>(244-1155)</sub> nos dimos cuenta de que a pesar de que la proteína tiene un sitio de corte Kex2 en el extremo N-terminal, éste podría no estar siendo procesado de manera eficiente y permitir que una porción de la proteína secretada llegue a su destino. Sin embargo, se puede apreciar una mayor fluorescencia en la región III de la hifa en el caso de la cepa Nc GFP::PIR-1 respecto a la cepa Nc GFP::PIR-1 Kex. Esto podría deberse a que la GFP es escindida de la proteína ancla en el retículo endoplásmico por el mecanismo de la proteasa Kex2, quedando atrapada, posiblemente, en cuerpos vesiculares (ver figura 14) (Mao et al., 2003).

Por otro lado, se observa el mismo patrón en la cepa Nc PIR-1:GFP que en Nc GFP::PIR-1; una gran acumulación de fluorescencia en zonas medias distales del ápice (fig. 14). Este patrón de fluorescencia observado sugiere que PIR-1 posiblemente es una GPI-proteína y por lo tanto GFP se queda retenida en el retículo endoplasmático donde ocurre el procesamiento del GPI (Ferguson et al., 2009; Kinoshita, 2014). Por otro lado, en la cepa Nc PIR-1 $\Delta$ GPI:GFP se observa una reducción en la acumulación de cuerpos vesiculares fluorescentes, aunque no haya presencia contundente de fluorescencia en el domo apical. Sin embargo, en zonas distales la señal es intensa (Figura 15; PIR-1<sub>(1-1027)</sub>). Estos resultados sustentan la hipótesis de que PIR-1 es una PIR-GPI proteína, además, sugieren que la señal GPI en la proteína PIR-1 de *N. crassa* no es esencial para su correcta secreción. Por otro lado, también se puede inferir que los dominios de cisteína son funcionales en esta proteína; sin embargo, se requieren de más experimentos para comprobar que, efectivamente, la fluorescencia observada es auténtica de pared.

Desde una perspectiva de aplicabilidad biotecnológica, la proteína PIR-1 de *N. crassa* podría ser utilizada como ancla molecular en la versión PIR-1 $\Delta$ GPI ya que, la delección de un fragmento del C-terminal incrementa la intensidad de la señal de fluorescencia, es decir, la eficiencia de anclaje.

## **PIR2 y su localización en la periferia celular**

PIR-2 de *N. crassa* es una proteína atípica ya que no cuenta con el dominio de cisteínas ni sitio de procesamiento Kex2 lo que hace más sencillo el análisis de esta proteína en términos biológicos, pero en términos de uso biotecnológico, utilizarla como ancla estaría limitado únicamente a los motivos PIR como sitios de anclaje (fusión N-terminal).

Con la finalidad de probar si PIR-2 también podría ser utilizada como ancla para despliegues de proteínas en superficie celular, se realizaron fusiones de GFP tanto en el N como en el C-terminal.

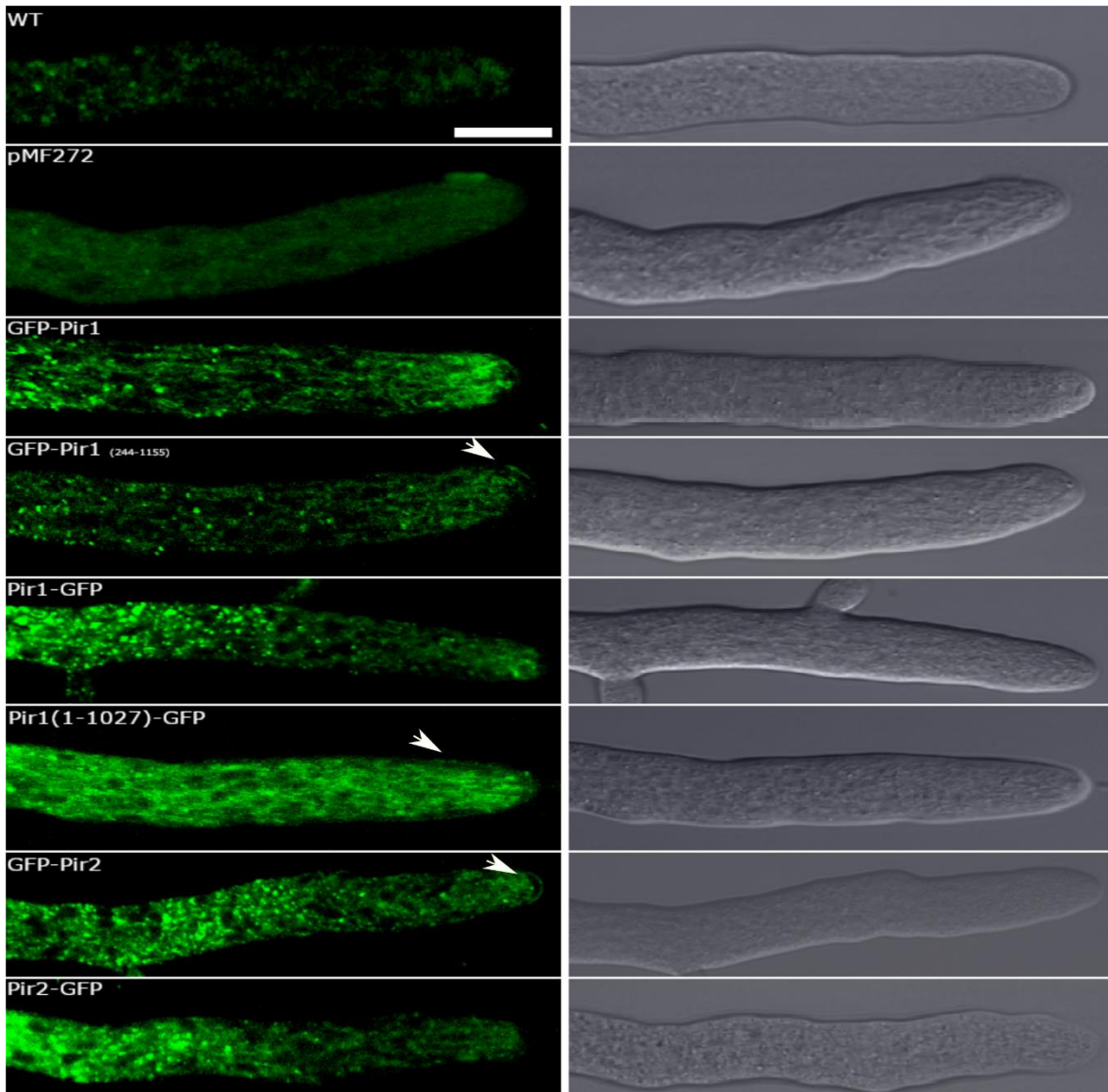


Figura 14. Micrografías confocales de hifas vegetativas de *N. crassa* en la zona apical expresando GFP::PIR-1, GFP::PIR-1Kex, PIR-1::GFP, PIR-1 $\Delta$ GPI::GFP, GFP::PIR-2, PIR-2::GFP y su distribución y acumulación en zonas próximas al ápice. Las flechas rojas indican fluorescencia en el domo apical. Barra = 10 $\mu$ m.



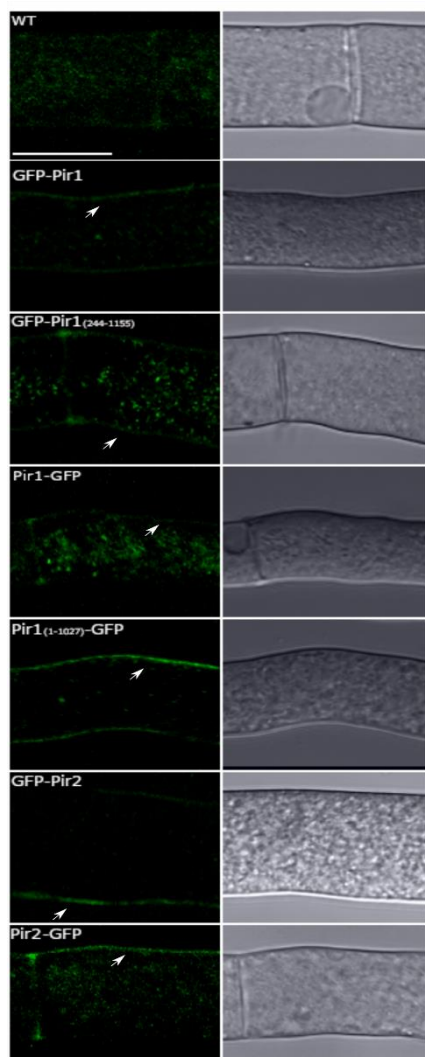


Figura 15. Micrografías confocales de hifas vegetativas de *N. crassa* expresando GFP::PIR-1, GFP::PIR-1Kex, PIR-1::GFP, PIR-1ΔGPI::GFP, GFP::PIR-2, PIR-2::GFP y su localización en la periferia celular. Barra, 20 μm

Los análisis de microscopía indican la presencia de fluorescencia en la periferia celular en zonas distales al ápice, región III de la hifa, para las dos fusiones (N y C-terminales). Estos resultados demuestran el potencial uso de PIR-2 como ancla molecular para el despliegue de proteínas en superficie celular; sin embargo, en la cepa Nc GFP:PIR-2 se logró ver una señal mucho más intensa respecto a la cepa Nc PIR-2:GFP (ver figura 15). Dichos resultados sugieren que la configuración N-terminal sería la más adecuada para el desarrollo de sistemas de despliegue. Cabe destacar que, de manera inesperada la cepa Nc PIR-2:GFP mostró fluorescencia en regiones distales de la punta (Figura 15) sin mostrar un patrón de fluorescencia en el domo apical (figura 14), lo que sugiere que a pesar de estar fusionada la GFP próxima a los sitios de unión (motivos PIR), éstos siguen siendo funcionales. Por otro lado, la contundente señal en el domo apical en la cepa Nc GFP:PIR-2 queda sin ser comprendida.

Cabe destacar que resulta interesante que la acumulación de la fluorescencia aparezca en zonas distales a la punta puesto que no era algo de esperar. Ouyang et al., (2013) también reporta que la señal de GFP aparece en zonas distales de la punta lo que nos llevó a la siguiente pregunta, ¿de qué manera una proteína se va acumulando durante el crecimiento vegetativo de tal manera que la señal vaya incrementando, pasando de ser una señal tenue o imperceptible a una señal clara en la periferia celular? La respuesta a esta pregunta podría estar relacionada con los procesos de maduración de la pared celular, por lo que hacen falta más estudios para su entendimiento.

## Conclusiones

- La familia de las proteínas PIR es un grupo de proteínas estructuralmente diverso. Estas proteínas se encuentran distribuidas únicamente en el filo de las Ascomycotas. La distribución de los motivos PIR en una proteína no muestra un patrón claro ya que se encuentran sobre toda la secuencia.
- Las proteínas PIR pueden o no tener señal GPI y un dominio conservado de cuatro cisteínas en el extremo C-terminal. Los motivos PIR cerca del extremo N-terminal son una característica representativa del orden de los Saccharomycetes.
- La eliminación de las proteínas PIR en *N. crassa* no comprometen funcionalmente al hongo.
- La velocidad de crecimiento en las cepas mutantes ( $\Delta pir1$  y  $\Delta pir2$ ) es significativamente mayor que la de la cepa silvestre.
- La frecuencia de ramificación se vio afectada por la delección de los genes de las proteínas PIR. La delección de *pir-1* resultó en una reducción en la tasa de ramificación del 19.68 %. Sin embargo, la delección del gen *pir-2* resultó en un aumento de la tasa de ramificación del 24.59%.
- La cepa Nc PIR-1 $\Delta$ GPI fue la que presentó la mayor intensidad de fluorescencia en la superficie celular y una menor acumulación de fluorescencia citosólica. En términos técnicos, es la fusión más eficiente para el despliegue de proteínas en la superficie celular.
- La cepa Nc PIR-2:GFP tiene la menor intensidad de fluorescencia en la superficie, lo que se traduce en una configuración de anclaje poco eficiente para el despliegue de proteínas en la superficie celular.
- Las proteínas PIR de *N. crassa* no pasan a través del Spitzenkörper para llegar al domo apical.
- PIR-2 podría ser una buena candidata para ser utilizada como ancla molecular para realizar despliegues. La fusión deberá ser N-terminal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Ohba, M., Shimma, Y.I., Jigami, Y., 2004. Yeast cells harboring human  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase at the cell surface engineered using Pir, a cell wall-anchored protein. *FEMS Yeast Res.* 4, 417–425. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00193-4)
- Abe, H., Shimma, Y.I., Jigami, Y., 2003. In vitro oligosaccharide synthesis using intact yeast cells that display glycosyltransferases at the cell surface through cell wall-anchored protein Pir. *Glycobiology* 13, 87–95. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg014>
- Arguello, J., Fan, C., Wang, W., Long, M., 2007. Origination of chimeric genes through DNA-level recombination. *Genome Dyn.* <https://doi.org/10.1159/000107608>
- Arroya, J., Sarfati, J., Baixench, M.T., Ragni, E., Guillén, M., Rodríguez-Peña, J.M., Popolo, L., Latgé, J.P., 2007. The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens. *Yeast* 24, 289–296. <https://doi.org/10.1002/yea.1480>
- Backhaus, K., Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Purschke, G., de Koster, C.G., Klis, F.M., Heinisch, J.J., 2010. A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 27, 647–660. <https://doi.org/10.1002/yea.1781>
- Bacon, J.S.D., Jones, D., Farmer, V.C., Webley, D.M., 1968. The occurrence of  $\alpha$ (1-3)glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species, and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *BBA - Gen. Subj.* 158, 313–315. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(68\)90153-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(68)90153-0)
- Boisramé, A., Cornu, A., Da Costa, G., Richard, M.L., 2011. Unexpected role for a serine/threonine-rich domain in the *Candida albicans* Iff protein family. *Eukaryot. Cell* 10, 1317–30. <https://doi.org/10.1128/EC.05044-11>
- Boorsma, A., Nobel, H. de, Riet, B. ter, Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K.J., Klis, F.M., 2004. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 413–427. <https://doi.org/10.1002/yea.1109>
- Bowman, S.M., Free, S.J., 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brul, S., King, A., Van Der Vaart, J.M., Chapman, J., Klis, F., Verrips, C.T., 1997. The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1023/A:1000429208049>
- Cambell J, Enderline C, S.C., 1994. Vectors for expression and modification of cDNA sequences in *Neurospora crassa*. [WWW Document]. URL <http://www.fgsc.net/fgn41/campbell.html> (consultado 1.12.18).
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. *Fungal Cells and Vegetative*

- Growth, en: *The Fungi*. <https://doi.org/10.1016/b978-012738445-0/50020-4>
- Castillo, L., Martínez, A.I., Garcerá, A., Victoria Elorza, M., Valentín, E., Sentandreu, R., 2003. Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall  $\beta$ -1,3-glucan. *Yeast* 20, 973–983. <https://doi.org/10.1002/yea.1016>
- Chen, W., Bae, W., Mehra, R., Mulchandani, A., 2009. Enhanced Bioaccumulation of Heavy Metals by Bacterial Cells with Surface-Displayed Synthetic Phytochelatins, en: *Biotechnol Bioeng*. pp. 411–418. <https://doi.org/10.1021/bk-2002-0806.ch024>
- Chen, Y.-P., Hwang, I.-E., Lin, C.-J., Wang, H.-J., Tseng, C.-P., 2012. Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 112, 455–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05232.x>
- Cheung, A.Y., Li, C., Zou, Y.J., Wu, H.M., 2014. Glycosylphosphatidylinositol anchoring: Control through modification. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.114.246926>
- Colot, H. V, Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A., Dunlap, J.C., 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10352–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601456103>
- de Groot, P.W.J., Hellingwerf, K.J., Klis, F.M., 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20, 781–796. <https://doi.org/10.1002/yea.1007>
- De Groot, P.W.J., Kraneveld, E.A., Qing, Y.Y., Dekker, H.L., Groß, U., Crielaard, W., De Koster, C.G., Bader, O., Klis, F.M., Weig, M., 2008. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: Differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot. Cell* 7, 1951–1964. <https://doi.org/10.1128/EC.00284-08>
- De Groot, P.W.J., Ram, A.F., Klis, F.M., 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet. Biol.* 42, 657–675. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.04.002>
- Deshpande, N., Wilkins, M.R., Packer, N., Nevalainen, H., 2008. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology*. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn044>
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., Håbraud, M., 2006. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00122.x>
- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mersa, V., Tanner, W., 2006. Pir proteins of

- Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J. Biol. Chem.* 281, 11523–9.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M600314200>
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., Eisenhaber, F., 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Mol. Biol.* 337, 243–253.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.025>
- Faria-Oliveira, F., Carvalho, J., Ferreira, C., Hernáez, M.L., Gil, C., Lucas, C., 2015. Quantitative differential proteomics of yeast extracellular matrix: There is more to it than meets the eye. *BMC Microbiol.* 15.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-015-0550-1>
- Ferguson, M.A.J., Kinoshita, T., Hart, G.W., 2009. Chapter 11 Glycosylphosphatidylinositol Anchors. *Essentials Glycobiol.*  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00211-5>
- Finn, R.D., Clements, J., Eddy, S.R., 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39, W29–W37.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44, D279–D285.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M., Latgé, J.P., 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.*  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M909975199>
- Free, S.J., 2013. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis, en: *Advances in Genetics*. pp. 33–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Freitag, M., Hickey, P.C., Raju, N.B., Selker, E.U., Read, N.D., 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 897–910.  
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.06.008>
- Frieman, Matthew B, Cormack, B.P., 2004. Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150, 3105–3114. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27420-0>
- Frieman, Matthew B., Cormack, B.P., 2004. Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150,

3105–3114. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27420-0>

- Fujita, M., Kinoshita, T., 2012. GPI-anchor remodeling: Potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 1050–1058. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2012.01.004>
- George P. Smith, 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (80-. ). 228, 1315–1317.
- Georgiou, G., Poetschke, H.L., Stathopoulos, C., Francisco, J.A., 1993. Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol.* 11, 6–10. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90068-K](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90068-K)
- Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L., Curtiss, R., 1997. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/nbt0197-29>
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Goridis, C., Wille, W., 1988. The three size classes of mouse NCAM proteins arise from a single gene by a combination of alternative splicing and use of different polyadenylation sites. *Neurochem. Int.* 12, 269–272. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(88\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0197-0186(88)90164-7)
- Grün, C.H., Hochstenbach, F., Humbel, B.M., Verkleij, A.J., Sietsma, J.H., Klis, F.M., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., 2005. The structure of cell wall  $\alpha$ -glucan from fission yeast. *Glycobiology* 15, 245–257. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwi002>
- Henry, C., Fontaine, T., Heddergott, C., Robinet, P., Aimanianda, V., Beau, R., Beauvais, A., Mouyna, I., Prevost, M.C., Fekkar, A., Zhao, Y., Perlin, D., Latgé, J.P., 2016. Biosynthesis of cell wall mannan in the conidium and the mycelium of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/cmi.12665>
- Hickey, P.C., Jacobson, D.J., Read, N.D., Louise Glass, N., 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 109–119. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00035-X](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00035-X)
- Hsu, P.-H., Chiang, P.-C., Liu, C.-H., Chang, Y.-W., 2015. Characterization of Cell Wall Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* Clinical Isolates Elucidates Hsp150p in Virulence, *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135174>
- Inokuma, K., Hasunuma, T., Kondo, A., 2014. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter. *Biotechnol. Biofuels* 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-8>

- Isticato, R., Cangiano, G., Tran, H.T., Ciabattini, A., Medaglini, D., Oggioni, M.R., De Felice, M., Pozzi, G., Ricca, E., 2001. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* 183, 6294–6301. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6294-6301.2001>
- Jaafar, L., Moukadiri, I., Zueco, J., 2003. Characterization of a disulphide-bound Pir-cell wall protein (Pir-CWP) of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 20, 417–426. <https://doi.org/10.1002/yea.973>
- Jin, C., 2012. Protein glycosylation in *Aspergillus fumigatus* is essential for cell wall synthesis and serves as a promising model of multicellular eukaryotic development. *Int. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1155/2012/654251>
- Jose, J., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2002. Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J. Biotechnol.* 95, 257–268. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00030-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00030-5)
- Kandasamy, R., Vedyappan, G., Chaffin, W.L., 2000. Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 239–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09111.x>
- Kapteyn, J., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M., Klis, F.M., 1999. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* 31, 1835–44. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01320.x>
- Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Müller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H., Klis, F.M., 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol. Microbiol.* 35, 601–611. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01729.x>
- Kim, S.-Y., Sohn, J.-H., Pyun, Y.-R., Choi, E.-S., 2002. A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 19, 1153–1163. <https://doi.org/10.1002/yea.911>
- Kinoshita, T., 2014. Enzymatic mechanism of GPI anchor attachment clarified. *Cell Cycle* 13, 1838–9. <https://doi.org/10.4161/cc.29379>
- Kinoshita, T., Maeda, Y., Fujita, M., 2013. Transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 2473–2478. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.01.027>
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Kondo, A., Ueda, M., 2004. Yeast cell-surface display - Applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1492-3>



- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kuroda, K., Ueda, M., 2013a. Arming technology in yeast—novel strategy for whole-cell biocatalyst and protein engineering. *Biomolecules* 3, 632–650. <https://doi.org/10.3390/biom3030632>
- Kuroda, K., Ueda, M., 2013b. Arming Technology in Yeast—Novel Strategy for Whole-cell Biocatalyst and Protein Engineering. *Biomolecules* 3, 632–650. <https://doi.org/10.3390/biom3030632>
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D., François, J., 2003. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 20345–20357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211604200>
- Lee, S.Y., Choi, J.H., Xu, Z., 2003. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* 21, 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00006-9)
- Lesage, G., Bussey, H., 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/mmb.00038-05>
- Li, M., 2000. Applications of display technology protein analysis. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/82355>
- Löfblom, J., 2011. Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol. J.* 1115–1129. <https://doi.org/10.1002/biot.201100129>
- Loibl, M., Strahl, S., 2013. Protein O-mannosylation: What we have learned from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.008>
- López-Villar, E., Monteoliva, L., Larsen, M.R., Sachon, E., Shabaz, M., Pardo, M., Pla, J., Gil, C., Roepstorff, P., Nombela, C., 2006. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics* 6, S107–S118. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500479>
- Maddi, A., Fu, C., Free, S.J., 2012. The *neurospora crassa* *dfg5* and *dcw1* genes encode  $\alpha$ -1,6-mannanases that function in the incorporation of glycoproteins into the cell wall. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038872>
- Mao, Y., Zhang, Z., Gast, C., Wong, B., 2008. C-terminal signals regulate targeting of glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins to the cell wall or plasma membrane in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 7, 1906–1915. <https://doi.org/10.1128/EC.00148-08>
- Mao, Y., Zhang, Z., Wong, B., 2003. Use of green fluorescent protein fusions to analyse the N- and C-terminal signal peptides of GPI-anchored cell wall proteins in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 50, 1617–1628. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03794.x>

- Margolin, B.S., Freitag, M., Selker, E.U., 1997. Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Rep.* 44, 13. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1281>
- Martínez, A.I., Castillo, L., Garcerá, A., Elorza, M. V, Valentín, E., Sentandreu, R., 2004. Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology* 150, 3151–3161. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27220-0>
- Matsumoto, T., Ito, M., Fukuda, H., Kondo, A., 2004. Enantioselective transesterification using lipase-displaying yeast whole-cell biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 481–485. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1486-1>
- Maurer, J., Jose, J., Meyer, T.F., 1997. Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 794–804. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.794-804.1997>
- McNally, M.T., Free, S.J., 1988. Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr. Genet.* 14, 545–51.
- Mishra, N.C., Tatum, E.L., 1973. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3875–9.
- Miura, N., Ueda, M., 2018. Evaluation of Unconventional Protein Secretion by *Saccharomyces cerevisiae* and other Fungi. *Cells* 7, 128. <https://doi.org/10.3390/cells7090128>
- Moura, M.V.H., Da Silva, G.P., De Oliveira Machado, A.C., Torres, F.A.G., Freire, D.M.G., Almeida, R.V., 2015. Displaying lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* using the yeast surface display approach: Prospection of a new anchor and characterization of the whole cell biocatalyst. *PLoS One* 10, e0141454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141454>
- Mrsá, V., Seidl, T., Gentsch, M., Tanner, W., 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1145–1154. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970930\)13:12<1145::AID-YEA163>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970930)13:12<1145::AID-YEA163>3.0.CO;2-Y)
- Mrsa, V., Tanner, W., 1999. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* 15, 813–820. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199907\)15:10A<813::AID-YEA421>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199907)15:10A<813::AID-YEA421>3.0.CO;2-Y)
- Muraosa, Y., Toyotome, T., Yahiro, M., Kamei, K., 2019. Characterisation of novel-cell-wall LysM-domain proteins LdpA and LdpB from the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40039-1>

- Nasir, A., Kim, K.M., Caetano-Anollés, G., 2017. Phylogenetic tracings of proteome size support the gradual accretion of protein structural domains and the early origin of viruses from primordial cells. *Front. Microbiol.*  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01178>
- Ouyang, H., Chen, X., Lü, Y., Wilson, I.B.H., Tang, G., Wang, A., Jin, C., 2013. One single basic amino acid at the  $\omega$ -1 or  $\omega$ -2 site is a signal that Retains glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 12, 889–899.  
<https://doi.org/10.1128/EC.00351-12>
- Pal Khasa, Y., Conrad, S., Sengul, M., Plautz, S., Meagher, M.M., Inan, M., 2011. Isolation of *Pichia pastoris* PIR genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion. *Yeast* 28, 213–226.  
<https://doi.org/10.1002/yea.1832>
- Pan, Z.Y., Yang, Z.M., Pan, L., Zheng, S.P., Han, S.Y., Lin, Y., 2014. Displaying *Candida antarctica* lipase B on the cell surface of *Aspergillus niger* as a potential food-grade whole-cell catalyst. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 711–720. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1410-y>
- Paulick, M.G., Bertozzi, C.R., 2008. The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry.*  
<https://doi.org/10.1021/bi8006324>
- Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H., 2008. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *NATURE METHODS.*
- Pierleoni, A., Martelli, P., Casadio, R., 2008. PredGPI: A GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-392>
- Qu, W., Xue, Y., Ding, Q., 2015. Display of Fungi Xylanase on *Escherichia coli* Cell Surface and Use of the Enzyme in Xylan Biodegradation. *Curr. Microbiol.* 70, 779–785. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0781-2>
- Ram, A.F.J., Klis, F.M., 2006. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.397>
- Richins, R.D., Kaneva, I., Mulchandani, A., Chen, W., 1997. Biodegradation of Organophosphorus Pesticides by Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase. *Nat. Biotechnol.* 15, 984–987. <https://doi.org/10.1038/nbt1097-984>
- Roncero, C., 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.*  
<https://doi.org/10.1007/s00294-002-0318-7>
- Roncero, C., Duran, A., 1985. Effect of Calcofluor White and Congo Red on Fungal Cell Wall Morphogenesis: In Vivo Activation of Chitin Polymerization. *J. Bacteriol.* 163, 1180–1185.
- Ruiz-Herrera, J., Victoria Elorza, M., Valentín, E., Sentandreu, R., 2006. Molecular

organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x>

- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees'. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/molbev/4.4.406>
- Samar, D., Kieler, J.B., Klutts, J.S., 2015. Identification and deletion of Tft1,  $\alpha$  predicted glycosyltransferase necessary for cell wall  $\beta$ -1,3;1,4-glucan synthesis in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117336>
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P.Å., Ståhl, S., 2002. Display of proteins on bacteria. *J. Biotechnol.* [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00043-3)
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Scott, J.K., Smith, G.P., 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science (80-. )*. 249, 386–390. <https://doi.org/10.1126/science.1696028>
- Shimazu, M., Mulchandani, A., Chen, W., 2001. Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnol. Bioeng.* 76, 318–324. <https://doi.org/10.1002/bit.10095>
- Shrestha, P., Ibáñez, A.B., Bauer, S., Glassman, S.I., Szaro, T.M., Bruns, T.D., Taylor, J.W., 2011. Fungi isolated from *Miscanthus* and sugarcane: biomass conversion, fungal enzymes, and hydrolysis of plant cell wall polymers. *Biotechnol. Biofuels* 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0221-3>
- Steinegger, M., Söding, J., 2017. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nat. Biotechnol.* 35, 1026–1028. <https://doi.org/10.1038/nbt.3988>
- Sumita, T., Yoko-o, T., Shimma, Y., Jigami, Y., 2005. Comparison of Cell Wall Localization among Pir Family Proteins and Functional Dissection of the Region Required for Cell Wall Binding and Bud Scar Recruitment of Comparison of Cell Wall Localization among Pir Family Proteins and Functional Dissection of t. *Eukaryot. Cell* 4, 1872–1881. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1872>
- Suzuki, T., Lett, M.C., Sasakawa, C., 1995. Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J. Biol. Chem.* 270, 30874–30880. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.30874>
- Tabuchi, S., Ito, J., Adachi, T., Ishida, H., Hata, Y., Okazaki, F., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., 2010. Display of both N- and C-terminal target fusion proteins on the *Aspergillus oryzae* cell surface using a chitin-binding module. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1035–1041. <https://doi.org/10.1128/AEM.01111-09>


- Microbiol. Biotechnol. 87, 1783–1789. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2664-6>
- Tanaka, T., Kondo, A., 2015. Cell surface engineering of industrial microorganisms for biorefining applications. *Biotechnol. Adv.* 33, 1403–1411. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.06.002>
- Tanino, T., Fukuda, H., Kondo, A., 2006. Construction of a *Pichia pastoris* cell-surface display system using Flo1p anchor system, en: *Biotechnology Progress*. pp. 989–993. <https://doi.org/10.1021/bp060133+>
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25.
- Toh-e, A., Yasunagat, S., Nisogit, H., Tanakas, K., Oguchi, T., Matsui, Y., 1993. Internal Tandem Repeats , are Related to Each Other , and PIR1 and PIR2 are Required for Tolerance to Heat Shock. *Yeast* 9, 481–494.
- Toh-E, A., Oguchi, T., Matsui, Y., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., 1993. Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast* 9, 481–494. <https://doi.org/10.1002/yea.320090504>
- Ueda, M., 2016. Establishment of cell surface engineering and its development. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1153953>
- Wang, M., Caetano-Anollés, G., 2006. Global phylogeny determined by the combination of protein domains in proteomes. *Mol. Biol. Evol.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msl117>
- Wang, Q., Li, L., Chen, M., Qi, Q., Wang, P.G., 2008. Construction of a novel *Pichia pastoris* cell-surface display system based on the cell wall protein Pir1. *Curr. Microbiol.* 56, 352–357. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9089-1>
- Wang, Q., Li, L., Chen, M., Qi, Q., Wang, P.G., 2007. Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 29, 1561–1566. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9430-6>
- Wang, T., Sun, H., Zhang, J., Liu, Q., Wang, L., Chen, P., Wang, F., Li, H., Xiao, Y., Zhao, X., 2014. The establishment of *Saccharomyces boulardii* surface display system using a single expression vector. *Fungal Genet. Biol.* 64, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.11.006>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinforma. Appl. NOTE* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wei, Q., Yan, J., Chen, Y., Zhang, L., Wu, X., Shang, S., Ma, S., Xia, T., Xue, S., Zhang, H., 2018. Cell Surface Display of MerR on *Saccharomyces cerevisiae* for Biosorption of Mercury. *Mol. Biotechnol.* 60, 12–20.

<https://doi.org/10.1007/s12033-017-0039-2>

- Weig, M., Jänsch, L., Groß, U., De Koster, C.G., Klis, F.M., De Groot, P.W.J., 2004a. Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology* 150, 3129–3144. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27256-0>
- Weig, M., Jänsch, L., Groß, U., De Koster, C.G., Klis, F.M., De Groot, P.W.J., 2004b. Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology* 150, 3129–3144. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27256-0>
- Werné Rus, H., Lehtio, J., Teeri, T., Nygren, P.-åke, Ståhl, S., 2001. Generation of Metal-Binding Staphylococci through Surface Display of Combinatorially Engineered Cellulose-Binding Domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4678–4684. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4678-4684.2001>
- Wosten, H.A.B., Moukha, S.M., Sietsma, J.H., Wessels, J.G.H., 2009. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/00221287-137-8-2017>
- Xie, X., Lipke, P.N., 2010. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast* 27, 479–488. <https://doi.org/10.1002/yea.1787>
- Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., 2010. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 381–388. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2784-z>
- Yang, N., Yu, Z., Jia, D., Xie, Z., Zhang, K., Xia, Z., Lei, L., Qiao, M., 2014. The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2897–2905. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5538-5>
- Yang, S., Arguello, J.R., Li, X., Ding, Y., Zhou, Q., Chen, Y., Zhang, Y., Zhao, R., Brunet, F., Peng, L., Long, M., Wang, W., 2008. Repetitive element-mediated recombination as a mechanism for new gene origination in *Drosophila*. *PLoS Genet.* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040003>
- Yang, S., Lv, X., Wang, X., Wang, J., Wang, R., Wang, T., 2017. Cell-Surface Displayed Expression of Trehalose Synthase from *Pseudomonas putida* ATCC 47054 in *Pichia Pastoris* Using Pir1p as an Anchor Protein. *Front. Microbiol.* 8, 2583. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02583>
- Yin, Q.Y., De Groot, P.W.J., Dekker, H.L., De Jong, L., Klis, F.M., De Koster, C.G., 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J. Biol. Chem.* 280, 20894–20901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500334200>

- Yun, D.J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., 1997. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7082–7087. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7082>
- Yuzbasheva, E.Y., Yuzbashev, T. V., Laptev, I.A., Konstantinova, T.K., Sineoky, S.P., 2011. Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 645–654. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3265-8>
- Zhang, Z.N., Wu, Q.Y., Zhang, G.Z., Zhu, Y.Y., Murphy, R.W., Liu, Z., Zou, C.G., 2015. Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi. *Sci. Rep.* 5, 13032. <https://doi.org/10.1038/srep13032>
- Znameroski, E.A., Coradetti, S.T., Roche, C.M., Tsai, J.C., Iavarone, A.T., Cate, J.H.D., Glass, N.L., 2012. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6012–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118440109>


# Apéndice 1. Participación en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica



**Filamentous Fungi Cell Wall PIR Proteins:  
Diversity, Function and Application**


*Paul Montaña-Silva, Benjamin Rodriguez-Garay and Jorge Verdín*

Industrial Biotechnology, CIATEJ-Jalisco State Scientific Research and Technology Assistance Center, Guadalajara, Jalisco, Mexico



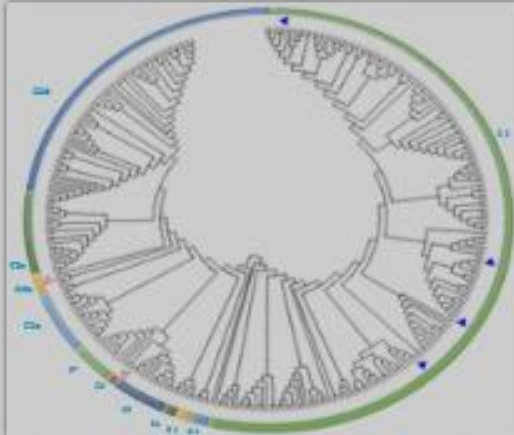
**Abstract:** Proteins with internal repeats (PIR) are cell wall matrix proteins (CWMP) highly conserved in yeasts. *Saccharomyces cerevisiae* PIR proteins are involved in the maintenance of the cell wall structure and it has been found that certain heat shock resistance. Because of their easy and controlled detachment from the wall, these proteins have been widely used in yeast as molecular anchors for cell surface protein display, a technology that allows the introduction of new activities and other assets to target microorganisms. Despite of these features, PIR proteins have not been studied in filamentous fungi. In this work, the diversity of fungal PIR proteins were analyzed and their function explored utilizing *Aspergillus* PIR-1 and PIR-2 as models. 175 PIR-1 and 169 PIR-2 proteins were identified, which clustered in two main groups. The first one matched to the filamentous PIR proteins (four systems reside at the C-terminus, no GPI signal). The second one included PIR proteins from yeasts and filamentous fungi. Most of these contain GPI signals and diversified systems-rich repeat. In order to explore the function of PIR proteins two *Kozak*-not (KO) strains, *Asp-1* and *Asp-2* were phenotypically analyzed. Unexpectedly, the growth rate of both KO strains was higher (*Asp-1*: 2.88E-8 month; *Asp-2*: 2.74E-8 month) than that of WT strain (2.33E-8 month). Moreover, branching rates did not show any significant difference between *Asp-1* and WT strains (2.33E-04 to 9500 um; 3.06E-73 to 8000 um, respectively). However, *Asp-2* strain showed a branching rate (3.70E-58 to 9000 um) significantly higher than that of the other two strains.

### PIR PROTEINS LIKE MOLECULAR ANCHOR



**Fig. 1** Schematic representation of the PIR protein structure. The PIR protein is composed of a signal peptide, a GPI anchor, and a repeat region. The repeat region is divided into two main groups: C-terminal PIR proteins and PIR proteins from yeasts and filamentous fungi.


### RESULTS AND DISCUSSION



**Fig. 2** Phylogenetic relationship between different PIR clusters. The tree shows the clustering of PIR proteins from filamentous fungi and yeasts.

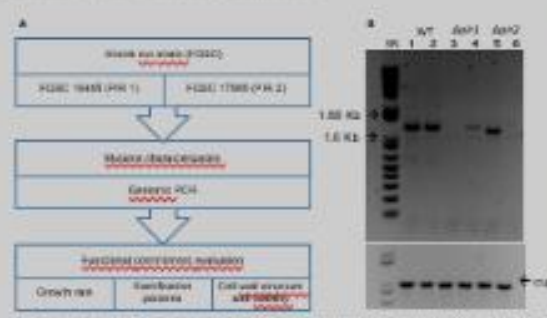
### MATERIALS AND METHODS

#### Bioinformatics characterization



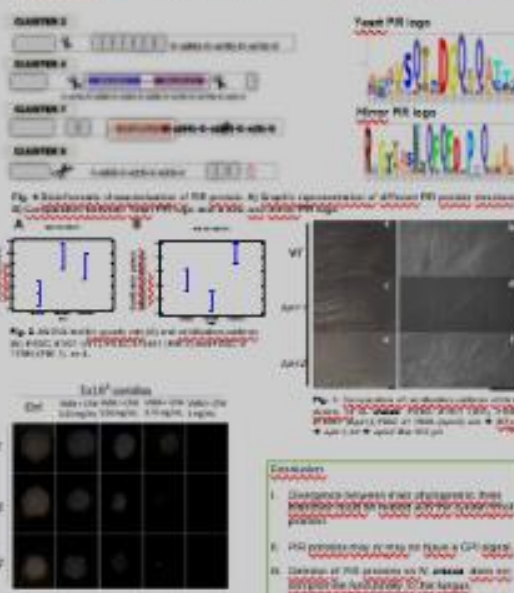
**Fig. 3** Bioinformatics characterization of PIR proteins. The process involves protein identification, clustering, and analysis of repeat sequences.

#### Evolution of the functional commitment



**Fig. 4** Evolution of the functional commitment of PIR proteins. The process involves protein identification, clustering, and analysis of repeat sequences.

#### Evolution of the functional commitment



**Fig. 5** Evolution of the functional commitment of PIR proteins. The process involves protein identification, clustering, and analysis of repeat sequences.

This work is being supported by SENER-CONACYT "Energy sustainability" (245730)





*Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.*  
FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESSES SIN COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC  
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.  
APARTADO POSTAL 75-406. CIUDAD UNIVERSITARIA  
TEL. Y FAX, (55)5562-5742  
http://www.smbq.org.mx  
Correo Electrónico: smbq@fc.uhu.mx

MESA DIRECTIVA 2017 - 2019

PRESIDENTE  
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

VICEPRESIDENTE  
DR. DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA

SECRETARIO TESORERO  
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLÓL

SUBSECRETARIA TESORERA  
DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Roberto Arreguin Lozano  
Dr. Edmundo Casas Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)  
Dr. Joaquín Cravioto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frenk Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García (†)  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna Garola (†)  
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)  
Dr. Raúl Ondarza Vidaurieta  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

*Paul Alejandro Montaña Silva*

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Filamentous Fungi Cell Wall PIR Proteins: Diversity,  
Function and Application**

Por: Paul Montaña Silva, Benjamín Rodríguez, Jorge Verdín

En la modalidad de cartel durante el  
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica  
4 - 9 de noviembre de 2018 en Ixtapa, Zihuatanejo, Gro.

Atentamente  
Por el Comité Organizador

**Dra. Irene B. Castaño Navarro**  
Presidente

## Apéndice 2. Publicación de la revisión: Cell surface display of proteins on filamentous fungi.

Applied Microbiology and Biotechnology  
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10026-7>

MINI-REVIEW



### Cell surface display of proteins on filamentous fungi

Jesús Urbar-Ulloa<sup>1</sup> · Paul Montaña-Silva<sup>1</sup> · Ana Sofía Ramírez-Pelayo<sup>1</sup> · Elisa Fernández-Castillo<sup>1</sup> · Lorena Amaya-Delgado<sup>1</sup> · Benjamín Rodríguez-Garay<sup>2</sup> · Jorge Verdín<sup>1</sup>

Received: 30 March 2019 / Revised: 11 July 2019 / Accepted: 15 July 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

#### Abstract

Protein display approaches have been useful to endow the cell surface of yeasts with new catalytic activities so that they can act as enhanced whole-cell biocatalysts. Despite their biotechnological potential, protein display technologies remain poorly developed for filamentous fungi. The lignocellulolytic character of some of them coupled to the cell surface biosynthesis of valuable molecules by a single or a cascade of several displayed enzymes is an appealing prospect. Cell surface protein display consists in the co-translational fusion of a functional protein (passenger) to an anchor one, usually a cell-wall-resident protein. The abundance, spacing, and local environment of the displayed enzymes—determined by the relationship of the anchor protein with the structure and dynamics of the engineered cell wall—are factors that influence the performance of display-based biocatalysts. The development of protein display strategies in filamentous fungi could be based on the field advances in yeasts; however, the unique composition, structure, and biology of filamentous fungi cell walls require the customization of the approach to those microorganisms. In this prospective review, the cellular bases, the design principles, and the available tools to foster the development of cell surface protein display technologies in filamentous fungi are discussed.

**Keywords** Protein display · Cell surface engineering · Cell wall · Filamentous fungi · PIR proteins · GPI-CWP

#### Introduction

Besides its biological role, the fungal cell wall can be regarded as a scaffold for the display of proteins that could provide fungi with new synthetic catalytic activities and other interesting biotechnological assets (Ananphongmanee et al. 2015; Andreu and del Olmo 2013; Kondo et al. 2002; Matsumoto et al. 2002; Murai et al. 1998; Nakamura et al. 2006; Perpiñá et al. 2015; Wei et al. 2016; Chen et al. 2016). Unlike free enzymes, whole-cell biocatalysts based on protein display

prevent costly and time-consuming protein purifications and are easily reutilizable. In addition, surface-displayed enzymes are expected to show the advantages of those immobilized on inert matrices, namely, enhanced activity, modulated substrate selectivity, and improved stability (Matsumoto et al. 2004; Moura et al. 2015; Nakamura et al. 2006; Shi et al. 2015; Yuzbasheva et al. 2015).

At the molecular level, cell surface protein display consists in the co-translational fusion of a cell-wall-resident protein (CWP), or its anchoring domain (anchor), to a functional one (passenger) so that the latter is ultimately secreted and immobilized on the cell wall (Fig. 1). Despite its conceptual simplicity, the perfor-

Jesús Urbar-Ulloa, Paul Montaña-Silva, Ana Sofía Ramírez-Pelayo and