



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología

Obtención de dos construcciones genéticas que permitan interrumpir los genes *ALK1-CYP52* y *ALK2-CYP52* de *Debaryomyces hansenii*

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA:

C. Ali Jean-Martin Vega Gregorio



MÉXICO, CDMX

2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del **Dr. César Hugo Hernández Rodríguez** y el co-asesoramiento del **M. en C. Jossue Mizael Ortiz Álvarez**.

Este trabajo formó parte de los proyectos SIP:

- 20151102 “Fisiología de microorganismos hidrocarbonoclastas, fermentadores de la bebida tibicos, y fijadores de nitrógeno de la rizosfera del maíz y residuos de minas”.
- 20161850 “Relación del genotipo y fenotipo de microorganismos con los ciclos biogeoquímicos”.

Dedicatoria

Para mi mamá,
apoyo incondicional y pilar en mi formación.

Agradecimientos

A mi mamá: por todo su apoyo de principio a fin, por siempre esperar lo mejor de mí, acompañarme en los desvelos, apoyarme moralmente cuando fue necesario, y finalmente ser parte indispensable en mi formación personal y académica.

A mi padre, familia y hermanos: por acompañarme en mi crecimiento, enseñarme que a veces es necesario ser aguerrido y siempre ser perseverante.

A todos los amigos y compañeros que han llenado de valor y sentido mi vida, aún sin darse cuenta de ello, aunque algunos de estos hayan tomado caminos distintos, siempre les tendré gran estima.

A Claudia: que, aunque brevemente compartió camino conmigo, fue un gran apoyo y dejó en mi vida muchas enseñanzas y experiencias.

Al doctor César Hugo: por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, ser parte de un núcleo en donde pude encontrar grandes compañeros y amigos, y permitirme conocer su gran valor como persona. Sin duda una gran inspiración.

A la maestra Graciela González Lugo: por ser siempre tan sonriente que alegra verla, por todas sus enseñanzas como maestra de microbiología, por su recomendación tan acertada cuando estaba buscando proyecto para titulación.

A la doctora Graciela Castro: por todas sus enseñanzas como maestra y como persona, por enseñarme a mí y a tantos compañeros que siempre podemos dar más de nosotros, por la lucidez de sus palabras y consejos.

A la doctora Lourdes Villa y el doctor Antonio Ibarra: quienes son parte e indispensables del equipo de trabajo, y a quienes además de agradecimiento, les guardo admiración.

A mis compañeros de grupo, que al dar siempre lo mejor de ellos me impulsaron a dar lo mejor de mí, en especial quiero agradecer el apoyo y amistad de Elsa, Nancy, Tere, Yahad, Lalo, Ochoa, Jesús y Andrea.

A mis compañeros del laboratorio por todo su apoyo, enseñanzas, paciencia y materiales (que algunas veces tuve solicitarles): Jossue (compañero, maestro y amigo), Lily, Alejandra, Pamela, Bibiana, Abigail, Salvador, Pedro, Juan, Gustavo, Catalina, Jairo y todos los compañeros que haga falta mencionar.

A la Escuela Nacional Ciencias Biológicas y al Instituto Politécnico Nacional: por ser mi casa de estudios y mi alma mater.

Contenido

	Página
Índice de figuras	VII
Índice de cuadros	VIII
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Degradación microbiana de hidrocarburos	3
1.2. Enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos	4
1.3. Degradación de alcanos	4
1.4. Degradación de hidrocarburos por levaduras.....	6
1.5. Sistema enzimático citocromo P450.....	7
1.6. Características bioquímica y mecanismo de reacción de los citocromos P450	8
1.7. Enzimas P450 en levaduras	11
1.8. Generalidades de <i>Debaryomyces hansenii</i>	11
1.9. Antecedentes.....	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	16
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
5.1. Esquema general de trabajo	18
5.2. Material biológico	19
5.3. Obtención de las secuencias.....	19
5.4. Recuperación de células conservadas en glicerol.....	19
5.5. Extracción de DNA cromosómico	20
5.6. Obtención de las construcciones genéticas	21
5.6.1. Obtención de las construcciones genéticas mediante mutagénesis insercional	21
5.6.1.1. Obtención de una construcción genética con el gen <i>ALK1-CYP52</i> de <i>Debaryomyces hansenii</i> interrumpido con el casete <i>hph</i> (pJETalk1/hph)	21
5.6.1.1.1. Diseño de los iniciadores para la amplificación de <i>ALK1-CYP52</i>	22
5.6.1.1.2. Amplificación del gen <i>ALK1-CYP52</i>	24
5.6.1.1.3. Clonación del gen <i>ALK1-CYP52</i> en el vector de clonación pJET 1.2/Blunt	24

5.6.1.1.4. Transformación de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> 25	25
5.6.1.1.5. Extracción de DNA plasmídico	26
5.6.1.1.6. Confirmación de la construcción pJET-ALK1	27
5.6.1.1.7. Amplificación del casete de selección <i>hph</i>	27
5.6.1.1.8. Ligación de pJET-ALK1 con <i>hph</i> (obtención de la construcción pJETalk1/hph)	28
5.6.1.2. Obtención de una construcción genética con el gen <i>ALK2-CYP52</i> de <i>Debaryomyces hansenii</i> interrumpido con el casete <i>hph</i> (pJETalk2/hph)	29
5.6.1.2.1. Obtención de la construcción pJETalk2/hph.....	29
5.6.2. Obtención de una construcción genética con el gen <i>ALK1-CYP52</i> mediante PCR de doble fusión (DJ-PCR)	32
5.7. Transformación de <i>D. hansenii</i> Y-7624 con las construcciones obtenidas	37
6. RESULTADOS	40
6.1. Obtención de una construcción genética pJETalk1/hph.....	41
6.1.1. Comprobación de la clonación del gen <i>ALK1-CYP52</i> en el vector pJET (pJET-ALK1).....	41
6.1.2. Comprobación de la construcción pJETalk1/hph.....	42
6.2. Obtención de la construcción pJETalk2/hph	42
6.3. Confirmación por secuenciación del sitio y orientación de las inserciones en las construcciones pJETalk1/hph y pJETalk2/hph	43
6.4. Obtención de la construcción ALK1L-hph-ALK1R con el gen <i>ALK1-CYP52</i> interrumpido mediante DJ-PCR.....	45
6.5. Transformación de una cepa silvestre de <i>D. hansenii</i> Y-7624 con la construcción pJETalk2/hph	46
7. DISCUSIÓN.....	47
8. CONCLUSIONES.....	53
9. Prospectivas.....	53
10. REFERENCIAS.....	54
Anexo I Mapa de restricción de la construcción pJETalk1/hph	59
Anexo II Mapa de restricción de la construcción pJETalk2/hph	60
Anexo III Composición de los medios utilizados.....	61

Índice de figuras

Figura	Página
1. Esquema general de la degradación de hidrocarburos alifáticos y ácidos grasos	7
2. Mecanismo de reacción de los citocromos P450 monooxigenasa	9
3. Sistemas enzimáticos P450 clase II	10
4. Diagrama general de trabajo	18
5. Diagrama para la obtención de una construcción genética con el gen <i>ALK1-CYP52</i> de <i>D. hansenii</i> interrumpido con el casete de selección <i>hph</i>	23
6. Vector de clonación pJET1.2	25
7. Diagrama para la obtención de una construcción genética con el gen <i>ALK2-CYP52</i> de <i>D. hansenii</i> interrumpido con el casete de selección <i>hph</i>	31
8. Esquema para la realización de la DJ-PCR	33 y 34
9. Comprobación de la construcción pJET-ALK1 por amplificación por PCR y electroforesis en agarosa de un fragmento del gen <i>ALK1-CYP52</i> y digestión con <i>BglII</i>	41
10. Comprobación de la construcción pJETalk1/hph por amplificación por PCR y electroforesis en agarosa y digestión con <i>BamHI</i> y con <i>BglII</i>	42
11. Comprobación de la construcción pJETalk1/hph por amplificación por PCR y electroforesis en agarosa y digestión con <i>BamHI</i> , con <i>BglII</i> y con <i>EcoRV</i>	43
12. Confirmación por secuenciación del sitio y orientación de la inserción en la construcción pJETalk1/hph	44
13. Confirmación por secuenciación del sitio y orientación de la inserción en la construcción pJETalk2/hph	44
14. Electroferogramas de los amplicones para la realización de la DJ-PCR y electroferograma de la DJ-PCR	45
15. Morfología microscópica de <i>D. hansenii</i> a 1000x	46
16. Modelo de sustitución por recombinación homóloga usado el vector pJETalk1/hph en <i>Debaryomyces hansenii</i>	51

Índice de cuadros

Cuadros	Página
1. Enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos	5
2. Secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación de <i>ALK1-CYP52</i>	24
3. Mezcla y condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación de <i>ALK1-CYP52</i>	24
4. Secuencia de Iniciadores utilizados para la amplificación del gen <i>hph</i> para interrumpir pJET-ALK1	27
5. Mezcla y condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación del gen <i>hph</i> .	27
6. Secuencia de Iniciadores utilizados para la amplificación del gen <i>hph</i> para interrumpir pJET-ALK2	29
7. Mezcla y condiciones reacción en las que se llevó a cabo la amplificación del gen <i>hph</i>	30
8. Secuencia de Iniciadores utilizados para la amplificación de los fragmentos <i>ALK1L</i> y <i>ALK1R</i> , el casete <i>hph</i> , y la construcción <i>ALK1L-hph-ALK1R</i>	35
9. Mezclas de reacción para realizar la amplificación de los fragmentos <i>ALK1L</i> y <i>ALK1R</i> , y el casete <i>hph</i>	35
10. Condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos <i>ALK1L</i> y <i>ALK1R</i>	36
11. Condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación del casete <i>hph</i>	36
12. Mezcla de y condiciones reacción en las que se llevó a cabo la amplificación y construcción de <i>ALK1L-hph-ALK1R</i> por DJ-PCR.	37

Resumen

Los citocromos P450 codificados por la familia de genes *CYP52* son enzimas que tienen como sustrato principal n-alcanos (lineales o ramificados) y ácidos grasos principalmente. Las enzimas de estudio son capaces de oxidar estos compuestos mediante una reacción de hidroxilación como primer paso de las rutas metabólicas encargadas de su degradación. Estas enzimas son claves para evaluar la capacidad hidrocarbonoclasta en diversas levaduras, principalmente del orden Saccharomycetales, mismas que poseen diversas subfamilias familia de genes *CYP52*.

Debaryomyces hansenii es una levadura halotolerante de importancia biotecnológica que ha sido aislada periódicamente a partir de ambientes contaminados por derrames de petróleo. El genoma de esta levadura alberga 5 genes *CYP52*, de los cuales la expresión de los genes *ALK1* y *ALK2* es inducible en presencia de n-alcanos como única fuente de carbono disponible.

Para elucidar la función de estos genes, en este trabajo, se diseñaron dos construcciones genéticas que permitirán obtener cepas mutantes de *D. hansenii*, carentes de los genes *ALK1-CYP52* y *ALK2-CYP52*, para su posterior caracterización. La obtención de las construcciones genéticas se realizó por dos técnicas, las cuales fueron PCR de doble fusión (DJ-PCR) y por interrupción insercional, teniendo éxito con la segunda técnica. Una vez obtenidas las construcciones genéticas, dos métodos de electroporación para transformar a *D. hansenii* fueron ensayados, sin embargo, no se lograron obtener las mutantes hasta el momento. Si bien son necesarios más esfuerzos para lograr interrumpir los genes blanco, las construcciones genéticas construidas permitirán obtener mutantes de *D. hansenii* carentes de los genes *ALK1-CYP52* y *ALK2-CYP52*, o de ser necesario, se podrá partir de estas construcciones para el rediseño de construcciones genéticas que permitan obtener las mutantes deseadas y caracterizar la función y expresión de los genes de estudio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Degradación microbiana de hidrocarburos

En la naturaleza, existe una gamma diversa de microorganismos que tienen la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, se les conoce como hidrocarbonoclastas. El estudio de esta capacidad ha permitido plantear las bases para el desarrollo de tecnologías para la biorremediación de ecosistemas contaminados con petróleo o sus derivados. (Das y Chandran, 2011)

La susceptibilidad y eficiencia de los hidrocarburos a ser degradados por un microorganismo o una comunidad microbiana dependerá de distintos factores como el tamaño, estructura química y conformación estereoquímica de la molécula. En cuanto a la facilidad de la degradación biológica de los hidrocarburos generalmente se menciona el siguiente orden: n-alcanos lineales > alcanos ramificados > monoaromáticos > cicloalcanos > poliaromáticos > asfaltenos y resinas, siendo estos últimos los más recalcitrantes (Csutak *et al.*, 2010; Das y Chandran, 2011).

La capacidad hidrocarbonoclasta microbiana también depende de diversos factores como la complejidad del sustrato, el estado físico y la concentración del hidrocarburo, la tensión de oxígeno, el pH, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y el potencial genético propio del microorganismo o comunidad de microorganismos. Otro factor importante es la capacidad de producir sustancias que faciliten la asimilación de los hidrocarburos, como los biosurfactantes (compuestos que emulsifican moléculas altamente hidrofóbicas y que aumentan la superficie de contacto con las bacterias y sus sistemas enzimáticos) (Das y Chandran, 2011).

En el caso de la degradación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) se han descrito varias vías metabólicas. Algunas bacterias y algas realizan la oxidación de los HPA mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno mediante la acción catalítica de dioxigenasas, quienes producen un compuesto intermediario *cis*-dihidriol, el cual posteriormente es deshidrogenado formando el catecol correspondiente. Por su parte, muchos hongos son capaces de oxidar HPA por la vía de los citocromo monooxigenasas P450, los cuales incorporan un átomo de oxígeno produciendo arenóxido, compuesto que puede ser transformado a *trans*-dihidriol por la acción posterior de la enzima epóxido hidrolasa, o puede sufrir

rearreglos no enzimáticos debido a inestabilidad intrínseca produciendo fenol, un compuesto que puede conjugarse con glucosa, ácido glucorónico, sulfato o xilosa (Ramírez-Elías, 2014).

1.2. Enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos

Las enzimas microbianas involucradas en el inicio de la degradación de hidrocarburos poseen especificidad para diversas familias de sustratos. Por lo regular, la biodegradación es más eficiente en condiciones aeróbicas (Das y Chandran, 2011). Se han propuesto diversos sistemas enzimáticos aeróbicos en los que se encuentran involucrados distintas oxigenasas (Cuadro 1.), dentro de estas enzimas se encuentran los citocromos P450. Estas enzimas tienen un papel importante en la degradación microbiana de petróleo, de hidrocarburos clorados, de aditivos de combustibles, entre muchos otros compuestos (Hannemann *et al.*, 2007; Das y Chandran, 2011).

1.3. Degradación de alcanos

Los principales mecanismos para la asimilación de n-alcanos observados en bacterias, hongos, levaduras y algas son llevados a cabo bajo condiciones aeróbicas por enzimas alcano hidroxilasas que incorporan oxígeno a los extremos metilo produciendo generalmente un alcohol primario (Czutack, 2010; Peixoto *et al.*, 2011; Das y Chandran, 2011; Ramírez-Elías, 2014). Algunas de estas enzimas están señaladas en el cuadro 1.

Cuadro 1. Enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos

Enzimas	Substratos	Microorganismos
Metano monooxigenasa soluble	C1-C8. Alcanos, alquenos y cicloalcanos	<i>Methylococcus</i> <i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylocella</i>
Metano monooxigenasa membranal	C1-C5. (halogenados), Alcanos y cicloalcanos	<i>Methylococcus</i> <i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i>
Alcano hidroxilasa AlkB	C5-C16. Alcanos, ácidos grasos, alquil bencenos, alquenos, cicloalcanos	<i>Pseudomonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Mycobacterium</i>
Citocromo P450	C10-C16. Alcanos, ácidos grasos	<i>Candida maltosa</i> <i>Candida tropicalis</i>
Sistema bacteriano P450 oxigenasa	C5-C16. Alcanos, cicloalcanos	<i>Acinetobacter</i> <i>Caulobacter</i> <i>Mycobacterium</i>

Tomado de Ortiz-Álvarez, 2014.

Posteriormente el producto de la hidroxilación (un alcohol generalmente) sufre una serie de oxidaciones por las enzimas alcohol deshidrogenasa (o alcohol oxidasa en el caso de los eucariontes) y aldehído deshidrogenasa para formar un ácido graso, el cual puede ser incorporado a la vía de beta o gamma oxidación para dar lugar a la formación de Acetil-CoA (Craft *et al.*, 2003; Kogure, 2007; Peixoto *et al.*, 2011; Ortiz-Álvarez, 2014). Este intermediario metabólico incorpora el residuo acetato al ciclo de Krebs, donde se forma NADH (Nicotinamida adenín dinucleótido) que se incorpora a la cadena respiratoria, se forma un gradiente electroquímico de electrones y finalmente se acopla a la síntesis de ATP con ayuda de la ATP sintetasa. También el Acetil-CoA participa en la formación de otros metabolitos intermediarios en otras rutas anapleróticas y anabólicas como la síntesis de lípidos y la gluconeogénesis (Peixoto *et al.*, 2011).

1.4. Degradación de hidrocarburos por levaduras

Los estudios acerca de la capacidad hidrocarbonoclasta en levaduras son recientes y, aunque se sabe que poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía, son pocos los reportes acerca de los mecanismos que utilizan. Hasta el 2010, derivado de diversos estudios de biorremediación, se habían descrito 14 géneros de levaduras hidrocarbonoclasta entre los que se incluyen especies de los géneros *Candida*, *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Metchnikowia*, *Pichia*, *Clavispora* y *Rhodotorula* (Csutak, 2010).

La capacidad de diversas especies de levaduras para usar n-alcanos y otros hidrocarburos (como los cicloalcanos, los alquenos, los alquilbencenos y compuestos poliaromáticos) como única fuente de carbono y energía está mediada por la existencia de múltiples copias de genes *CYP52*, codificantes para los citocromos P450 encargados de la hidroxilación de los n-alcanos (Das & Chandran, 2010; Ortiz-Álvarez, 2015). Estas enzimas son inducidas principalmente por n-alcanos, sobre todo cuando se encuentran como la única fuente de carbono disponible (Iida *et al.*, 2000; Csutak, 2010).

El mecanismo de asimilación de los hidrocarburos alifáticos, en especial los n-alcanos ha sido estudiado principalmente en especies del género *Candida* y *Yarrowia*. Los n-alcanos pueden ser metabolizados mediante las vías de la beta o la gamma oxidación, donde el paso inicial y limitante es la hidroxilación de las cadenas hidrocarbonadas, esta reacción es catalizada por monooxigenasas de la familia de las P450 (Figura 1) (Das & Chandran, 2010).

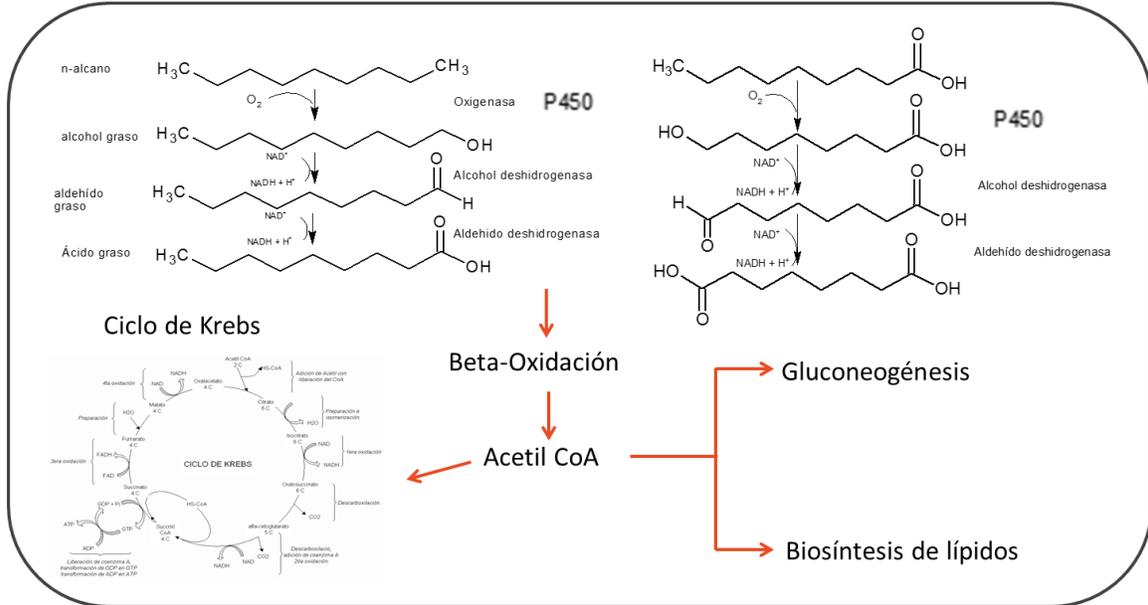


Figura 3. Esquema general de la degradación de hidrocarburos alifáticos y ácidos grasos.

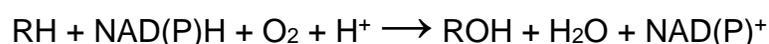
1.5. Sistema enzimático citocromo P450

Las enzimas citocromo P450 constituyen una superfamilia de proteínas del tipo hemo-tiolato, las cuales están ampliamente distribuidas prácticamente en todos los grupos biológicos (Danielson, 2002). Una característica de estas enzimas es la de poseer un residuo de cisteína en un sitio conservado al cual está unido el grupo hemo (Graham-Lorence *et al.*, 1995). Existen cientos de enzimas P450, que, por convención, su nomenclatura consiste en las letras *CYP* seguido de un número el cual refiere a la familia y después una letra para indicar la subfamilia a la que pertenecen. Hasta el momento, se han identificado aproximadamente 276 familias, las cuales mantienen entre sí un 40% de identidad aminoacídica, estas enzimas suelen agruparse en 9 clases (clase I, clase II, clase III, etc.) de acuerdo a las proteínas asociadas que participan en la transferencia de electrones (Hannemann *et al.*, 2007; Črešnar & Petričse, 2010).

Los citocromos P450 que participan en la hidroxilación de n-alcanos están codificados por los genes *CYP52*. Estos genes han sido identificados en especies correspondientes al género *Candida*, además de *Yarrowia lipolytica*, *Pichia farinosa* y *Debaryomyces hansenii*. Los citocromos P450 de la familia *CYP52* están agrupados en la clase II, se localizan en el retículo endoplásmico (Yadav & Loper, 1999; Iida *et al.*, 2000; Csutak, 2010; Črešnar & Petričse, 2010).

1.6. Características bioquímica y mecanismo de reacción de los citocromos P450

Los citocromos P450 son capaces de catalizar distintas reacciones como la oxidación, la epoxidación, la desalquilación, la deshalogenación, la isomerización, la hidroxilación, la desulfoxidación, la desulfuración y la N-óxido reducción entre otras (Hannemann *et al.*, 2007; Hernández-Gama, 2008; Ortiz-Álvarez, 2016;), siendo la reacción de hidroxilación la actividad mejor descrita (Käppeli, 1986; Danielson, 2002; Ortiz-Álvarez, 2015). La hidroxilación en la molécula blanco ocurre por efecto de las especies reactivas de oxígeno que se forman a partir del oxígeno molecular, mientras que el segundo átomo de oxígeno se libera como parte de una molécula de agua. La ecuación general de la reacción es la siguiente:



Durante el ciclo catalítico, el citocromo P450 une las moléculas de sustrato y oxígeno, acepta dos electrones provenientes del NAD(P)H y dos protones, divide el oxígeno molecular, inserta un solo átomo de oxígeno en el sustrato conjugado y finalmente libera una molécula de agua y el sustrato oxidado como productos de la reacción. Los citocromos P450 permanecen inactivos hasta la unión de una molécula sustrato, lo que desencadena en la transferencia de un solo electrón que reduce el hierro férrico a su forma ferrosa. El complejo citocromo P450-sustrato a continuación se une y reacciona con el oxígeno molecular para producir un complejo dioxígeno inestable unido al hierro ferroso que acepta la transferencia de un segundo electrón. Posteriormente, el complejo es reducido ocupando dos protones, el enlace dioxígeno se escinde y una molécula de agua se pierde. Esto produce un hemo-

ferril catalíticamente reactivo o "oxenoid" (oxofierro IV) intermedio. En el paso final el átomo de oxígeno del ferril es transferido al sustrato. Después de que ha reaccionado con el oxígeno del ferril, se libera el sustrato hidroxilado (Figura 2.) (Werck-Reichard y Feyereisen, 2000; Danielson, 2002;).

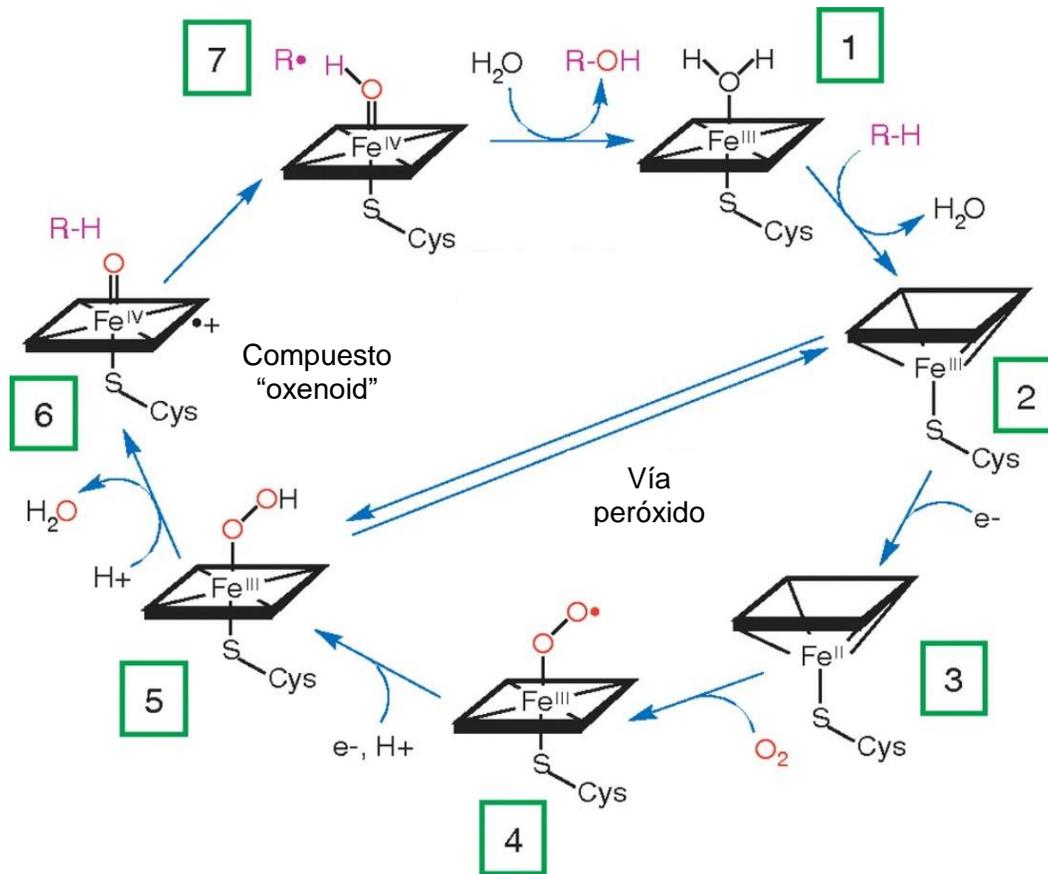


Figura 4. Mecanismo de reacción de los citocromos P450 monooxigenasa (Ortiz-Álvarez, 2016).
 1, activación de sitio activo; 2, reducción del Fe^{III}; 3, incorporación de oxígeno molecular; 4, segunda reducción; 5, formación del compuesto oxenoid; 6, interacción con el sustrato; 7, hidroxilación del sustrato.

La mayoría de los P450 realizan su función acopladas a un sistema de transferencia de electrones en el que intervienen una o más moléculas siendo el NADH o el NADPH las moléculas donadoras de electrones (Figura 3.). En los sistemas enzimáticos P450 clase II de eucariontes anclado a retículo endoplásmico,

se encuentran la proteína P450 y la proteína citocromo P450 reductasa (CPR) la cual tiene grupos prostéticos FAD (flavín adenín dinucleótido) y FMN (Flavín mononucleótido), esta transfiere electrones desde el NAD(P)H al citocromo P450. Adicionalmente algunos reportes consideran también la participación del citocromo *b5* reductasa en la transferencia de electrones hacia P450 (Hannemann *et al.*, 2007; Črešnar & Petričse, 2010).

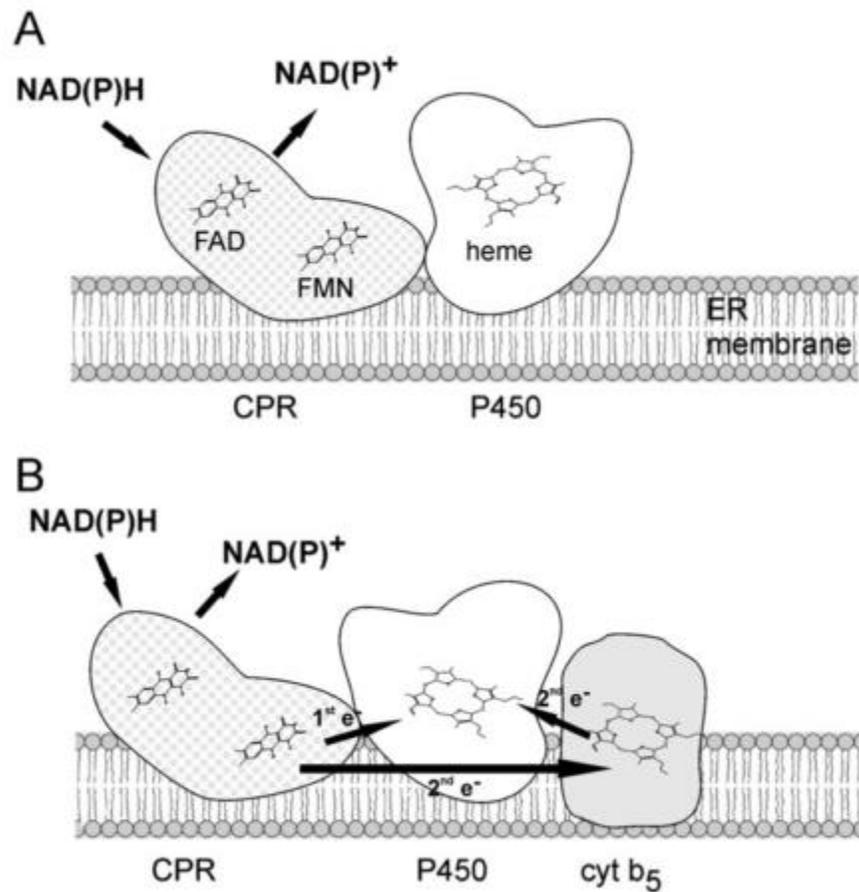


Figura 3. Sistemas enzimáticos P450 clase II (Črešnar & Petričse, 2010).

1.7. Enzimas P450 en levaduras

Las enzimas P450 de levaduras están codificados por familias de genes CYP52 que participan en diversas funciones metabólicas, entre ellas la capacidad hidrocarbonoclasta. Estas familias de genes se han encontrado en distintas levaduras como *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii*, entre otras (Yadav & Loper, 1999). Si bien aún no se tiene claro el papel fisiológico particular de cada P450, la diversidad de enzimas observada podría ser un reflejo de la versatilidad fisiológica o fenotípica de la especie, lo cual podría suponer una ventaja selectiva en ambientes que cambian en sus condiciones (Črešnar & Petričse, 2010).

1.8. Generalidades de *Debaryomyces hansenii*

D. hansenii es una levadura perteneciente al phylum Ascomycota, familia Saccharomycetaceae. Es una especie haploide, teleomórfica y heterotálica con un genoma conformado por 7 cromosomas de tamaño entre 1,250 kb y 2,330 kb sumando un total de 12,200 kb (Kumar, 2012). Es tolerante a concentraciones salinas hasta del 24%, es criotolerante y osmotolerante, capaz de metabolizar ácido láctico y ácido cítrico, y es aerobio estricto. Es una especie frecuentemente encontrada en diferentes tipos de quesos, donde tiene actividad proteolítica y lipolítica (Lépingle *et al.*, 2000). Esta levadura es una especie cosmopolita en ambientes acuáticos y también el ascomiceto más común en ambientes marinos, probablemente dada su capacidad osmotolerante y de poder utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono (Yadav & Loper, 1999).

D. hansenii junto con otras levaduras y hongos filamentosos, ha sido aislada en ambientes marinos contaminados a causa de derrames de petróleo. *D. hansenii* alberga una familia de genes CYP52 codificantes para enzimas P450 (Yadav & Loper, 1999; Dujon *et al.*, 2004), lo que sugiere que esta especie tiene un papel importante en la degradación de hidrocarburos y otros contaminantes derivados del petróleo, por lo que podría tener aplicaciones en biorremediación.

1.9. Antecedentes

Los principales estudios acerca de los genes *CYP52* en levaduras se han realizado en distintas especies de *Candida* y en *Y. lipolytica*. En esta última levadura, se ha detectado que alberga 8 genes *ALK-CYP52*, asimismo, al obtenerse mutantes en estos genes se encontró que las mutantes carentes de los genes *ALK1* y *ALK2* fueron incapaces de degradar decano, tetradecano y hexadecano como única fuente de carbono. Por otra parte, las mutantes en los otros genes *ALK* no pierden la capacidad para degradar de n-alcanos de 10 a 16 átomos de carbono (Iida *et al.*, 2000).

En el grupo de trabajo se han detectado varios genes *CYP52* en varias especies de levaduras hidrocarbonoclastas. En uno de estos estudios, la expresión de algunos genes *CYP52* de levaduras aisladas del tracto digestivo del escarabajo descortezador del género *Dentroctonus* se asoció a la biotransformación por oxidación del alfa-pineno (Campos-Guzmán, 2005; Hernández-Gama, 2008). Recientemente, cepas de *Y. lipolytica* aisladas del suelo de una gasolinera fueron capaces de utilizar algunos hidrocarburos alifáticos lineales como única fuente de carbono con una eficiencia de crecimiento similar a que presenta con glucosa (Ortiz-Álvarez, 2014). En otro estudio realizado por el grupo de trabajo, se describió la capacidad hidrocarbonoclasta de *Candida saitoana* (y otras levaduras) y se demostró que esta levadura alberga en su genoma tres genes *CYP52* ortólogos de genes de *D. hansenii*.

Los genes *ALK1* y *ALK2* de *D. hansenii* presentan una identidad aproximadamente del 60% con otros genes *CYP52* inducibles en presencia de n-alcanos identificados en otras especies de *Candida*, sin embargo, la función y expresión de estos genes no han sido caracterizados (Yadav & Loper, 1999). No obstante, el genoma de *D. hansenii* posee 5 genes *CYP52* dispuestos en sus cromosomas (Dujon *et al.*, 2004), por lo es posible que además de otorgarle a la levadura la capacidad hidrocarbonoclasta, estos genes pudieran estar involucrados otros procesos metabólicos.

En un análisis *in silico* realizado en el grupo de trabajo se detectó que las regiones promotoras de los genes *ALK1* y *ALK2*, además de estar involucrados en la degradación de alcanos, eran potencialmente inducidos en diversas condiciones ambientales como el estrés por hipoxia, durante el “mating” o la formación de pseudomicelio (Ortiz-Álvarez, 2014). El resto de los genes *ALK* presentaron sitios promotores inducidos por ácidos grasos, esteroides, estrés por nitrógeno, resistencia a antifúngicos, y halotolerancia, esto sugiere que podrían estar involucrados en la actividad hidrocarbonoclasta, pero que se inducen bajo condiciones ambientales específicas. Asimismo, este grupo de genes podrían estar involucrados en otros procesos fisiológicos tales como la degradación y la biosíntesis de ácidos grasos, la resistencia a antimicóticos, o la biosíntesis de ergosterol (Ortiz-Alvarez, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Existen diversos estudios en donde se describe la capacidad para la degradación de hidrocarburos por distintas bacterias y hongos filamentosos, sin embargo, son pocos los estudios acerca de la capacidad hidrocarbonoclasta por levaduras.

Se sabe que las enzimas citocromo P450 codificadas por genes de la familia *CYP52* están implicadas en diversas funciones, entre ellas el catabolismo de ácidos grasos y la degradación de hidrocarburos. Dichos genes están ampliamente dispersos en las levaduras otorgándoles la capacidad para desarrollarse en diversas condiciones ambientales.

Debaryomyces hansenii es una levadura de importancia biotecnológica que alberga 5 genes *CYP52* aun no caracterizados. Este estudio pretende elucidar la expresión de estos genes bajo distintas condiciones ambientales y fuentes de carbono disponibles, para obtener información que permita evaluar su uso potencial en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo y sus derivados, especialmente en aquellos que presentan una alta presión osmótica derivada de la alta concentración de cloruro de sodio.

3. HIPÓTESIS

Debaryomyces hansenii alberga una familia de genes *CYP52* que codifican para proteínas implicadas en distintos procesos metabólicos, cuya expresión diferencial podría permitir a la levadura la capacidad de adaptarse a ambientes con fuertes presiones de selección y con hidrocarburos como únicas fuentes de carbono y energía.

Las herramientas moleculares para obtener mutantes de *D. hansenii* en los genes *ALK-CYP52* permitirán conocer la función de las proteínas que codifican a través del fenotipo observado.

Puede predecirse que las mutantes en los genes *ALK-CYP52* no sean capaces de hidroxilar hidrocarburos de un número de átomos de carbono específico.

Dadas las funciones de los citocromos P450 codificados por los genes *CYP52* es posible que su expresión se dé bajo condiciones de estrés como inanición de nitrógeno, alta concentración de sales, y estén sometidos a represión por glucosa.

Los citocromos P450 codificados por los genes *CYP52* son proteínas funcionalmente especializadas que se expresan en conjunto y diferencialmente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Obtener construcciones genéticas potencialmente útiles para la obtención de mutantes de *Debaryomyces hansenii* de los genes *ALK1-CYP52*, *ALK2-CYP52* y *ALK3-CYP52*.

4.2. Objetivos particulares

- Diseñar y generar construcciones genéticas de los genes *ALK1-CYP52*, *ALK2-CYP52* y *ALK3-CYP52*
- Transformar una cepa silvestre de *D. hansenii* con las construcciones obtenidas, para intentar obtener mutantes carentes de los genes en estudiados.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1. Esquema general de trabajo

Para lograr el objetivo planteado se siguió el siguiente diagrama de trabajo:

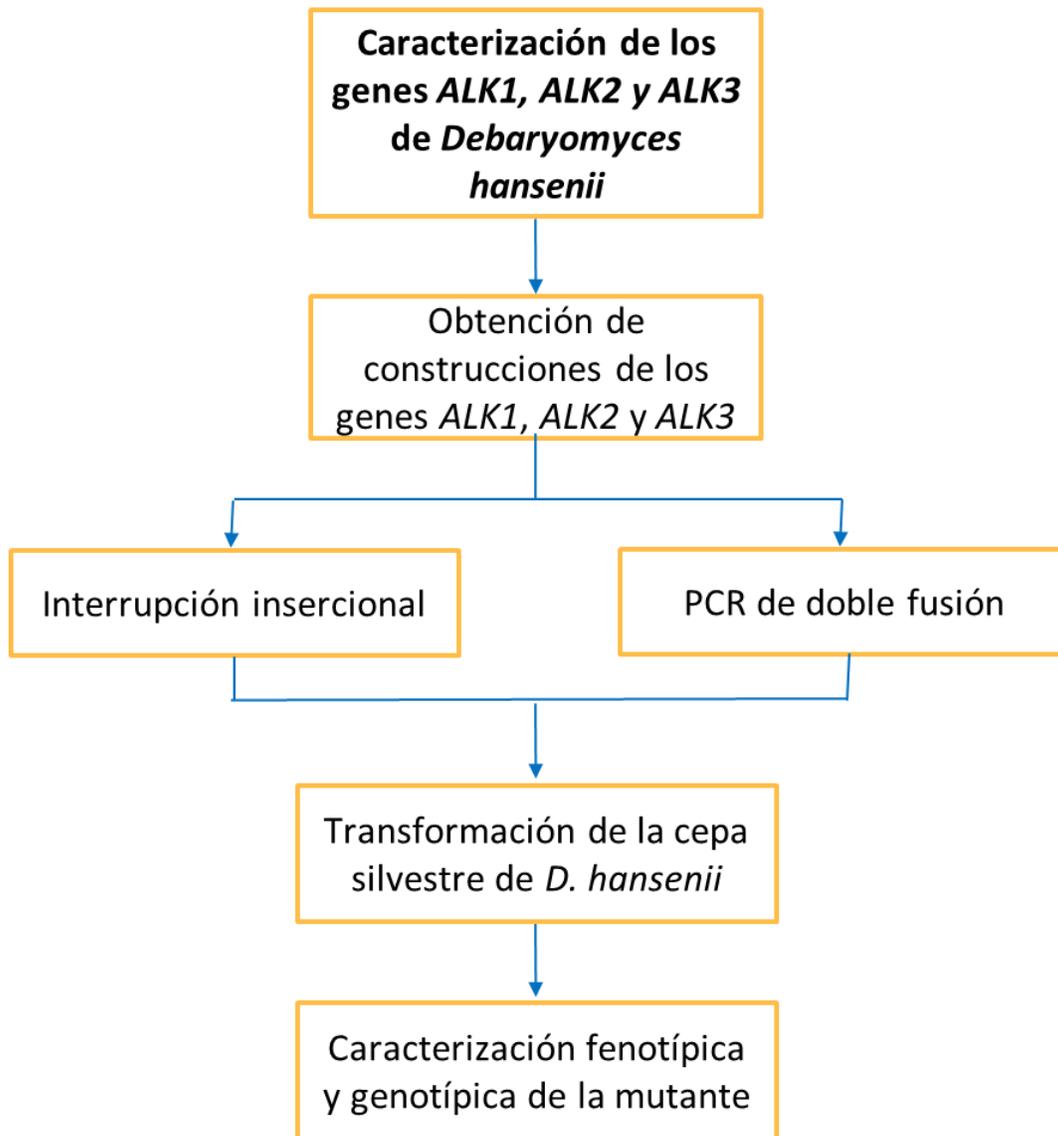


Figura 4. Diagrama general de trabajo

5.2. Material biológico

- Cepa de *D. hansenii* Y-7624 (US Agriculture Department)
- Cepa DH10B de *E. coli*

Medios de cultivo

- Medio YPD
- Medio YPS
- Medio LB

Vectores

- pJET 1.2/Blunt

5.3. Obtención de las secuencias

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes de estudio con el fin de diseñar los iniciadores específicos, así como conocer los sitios de restricción presentes en las secuencias utilizando la herramienta en línea NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003). Estas secuencias se obtuvieron a partir de la base de datos Nucleotide del servidor en línea NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.4. Recuperación de células conservadas en glicerol

La cepa de *D. hansenii* Y-7624 que se encontraba conservada en glicerol al 25% a -70°C se inoculó y sembró por estría cruzada en cajas con medio YPD que se incubaron a 28°C por 48 a 72 h. La pureza del cultivo se evaluó observando la morfología colonial y microscópica mediante tinción simple con cristal violeta. A partir de las colonias puras se tomó un inóculo para su conservación en criotubos con 1 mL de glicerol al 25% a -70°C para usos posteriores.

5.5. Extracción de DNA cromosómico

La extracción de DNA se realizó de acuerdo al método por Hoffman y Winston modificado (Hoffman & Winston, 1989; Vera-Ponce de León, 2011), cuyo procedimiento en breve fue el siguiente: a partir de un cultivo de 24 h en medio YPD, se colectó la biomasa y se resuspendió en un tubo microtubo con 500 μ L de agua estéril, se agregaron 200 μ L solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM; NaCl 10 mM; SDS 1%; Tritón X-100 2%), y aproximadamente 0.5 g de perlas de vidrio y 200 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se realizó el rompimiento mecánico de las células dando pulsos en un Vórtex durante 30 seg, e inmediatamente se colocó en hielo durante 30 seg. Estos dos últimos pasos se repitieron seis veces más. Los lisados celulares se incubaron en hielo 5 min y se añadieron 200 μ L de solución reguladora TE, se homogeneizó y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min, después se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo y se añadieron 200 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo. El procedimiento de extracción con cloroformo-alcohol isoamílico se repitió tres veces. Se recuperó la fase acuosa, se agregó 1 mL de isopropanol, se homogeneizó por inversión y se incubó a -20°C durante al menos 2 h. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol 70%. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se evaporó el solvente restante en un concentrador a 45°C durante 3 min. Finalmente, el DNA se resuspendió con 40 μ L de agua inyectable.

Posteriormente se evaluó la calidad y la integridad del DNA obtenido por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y por otra parte se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro para microvolúmenes ACTGene ASP-3700®.

5.6. Obtención de las construcciones genéticas

Para la obtención de las construcciones genéticas con los genes de interés interrumpidos se diseñaron dos estrategias: mutagénesis insercional mediante la inserción de un casete con un marcador de selección (Gutiérrez *et al.*, 1996); y mediante la construcción de un gen híbrido que consta del gen de interés interrumpido con el casete de selección de resistencia a higromicina B *hph*, utilizando PCR de doble fusión (DJ-PCR) (Nayak *et al.*, 2005; Swewcyk, 2006;).

5.6.1. Obtención de las construcciones genéticas mediante mutagénesis insercional

5.6.1.1. Obtención de una construcción genética con el gen *ALK1-CYP52* de *Debaryomyces hansenii* interrumpido con el casete *hph* (pJETalk1/hph)

Para la obtención de esta construcción genética se llevó a cabo la siguiente metodología, descrita de manera general, la cual se presenta a continuación:

1.- Se diseñaron iniciadores específicos y se realizó la amplificación gen *ALK1-CYP52* de 2,181 pares de bases. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% tenido con bromuro de etidio.

2.- El tratamiento del inserto y su posterior clonación se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante, detalladas a continuación: el producto de PCR se clonó en el vector pJET 2.1/Blunt (obteniendo la construcción pJET-ALK1 de 5,155 kb), con esta construcción se transformaron células quimiocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B, se extrajo el DNA plasmídico de las colonias mutantes y se realizó una PCR y restricciones enzimáticas para comprobar que se había obtenido la construcción deseada.

3.- La construcción anterior se linearizó mediante una restricción enzimática con *Bam*HI, cuyo sitio de restricción (GGATCC) se encuentra en la secuencia del gen *ALK1-CYP52*. Posteriormente se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la recircularización de la construcción. Por otro lado, mediante el uso de iniciadores degenerados diseñados para este experimento, se realizó la

amplificación del casete de selección *hph*, dichos iniciadores tienen la secuencia nucleotídica terminal que reconoce la enzima *Bam*HI.

4. Dado que tanto el vector pJET-ALK1 y el casete de selección tendrán extremos cohesivos (una vez realizada la restricción con *Bam*HI), mediante la acción de una ligasa se clonó el gen *hph* en el vector, quedando interrumpido el gen de interés (pJETalk1/*hph* de 7,896 kb). Al igual que en el punto 2, se transformaron células quimiocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B con la construcción, se extrajo el DNA plasmídico de las colonias mutantes y se realizó una PCR y restricciones enzimáticas para comprobar que se había obtenido la construcción deseada.

Una vez obtenida la construcción genética pJETalk1/*hph*, la siguiente fase del trabajo consistió en utilizar dicho vector para transformar cepas silvestres de *D. hansenii*, y hacer una caracterización fenotípica de las colonias obtenidas presuntamente mutantes para el gen *ALK1-CYP52*.

De manera similar se realizó una construcción genética con el gen *ALK2-CYP52* interrumpido con un casete de selección (pJETalk2/*hph*) (ver sección 5.6.1.2.).

La representación gráfica del ensayo *in silico* utilizando el programa SnapGene® Viewer V. 3.2.1. para la obtención de la construcción genética pJETalk1/*hph* mediante interrupción insercional se observa en la figura 5.

5.6.1.1.1. Diseño de los iniciadores para la amplificación de *ALK1-CYP52*

El diseño de los iniciadores se realizó de manera manual a partir de las secuencias obtenidas, utilizando el servidor web IDT oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para determinar la T_m , ΔG y número de estructuras secundarias resultantes de los iniciadores diseñados. Finalmente utilizando el programa SeaView 4.6.1 se comprobó la especificidad de los iniciadores a fin de evitar que en la reacción de PCR se obtuvieran amplicones inespecíficos.

5.6.1.1.2. Amplificación del gen *ALK1-CYP52*

El gen se amplificó mediante una reacción de PCR a partir del DNA de *D. hansenii* dadas las siguientes condiciones (Cuadros 2 y 3):

Cuadro 2. Secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación de *ALK1-CYP52*

Iniciador	Secuencia
ALK1F	5'-TGAAGGATTAATGCCCCAAATAACATAC-3'
ALK1R	5'-ATTAATATATTTCAATGCCACCCTCGC-3'
Tamaño del producto 2,181 pb	

Cuadro 3. Mezcla y condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación por PCR de *ALK1-CYP52*.

Reactivo	Cantidad
Regulador 10x	1x
MgCl ₂	2.5 mM
DNTP's	0.2 mM
Iniciadores	0.4 µM
Taq polimerasa	1 U
DNA	100 ng
Agua	Hasta 25 µL

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	30
Alineamiento	56	1	
Extensión	72	2.5	
Extensión final	72	10	1

5.6.1.1.3. Clonación del gen *ALK1-CYP52* en el vector de clonación pJET 1.2/Blunt

Una vez obtenido el gen de interés se procedió a hacer la purificación de este utilizando el kit comercial de purificación "DNA Clean and Concentrator™" (Zymo Research®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la

clonación en el vector pJET1.2/Blunt utilizando el kit de clonación clonJET (Thermo Scientific®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El vector de clonación pJET1.2/blunt (Figura 5.3.) tiene tamaño de 2974 pb y acepta insertos de hasta 10 kb. Dentro de los elementos genéticos que tiene este vector se encuentra el gen *eco47IR* regulado por el promotor P_{lacUV5} el cual codifica para una DNAsa y funciona como marcador de selección debido a que el DNA foráneo se inserta interrumpiendo el marco de lectura de este gen. También contiene el gen *bla* (Ap^R) que codifica para una beta-lactamasa confiriéndole resistencia a ampicilina a las clonas transformantes. Su origen de replicación *rep*(pMB1) permite un número de 15 copias por célula.

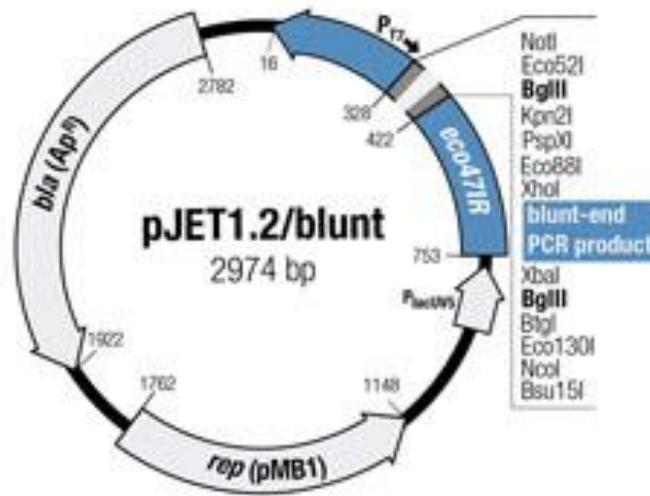


Figura 6. Vector de clonación pJET1.2

5.6.1.1.4. Transformación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli*

Con la reacción anterior se procedió a hacer la transformación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B siguiendo el método descrito por Froger y Hall (2007) con algunas modificaciones. En primer lugar, se agregaron 5 μ L del DNA a 200 μ L de células quimiocompetentes y se incubaron en un baño de hielo durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación se dio un choque térmico a 42°C durante 90 seg y se transfirieron las células inmediatamente a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 0.5 mL de medio LB (Luria Bertani) y se

incubó la suspensión a 37°C durante una hora a 500 rpm. Concluido el tiempo de incubación se sembró por triplicado 200 µL de la suspensión en placas con medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

5.6.1.1.5. Extracción de DNA plasmídico

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las placas del experimento anterior, se procedió a seleccionar las colonias recombinantes, es decir todas aquellas que lograron crecer el medio y que no eran colonias satélites de las colonias recombinantes. Posteriormente, se resembraron en tubos de ensayo de tapón de rosca, los cuales contenían 5 mL de medio LB con ampicilina y se incubaron a 37°C por 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la extracción del DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina diseñada por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones. Se cosecharon 3 mL de las células por centrifugación a 14,000 rpm por 10 min en un microtubo. Al paquete celular se agregaron 100 µL de solución I de Birboim y Doly (BD), se agitó en el Vórtex y se incubó durante 5 min en hielo. Después se adicionaron 200 µL de la solución II BD, se agitó por inversión e incubó por 5 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 150 µL de la solución III BD, se agitó por inversión y se incubó a -20°C por 40 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, y se recolectó la fase acuosa, a la que se adicionó 1 mL de isopropanol, y se incubó a -20°C durante 20 min para la precipitación del DNA. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante. El paquete, se resuspendió con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante. Se retiró el exceso de etanol, y el paquete de DNA se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA se hidrató con 30 µL de H₂O libre de nucleasas. La calidad e integridad de los plásmidos fue comprobada corriendo en un gel de agarosa al 1%, durante 30 min a 90 V y 400 mA. Los plásmidos fueron visualizados con la tinción en bromuro de etidio y mediante su exposición en luz UV.

5.6.1.1.6. Confirmación de la construcción pJET-ALK1

Se comprobó la clonación mediante la realización de una PCR de punto final y una restricción enzimática con la enzima *Bgl*II.

5.6.1.1.7. Amplificación del casete de selección *hph*

Como se mencionaba en la sección 5.6.1.1. se amplificó el gen *hph* utilizando iniciadores degenerados con el que posteriormente se interrumpió el vector pJET-ALK1, utilizando los iniciadores y condiciones de PCR de los cuadros 4 y 5 respectivamente.

Cuadro 4. Secuencia de Iniciadores utilizados para la amplificación del gen *hph* para interrumpir pJET-ALK1

Iniciador	Secuencia
DerBamHI	5'-TAGGATCCGGCCTAGATGGCCACCATGGCGT-3'
RevBamHI	5'-ATGGATCCGGCCACTCAGGCCTATTAATGCG-3'
Tamaño del producto 2,741 pb	

Cuadro 5. Mezcla y condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación por PCR del gen *hph*.

Reactivo	Cantidad	Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Regulador 10x	1x	Desnaturalización inicial	95	5	1
MgCl ₂	2.5 mM	Desnaturalización	95	1	30
DNTP's	0.2 mM	Alineamiento	56	1	
Iniciadores	0.4 μM	Extensión	72	3	
Taq polimerasa	1 U	Extensión final	72	10	1
DNA	100 ng				
Agua	Hasta 25 μL				

5.6.1.1.8. Ligación de pJET-ALK1 con *hph* (obtención de la construcción pJETalk1/*hph*)

Una vez que se comprobó que se había obtenido la construcción deseada (pJET-ALK1) se linearizó utilizando la enzima de restricción *Bam*HI, la cual va a reconocer la secuencia GGATCC presente en el gen *ALK1-CYP52* clonado, para esto, en un microtubo se agregó 20 μ L de DNA, 5 μ L de regulador, 6 μ L de la enzima y 19 μ L de agua inyectable (volumen final de 50 μ L), este se incubó a 37°C de 3 a 12 h, transcurrido el tiempo se visualizó en un gel de agarosa al 1% para comprobar que se había llevado una digestión completa, y posteriormente se purificó con el kit comercial de purificación “DNA Clean and Concentrator™” (Zymo Research®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este mismo procedimiento se realizó con el casete *hph* previamente amplificado con el fin de obtener extremos cohesivos que permitan ligarlo con pJET-ALK1.

Una vez que se linearizó la construcción pJET-ALK1, se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina, agregando 2.5 μ L de la enzima a 30 μ L de DNA e incubando a 37°C por al menos 2 h. Transcurrido el tiempo se inactivó la enzima a 80°C por 20 min.

Posteriormente se realizó la ligación agregando en un microtubo 1 μ L del vector (pJET-ALK1), 6 μ L del inserto (*hph*), 1 μ L de regulador, 1 μ L de la enzima ligasa y 1 μ L de agua inyectable (volumen final de 10 μ L) y se incubó a 16°C por 12 h. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la transformación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B siguiendo el mismo protocolo planteado en la sección 5.6.1.1.4.

Así mismo, el DNA plasmídico se extrajo a partir de las colonias transformantes y se determinó cuáles eran las cepas que contenían la construcción deseada y se realizó la comprobación de la construcción mediante PCR de punto final y restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Bgl*II. Una vez que se confirmó que se obtuvo la construcción deseada se realizó una secuenciación utilizando iniciadores para la amplificación de los genes *CYP52*.

5.6.1.2. Obtención de una construcción genética con el gen *ALK2-CYP52* de *Debaryomyces hansenii* interrumpido con el casete *hph* (pJETalk2/hph)

La estrategia para obtener esta construcción genética, al igual que en el caso anterior, fue la interrupción insercional. Solo que en esta ocasión se partió de una construcción obtenida previamente por el equipo de trabajo (Ortiz-Álvarez, 2015), dicha construcción constaba de el gen *ALK2-CYP52* clonado en el vector pJET1.2 (pJET-ALK2) (Figura 7.).

5.6.1.2.1. Obtención de la construcción pJETalk2/hph

Siguiendo la estrategia planteada en la sección anterior, y de manera muy similar a lo realizado con la construcción pJETalk1/hph, se amplificó el gen *hph* utilizando iniciadores degenerados los cuales tenían una secuencia de reconocimiento para la enzima *EcoRV* (Cuadro 6.) y siguiendo las condiciones de PCR mostradas en el cuadro 7.

Cuadro 6. Iniciadores utilizados para la amplificación del gen *hph* para interrumpir pJET-ALK2

Iniciador	Secuencia
HPHF	5'-ATTAGATATCGTGGCGGCAGATGTGAGTCGTG-3'
HPHR	5'-AATTAGATATCGTCGATTGGGTGGTGTCCGGTAGAG-3'
Tamaño del producto 2,626 pb	

Cuadro 7. Mezcla y condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación del gen *hph*

Reactivo	Cantidad	Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Regulador 10x	1x				
MgCl ₂	2.5 mM	Desnaturalización inicial	95	5	1
DNTP's	0.2 mM	Desnaturalización	95	1	30
Iniciadores	0.4 µM	Alineamiento	61	1	
Taq polimerasa	1 U	Extensión	72	3	
DNA	100 ng	Extensión final	72	10	1
Agua	Hasta 25 µL				

Una vez amplificado el casete de selección se realizó la digestión de este, así como la linealización del vector pJET-ALK2 utilizando la enzima de restricción *EcoRV* siguiendo las mismas condiciones de reacción ya planteadas en la sección 5.6.1.1.8. Posteriormente el vector pJET-ALK2 linealizado se trató con fosfatasa alcalina y se procedió a ligar este vector con el casete *hph* (ver sección 5.6.1.1.8.).

Con la reacción de ligación anterior se procedió a transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B siguiendo el mismo protocolo planteado en la sección 5.6.1.1.4. y se realizó con confirmación de la construcción mediante PCR de punto final y mediante una restricción enzimática con las enzimas *BglII*, *BamHI* y *EcoRV*.

Al igual que para pJETalk1/hph, se realizó la secuenciación del vector utilizando iniciadores para la amplificación de los genes *CYP52*.

En el esquema que se muestra en la figura 7 se representa gráficamente un ensayo *in silico* de la estrategia para la obtención de la construcción genética pJETalk2/hph mediante interrupción insercional. Esta representación fue realizada utilizando el programa SnapGene® Viewer V. 3.2.1.

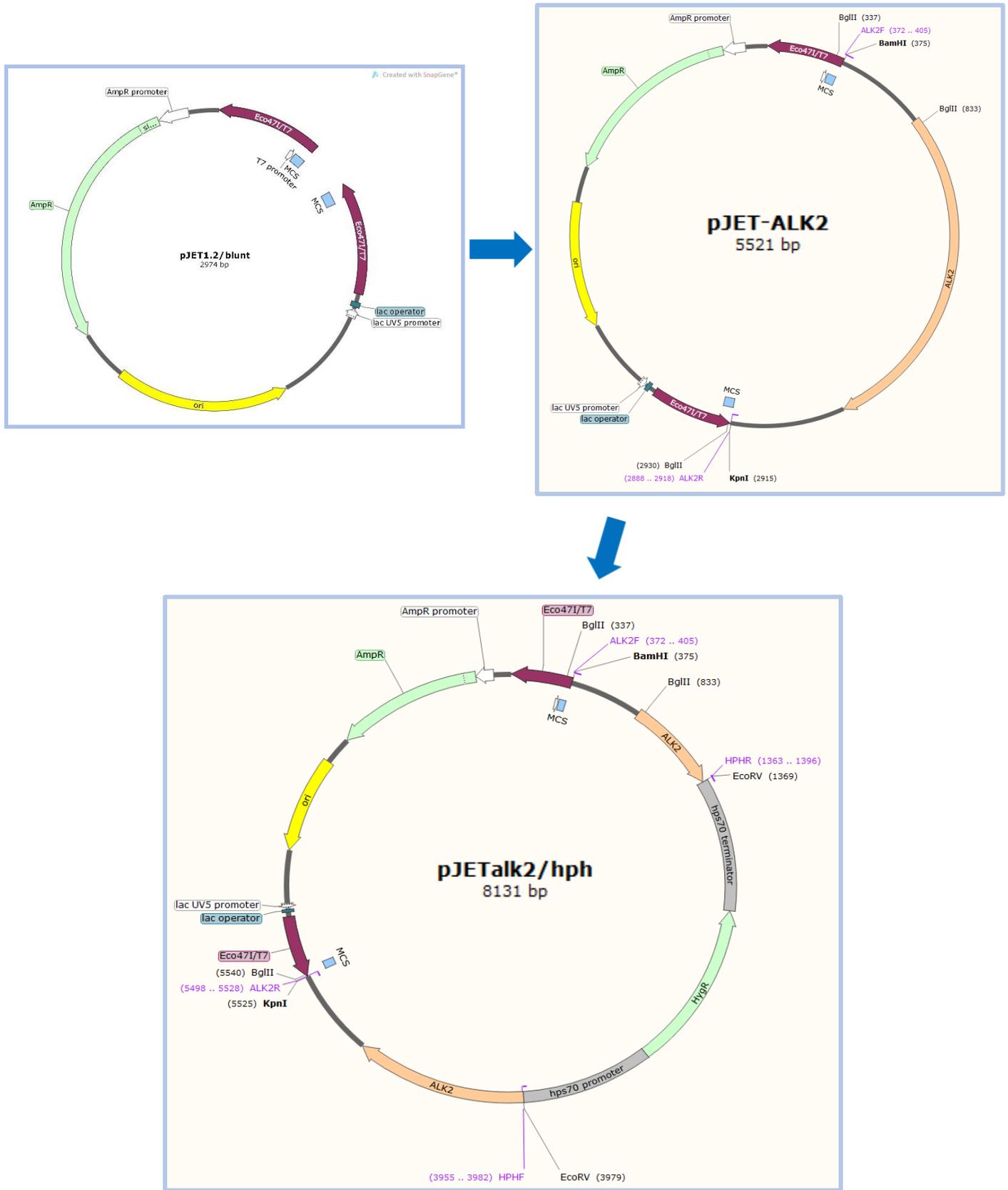


Figura 7. Diagrama para la obtención de una construcción genética con el gen *ALK2-CYP52* de *D. hansenii* interrumpido con el casete de selección *hph*.

5.6.2. Obtención de una construcción genética con el gen *ALK1-CYP52* mediante PCR de doble fusión (DJ-PCR)

Para esta estrategia, en primer lugar, a partir del DNA de *D.hansenii* se amplificaron los fragmentos río abajo y río arriba del gen *ALK1-CYP52*, mismos que se denominaron *ALK1L* y *ALK1R* respectivamente. Para amplificar estos fragmentos se diseñaron iniciadores específicos los cuales amplificaron fragmentos con secuencias terminales idénticas a las secuencias terminales del casete de selección *hph*, el cual también se amplificó utilizando iniciadores diseñados para poder llevar a cabo la fusión con los amplicones *ALK1L* y *ALK1R*. Ya que los extremos terminales del amplicon *hph* son complementarios a los extremos derecho e izquierdo de los amplicones *ALK1L* y *ALK1R* respectivamente, permitieron que se lleve a cabo la fusión de estos amplicones con el gen *hph* en el momento que se realizó DJ-PCR.

Con el amplicon obtenido (el cual consta de el gen *ALK1-CYP52* interrumpido con el casete de selección) (*ALK1L-hph-ALK1R* de 2.7 kb) se buscó clonar en un vector para llevar a cabo la transformación de *D. hansenii*.

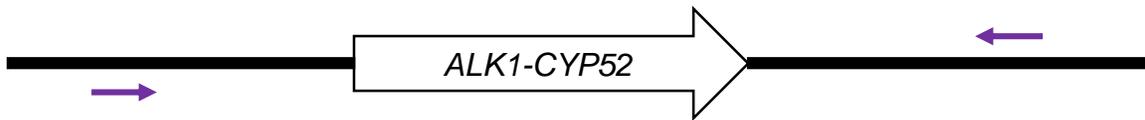
Para la amplificación de los fragmentos *ALK1L* y *ALK1R*, el casete *hph*, y finalmente la construcción *ALK1L-hph-ALK1R* se siguió el esquema representado en la figura 8, así como los oligonucleótidos, mezclas de reacción y condiciones de PCR que se describen en los cuadros 8, 9, 10, 11 y 12.

a)

3'-CGCTCCACCGTAACTTTATATAATTA-5'

5'-NNNN-TGAAGGATTAATGCCCAAATAACATAC...NNNNNNNNNN...GCGAGGGTGGCATTGAAATATATTAAT-NNNN-3'
 3'-NNNN-ACTTCCTAATTACGGGGTTTATTGTATG...NNNNNNNNNN...CGCTCCACCGTAACTTTATATAATTA-NNNN-5'

5'-TGAAGGATTAATGCCCAAATAACATAC-3'

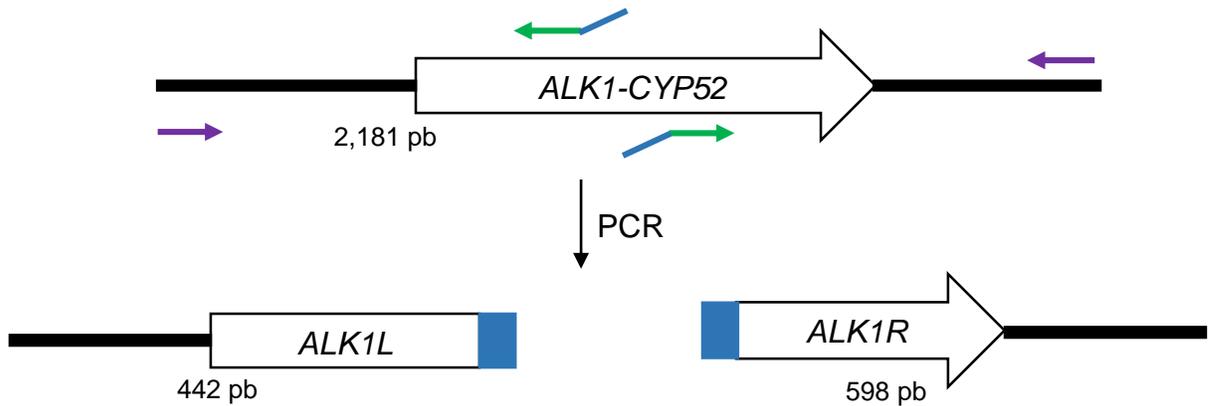


b)

3'-CTCTCCTTGGTACCATCTACACTGT-GTCGCTAGTCCTTACCATTAGCCC-5'

5'-NNNNNNN-GAGAAGGAACCATGGTAGATGTGACA-NNNNNNN-GGGCATTCTTACCATTTAACGGTG-NNNNNNNN-3'
 3'-NNNNNNN-CTCTCCTTGGTACCATCTACACTGT-NNNNNNNNN-CCCGAAGAATGGTAAATTGCCAC-NNNNNNNN-5'

5'-GGAATAGAGTAGATGCCGACCGGGGGGCATTCTTACCATTTAACGGTG-3'

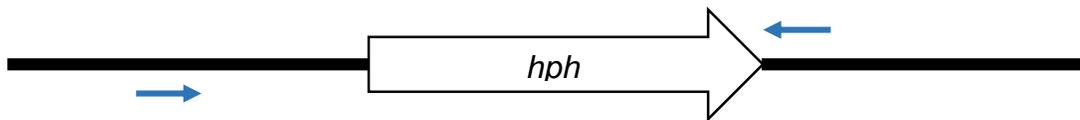


c)

3'-CCTTATCTCATCTACGGCTGGCCC-5'

5'-NNNNN-CAGCGATCAGGAATGGTAATCGGG-NNNNNNNNN-GGAATAGAGTAGATGCCGACCGGG-NNNNN-3'
 3'-NNNNN- GTCGCTAGTCCTTACCATTAGCCC -NNNNNNNNNN-CCTTATCTCATCTACGGCTGGCCC-NNNNN-5'

5'-CAGCGATCAGGAATGGTAATCGGG-3'



Fragmento río abajo de *ALK1-CYP52*

5'- GGAATAGAGTAGATGCCGACCGGG-GGGCATTCTTACCATTAAACGGTG-NNNNN-3'
 3'- CCTTATCTCATCTACGGCTGGCCC-CCCGAAGAATGGTAAATTGCCAC-NNNNN-5'

d)

hph

(Sitio de reconocimiento)

5'-CAGCGATCAGGAATGGTAATCGGG-NNNNNNNNNNN-GGAATAGAGTAGATGCCGACCGGG-3'
 3'-GTCGCTAGTCCTTACCATTAGCCC-NNNNNNNNNNN-CCTTATCTCATCTACGGCTGGCCC-5'

(Sitio de reconocimiento)

Fragmento río arriba de *ALK1-CYP52*

5'-NNNNN-GAGAAGGAACCATGGTAGATGTGACA-CAGCGATCAGGAATGGTAATCGGG-3'
 3'-NNNNN-CTCTCCTTGGTACCATCTACACTGT-GTCGCTAGTCCTTACCATTAGCCC-5'

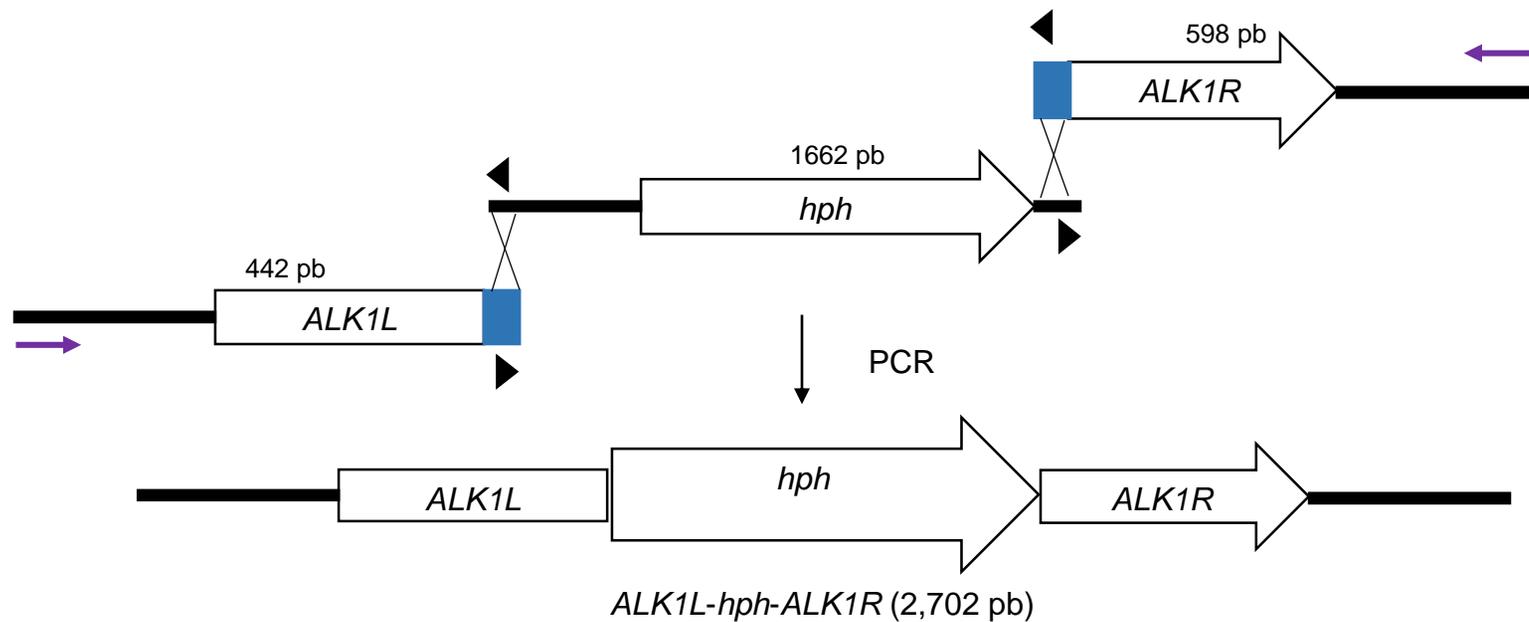


Figura 8. Esquema para la realización de la DJ-PCR. a) y b) Secuencias de los iniciadores y los sitios de reconocimiento para la amplificación de *ALK1-CYP52* y los fragmentos *ALK1L* y *ALK1R*. c) amplificación del casete de higromicina (*hph*). d) PCR fusión de los amplicones obtenidos.

Cuadro 8. Secuencia de los Iniciadores utilizados para la amplificación de los fragmentos *ALK1L* y *ALK1R*, el casete *hph*, y la construcción *ALK1L-hph-ALK1R*

Amplificado	Iniciador	Secuencia
<i>ALK1L</i>	ALK1F	5'-TGAAGGATTAATGCCCCAAATAACATAC-3'
	AlhphALKR	5'-CCCGATTACCATTCTGATCGCTGTGTACATCTACCATGGTTCCTTCTC-3'
<i>ALK1R</i>	BIALKhphF	5'-GGAATAGAGTAGATGCCGACCGGGGGGCATTCTTACCATTAAACGGTG-3'
	ALK1R	5'-ATTAATATATTTCAATGCCACCCTCGC-3'
<i>hph</i>	AhphF	5'-CAGCGATCAGGAATGGTAATCGGG-3'
	AIBhphR	5'-CCCGGTCGGCATCTACTCTATTCC-3'
Construcción completa	ALK1F	5'-TGAAGGATTAATGCCCCAAATAACATAC-3'
	ALK1R	5'-ATTAATATATTTCAATGCCACCCTCGC-3'

Cuadro 9. Mezclas de reacción para realizar la amplificación de los fragmentos *ALK1L* y *ALK1R*, y el casete *hph*

Reactivo	Cantidad
Regulador 10x	1x
MgCl ₂	2.5 mM
DNTP's	0.2 mM
Iniciadores	0.4 μM
<i>Taq</i> polimerasa	1 U
DNA	100 ng
Agua	Hasta 25 μL

Cuadro 10. Condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos *ALK1L* y *ALK1R*

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineamiento	55	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1

Cuadro 11. Condiciones de reacción en las que se llevó a cabo la amplificación del casete *hph*

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineamiento	59	1	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	10	1

Cuadro 12. Mezcla de reacción y condiciones en las que se llevó a cabo la amplificación y construcción de *ALK1L-hph-ALK1R* por DJ-PCR

Reactivo	Cantidad	Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Regulador 10x	1x	Desnaturalización inicial	94	5	1
MgCl ₂	2.5 mM	Desnaturalización	94	0.5	30
DNTP's	0.2 mM	Alineamiento	55	1	
Iniciadores	0.4 μM	Extensión	72	2.5	
Taq polimerasa	1 U	Extensión final	72	10	1
Fragmentos L y R	20 – 50 ng				
Casete hph	20 – 50 ng				
Agua	Hasta 25 μL				

5.7. Transformación de *D. hansenii* Y-7624 con las construcciones obtenidas

Previo a los ensayos de transformación se comprobó la sensibilidad de *D. hansenii* a higromicina y la concentración mínima inhibitoria. Esto se realizó en placas de medio YPD con higromicina a concentraciones de 50 μg/mL, 100 μg/mL, 150 μg/mL y 200 μg/mL, encontrando que se inhibe el 100% del desarrollo de la levadura a una concentración de 100 μg/mL. En los ensayos de transformación se utilizó una concentración de 200 μg/mL para asegurar que las colonias que logren desarrollarse sean transformantes y no mutantes espontaneas.

Con los vectores previamente obtenidos se procedió a realizar la transformación de una cepa silvestre de *D. hansenii*, para lo cual se probaron dos metodologías:

Método descrito por Sasse y Morschhäuser (2012). La levadura se sembró en 10 mL de medio YPD y se incubó toda una noche a 30°C a 250 rpm. Con 50 μL de este cultivo se inoculó un matraz con 50 mL de medio YPD de igual manera se incubó a 30°C a 250 rpm durante aproximadamente 12 h hasta que el cultivo

alcanzó una densidad óptica de entre 1.6 y 2.2 a 600 nm. Las células se cosecharon por centrifugación a 3,300 xg por 5 min. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron con 8 mL de agua estéril, después se agregó 1 mL de solución TE 10x con pH de 7.5, se mezcló suavemente y se agregó 1 mL de acetato de litio con pH de 7.5, se mezcló suavemente y se incubó durante una hora a 30°C a 150 rpm. Transcurrido ese tiempo se agregaron 250 µL de solución DTT (Dithiothreitol) 1M y se continuó incubando con las condiciones ya mencionadas por 30 min. Posteriormente el tubo se transfirió a hielo y se agregaron 40 mL de sorbitol 1M frío (a 4°C), se homogeneizó y se cosecharon las células por centrifugación 3,300 xg por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 25 mL de sorbitol 1M frío. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con el líquido remanente, 40 µL de esta suspensión se mezclaron con 5 µL de DNA purificado de la construcción pJETalk2/hph (1.5 µg/µL) en una cubeta para electroporación (previamente enfriada a 4°C). La mezcla se incubó en hielo durante 5 min y después se electroporó a 1.5 kV. Posteriormente a la suspensión electroporada se agregó 1 mL de medio YPD, se homogeneizó y se transfirió a un microtubo y se incubó por 4 h a 30°C a 150 rpm. Transcurrido ese tiempo, se inocularon placas de medio YPD con higromicina (200 µg/mL) que se incubaron a temperatura ambiente de 48 a 96 h.

Método descrito por Minhan y colaboradores (2008). A partir de un cultivo de 24 h de *D. hansenii*, se inoculó un matraz con 30 mL de medio YPD y se incubó por 24 h hasta obtener una densidad óptica de entre 2.6 y 2.8 a 600 nm. Las células se cosecharon por centrifugación a 3,300 x g por 5 min. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron con 6 mL de regulador de fosfato de sodio 50 mM y 150 µL de DTT 1M a un pH de 7.5. La suspensión se incubó por 30 min a 30°C con agitación orbital a 150 rpm. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con 25 mL de sacarosa 1 M fría a 4°C. El sobrenadante se retiró y nuevamente las células se resuspendieron con el líquido remanente. Un total de 200 µL de esta suspensión se mezclaron con 0.25 mL de DNA purificado de la construcción pJETalk2/hph (1.5 µg/µL) en una cubeta para electroporación previamente enfriada a 4°C. La mezcla se incubó en hielo durante 5 min y después

electroporó a 2.3 kV. Posteriormente, se agregó a la suspensión electroporada 0.8 mL de sacarosa 1 M, se homogeneizó y se inocularon placas de medio YPS con higromicina (200 µg/mL) que se incubaron a temperatura ambiente de 48 a 96 h.

En ambos casos, las colonias que lograron crecer y se considera que son transformantes y resistentes a higromicina se extrajo el DNA genómico de estas y se amplificó por PCR de punto final el gen *hph* para confirmar la inserción utilizando las condiciones descritas en la sección 5.6.1.1.7.

6. RESULTADOS

6.1. Obtención de una construcción genética pJETalk1/hph

Mediante la estrategia de mutagénesis insercional se obtuvo la construcción genética pJETalk1/hph, la cual tiene el gen *ALK1-CYP52* interrumpido con casete de selección *hph* (Figura 5. y anexo I).

6.1.1. Comprobación de la clonación del gen *ALK1-CYP52* en el vector pJET (pJET-ALK1)

Mediante una PCR de punto final se logró amplificar el gen *ALK1-CYP52* (de 2.2 kb) y mediante una restricción enzimática con la enzima *Bgl*II se obtuvieron dos productos de restricción de la talla esperada (3 y 2.2 kb aproximadamente). Los productos de la amplificación y la restricción se corrieron por electroforesis en agarosa como se muestra en la figura 9.

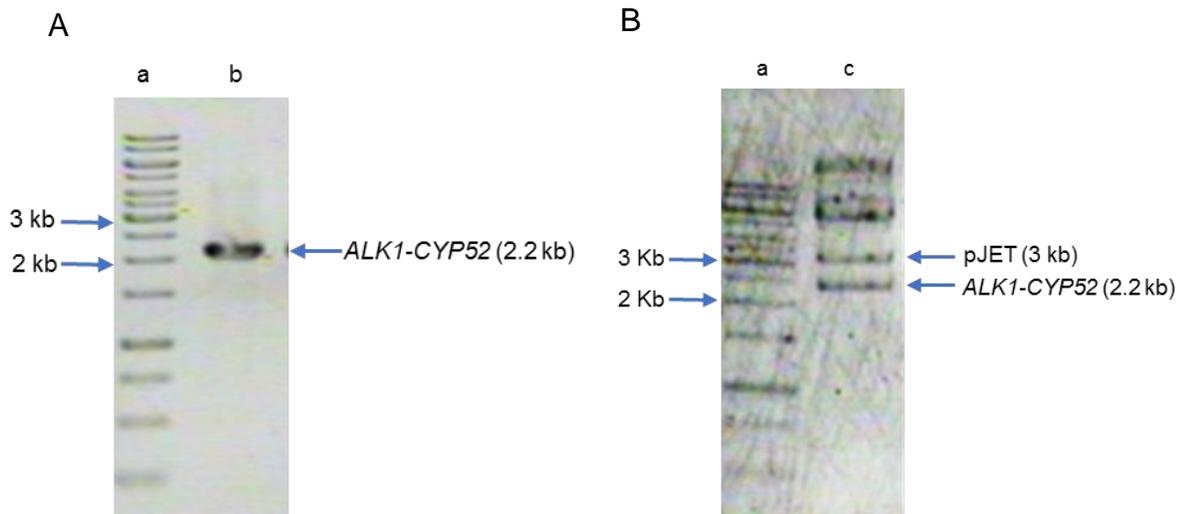


Figura 9. Comprobación de la construcción pJET-ALK1 por amplificación por PCR y electroforesis en agarosa de un fragmento del gen *ALK1-CYP52* (panel A) y digestión con *Bgl*II (panel B). a, marcador de talla molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™); b, amplificación de un fragmento del gen *AKL1-CYP52* de 2.2 kb; c, digestión del plásmido pJET-ALK1 con la enzima *Bgl*II.

6.1.2. Comprobación de la construcción pJETalk1/hph

La comprobación de la construcción pJETalk1/hph (de 7.9 kb) se verificó mediante una PCR de punto final amplificando un fragmento de 1.7 kb del gen *hph* y amplificando el gen *ALK1-CYP52* (ahora interrumpido con el gen *hph* (ALK1+hph 5 kb)) y con restricciones enzimáticas por separado con las enzimas *Bam*HI y *Bg*II que generaron los fragmentos esperados que se muestran en la figura 10.

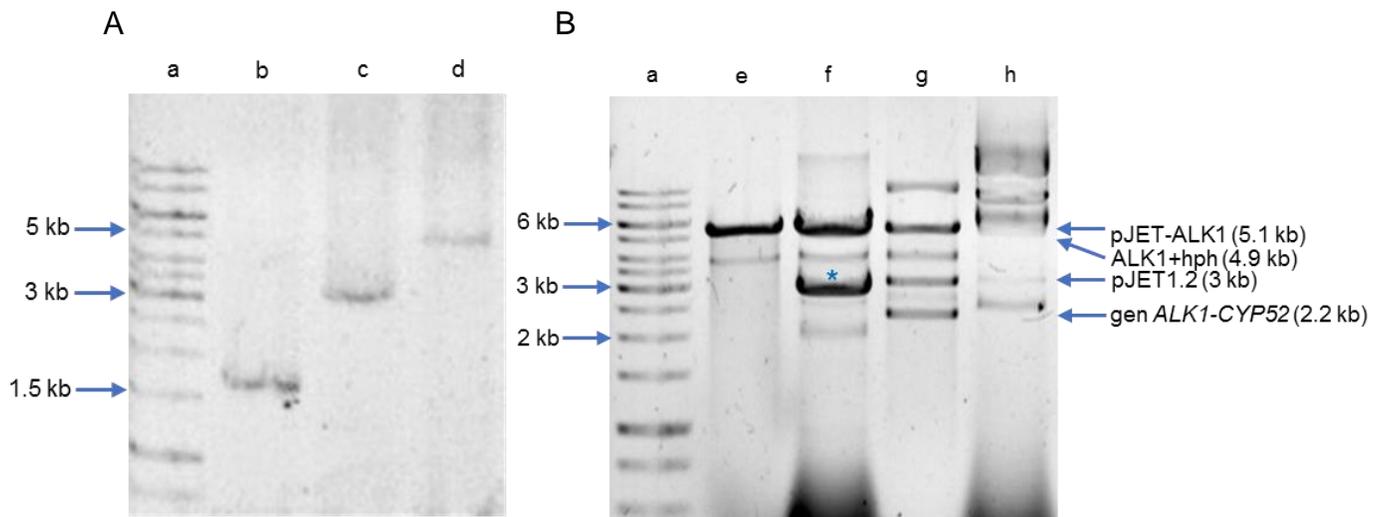


Figura 10. Comprobación de la construcción pJETalk1/hph por amplificación por PCR y electroforesis en agarosa (panel A) y digestión con *Bam*HI y con *Bg*II (panel B). a, marcador de talla molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™); b, fragmento del gen *hph* (1.7 kb); c, fragmento de ALK1+hph (3 kb); d, ALK1+hph (5 kb); e y f, digestión de los plásmidos pJET-ALK1 y pJETalk1/hph respectivamente con la enzima *Bam*HI; g y h, digestión de los plásmidos pJET-ALK1 y pJETalk1/hph con la enzima *Bg*II; *, gen *hph* (2.7 kb).

6.2. Obtención de la construcción pJETalk2/hph

La comprobación de la construcción pJETalk2/hph (Figura 7. y anexo II) se verificó mediante una PCR de punto final amplificando un fragmento de 1.7 kb del gen *hph* y amplificando el gen *ALK2-CYP52* (ahora interrumpido con el gen *hph* (ALK2+hph 5.1 kb)) y mediante restricciones enzimáticas por separado con las enzimas *Bam*HI, *Bg*II y *Eco*RV generando los fragmentos esperados que se muestran en la figura 11.

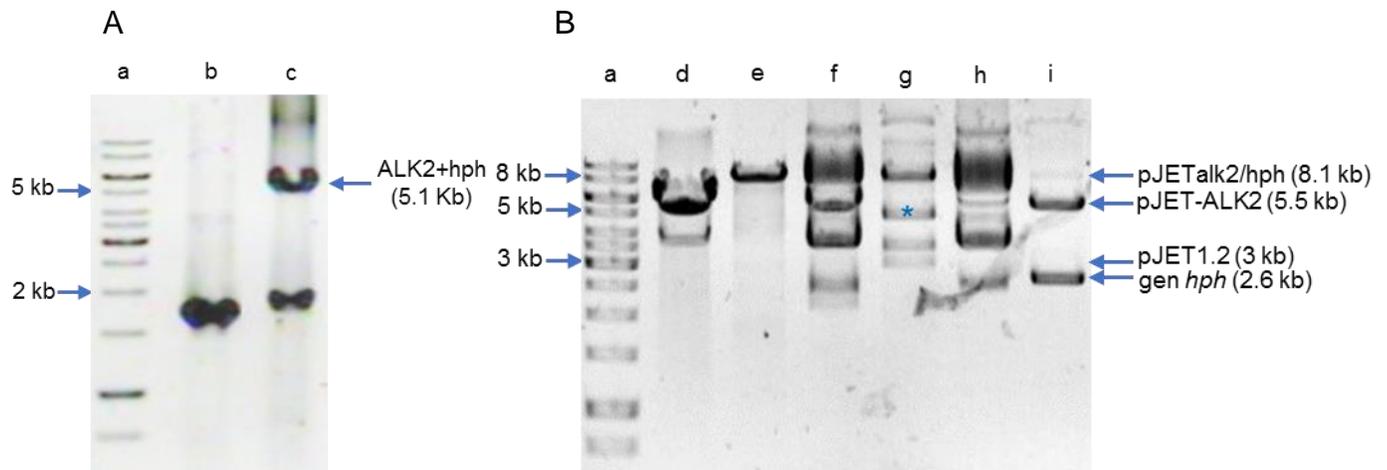


Figura 11. Comprobación de la construcción pJETalk2/hph por amplificación por PCR y electroforesis en agarosa (panel A) y digestión con *Bam*HI, con *Bgl*II y con *Eco*RV (panel B). a, marcador de talla molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™); b, fragmento del gen *hph* (1.7 kb); c, ALK2+hph (5.1 kb); d y e, digestión de los plásmidos pJET-ALK2 y pJETalk2/hph respectivamente con la enzima *Bam*HI; f y g, digestión de los plásmidos pJET-ALK2 y pJETalk2/hph con la enzima *Bgl*II; digestión de los plásmidos pJET-ALK2 y pJETalk2/hph con la enzima *Eco*RV; *, ALK2+hph (5.1 kb). Nota: el carril f presenta un resultado discordante.

6.3. Confirmación por secuenciación del sitio y orientación de las inserciones en las construcciones pJETalk1/hph y pJETalk2/hph

Los genes insertados en las construcciones pJETalk1/hph y pJETalk2/hph fueron secuenciados utilizando iniciadores “forward” de los genes *ALK1-CYP52* y *ALK2-CYP52* respectivamente. Como se observa en las figuras 12 y 13, los fragmentos se clonaron en el sitio esperado con la orientación de los insertos dentro de los vectores que se muestra en los anexos I y II.

En resumen, en la sección 6.1. y 6.2. se presentan los resultados obtenidos que demuestran el éxito en la construcción de los vectores deseados, (figuras 5 en la página 23 y 7 en la página 31). Encontramos que en el caso pJETalk1/hph, el gen *ALK1-CYP52* se clonó en el vector, en el mismo sentido con respecto a la secuencia ori, mientras que el casete *hph* se insertó en el sentido opuesto a la secuencia ori. Mientras que para el caso de pJETalk2/hph, las orientaciones fueron las opuestas.

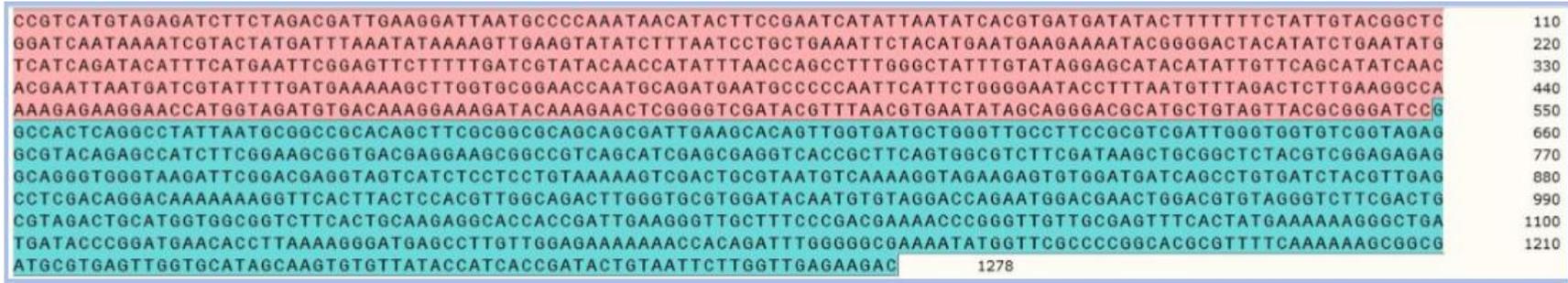


Figura 12. Confirmación por secuenciación del sitio y orientación de la inserción en la construcción pJETalk1/hph. En rojo se muestra parte de la secuencia del gen *ALK1-CYP52*, y en azul parte de la secuencia del gen *hph*.

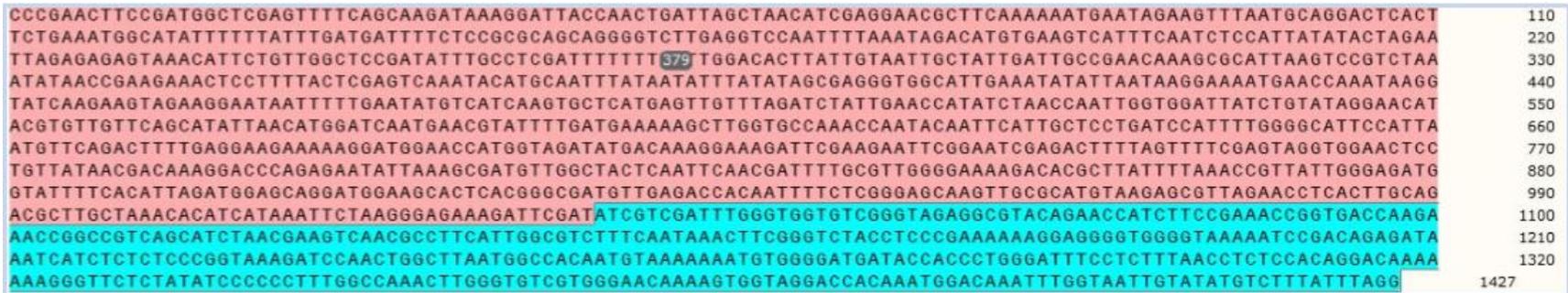


Figura 13. Confirmación por secuenciación del sitio y orientación de la inserción en la construcción pJETalk2/hph. En rojo se muestra parte de la secuencia del gen *ALK2-CYP52* y en azul parte de la secuencia del gen *hph*.

6.4. Obtención de la construcción ALK1L-hph-ALK1R con el gen *ALK1-CYP52* interrumpido mediante DJ-PCR

El gen *ALK1-CYP52* de 2,181 pb se interrumpió con el casete de selección *hph* mediante una DJ-PCR obteniéndose la construcción de un gen híbrido de 2,702 pb denominado *ALK1L-hph-ALK1R*. En esta construcción se sustituyeron los nucleótidos de las posiciones 442 al 1,583 del gen *ALK1-CYP52* por una secuencia de 1,662 pb del gen *hph*. Los fragmentos R y L del gen *ALK1-CYP52*, el gen *hph* y el producto de la DJ-PCR se muestran en la figura 6.6.

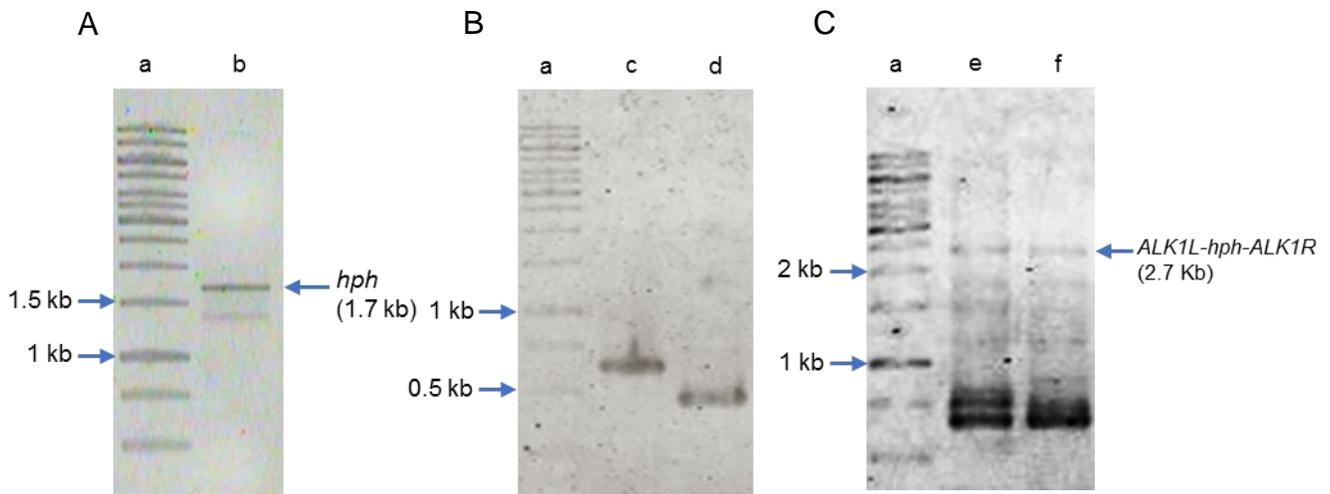


Figura 14. Electroferogramas de los amplicones para la realización de la DJ-PCR (paneles A y B) y electroferograma de la DJ-PCR (panel C). a, marcador de talla molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™); b, gen *hph* (1.7 kb); c, fragmento R del gen *ALK1-CYP52* (*ALK1R* de 598 pb); d, fragmento L del gen *ALK1-CYP52* (*ALK1L* de 442 pb); e y f, productos de la DJ-PCR.

6.5. Transformación de una cepa silvestre de *D. hansenii* Y-7624 con la construcción pJETalk2/hph

Mediante los protocolos de transformación por electroporación descritos en la sección 5.7. se obtuvieron dos cepas resistentes a higromicina que posiblemente son mutantes para el gen *ALK2-CYP52*. Sin embargo, al realizar la PCR para detectar la presencia del gen *hph* confirmatoria en el DNA cromosómico total de las posibles recombinantes no obtuvo ningún amplificado.

Al hacer una observación de estas levaduras en el microscopio, teñidas con una tinción simple con cristal violeta tampoco se pudo apreciar ninguna diferencia morfológica entre las levaduras presuntamente mutantes y la levadura silvestre (Figura 15.).

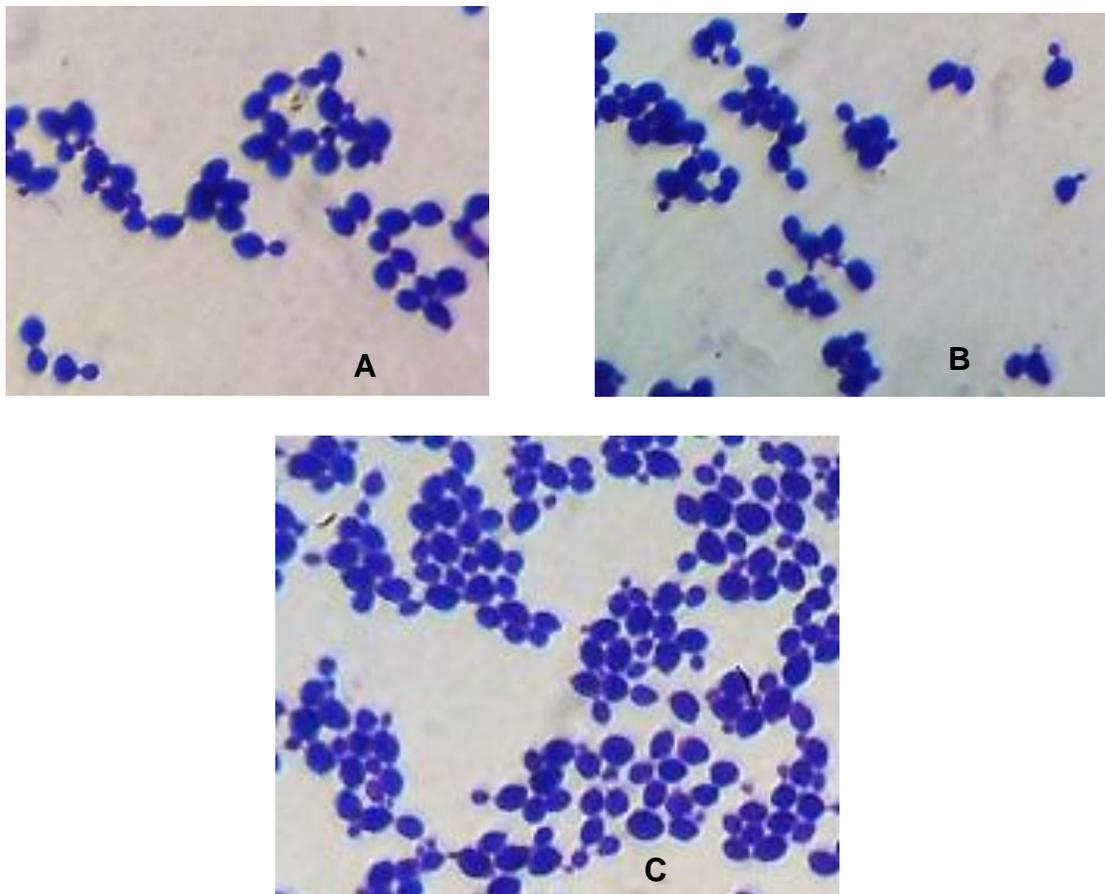


Figura 15. Morfología microscópica de *D. hansenii* a 1000x. Paneles A y B, presuntas mutantes para el gen *ALK2-CYP52* de *D. hansenii*; C, cepa silvestre de *D. hansenii*.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años se han estudiado diversos modelos biológicos que permitan plantear estrategias y tecnologías para la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos. Algunos estudios han profundizado en el estudio de la capacidad hidrocarbonoclasta de diversas levaduras (Csutak, 2010) y se ha demostrado que algunos genes de la familia *CYP52* están involucrados en el metabolismo de n-alcenos y ácidos grasos (Kogure, 2007; Črešnar & Petričse, 2010).

En este trabajo se planteó como objetivo las construcciones genéticas potencialmente útiles para la obtención de cepas mutantes de *Debaryomyces hansenii* carentes de uno o más genes de la familia *CYP52*. Estas mutantes podrían ser útiles para entender la función de los miembros de esta familia multigenes a través de la comparación de los fenotipos de la cepa silvestre y mutantes, como ya se ha podido realizar con otras especies de levaduras hidrocarbonoclastas como *Y. lipolytica*, CX161-1B y CXAU1 (Iida *et al.*, 2000). Resulta relevante estudiar el perfil de asimilación de n-alcenos y ácidos grasos de diversas longitudes de cadena de las mutantes. Asimismo, es interesante observar cómo afectan las diversas condiciones ambientales (pH, temperatura, condiciones de estrés salino, osmótico, hipoxia y oxidativo, y presencia de glucosa entre otras) la asimilación de estas fuentes de carbono en los mutantes y cepas silvestres.

Existen distintos reportes en donde se señala la expresión de los genes P450-*ALK* es inducida por n-alcenos en levaduras como *C. maltosa*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* (Iida *et al.*, 2000; Craft *et al.*, 2003, Črešnar & Petričse, 2010) En *Y. lipolytica* se ha encontrado que la expresión de los genes *ALK* es inducible en presencia de n-tetradecano, así mismo se observó que la inducción transcripcional de estos genes es reprimida en presencia de glicerol, aunque primordialmente los genes *YIALK1* y *YIALK2* son importantes en la degradación de n-alcenos de 10 a 16 átomos de carbono. Es importante mencionar que estudios previos sugieren que los genes *ALK1* y *ALK2* participan en la degradación de n-alcenos de forma diferenciada (Iida *et al.*, 2000) dadas las características de los citocromos que codifican y las regiones reguladoras (distintas

para cada uno de estos genes en *Y. lipolytica*) (Ortiz-Álvarez, 2015). Al respecto, se ha encontrado que los sitios promotores de cada gen *ALK* son distintos unos de otros (Kogure, 2007).

Aunque se ha encontrado que en *Y. lipolytica* la activación transcripcional de *ALK1* está involucrada una secuencia río arriba del gen llamada elemento de respuesta a alcanos (ARE1 (alkane responsive element1)) al que se unen las proteínas Yas1p y Yas2p, activando la transcripción del gen en presencia de alcanos, mientras que en ausencia de alcanos la proteína Yas3p (que en presencia de alcanos se encuentra anclada al retículo endoplásmico) se une a la proteína Yas2p reprimiendo la expresión de *ALK1* (Fukuda, 2013); todavía se desconocen los mecanismos de regulación de los genes *ALK-CYP52* en cada levadura, por lo que resulta válida la pregunta de cuáles son las condiciones en las que se expresan o que se expresa un gen *ALK* preferentemente en lugar de otro. También es importante mencionar la presencia de múltiples genes *ALK-CYP52* en las levaduras de los órdenes Saccharomycetales y Deuteromycetales (Chen *et al.*, 2014) y en una reconstrucción filogenética muestra que se han formado subfamilias de genes *CYP52* ortólogos y parálogos, sugiriendo que la diversificación de estos genes surgió como una respuesta ante condiciones donde los hidrocarburos eran la única fuente de carbono disponible (Ortiz-Álvarez, 2015) y otorgando ventajas de adaptación condiciones ambientales “inhóspitas” y de estrés nutricional (principales condiciones que generan la duplicación de genes involucrados en el desarrollo celular)(Wapinski *et al.*.2007). Asimismo, en *D. hansenii* la filogenia reconstruida muestra que los genes parálogos *ALK1*, *ALK2* y *ALK3* tuvieron un proceso de replicación reciente, lo que sugiere que estos genes pueden tener funciones muy similares, como la degradación de un mismo sustrato, pero que se puedan estar expresando en condiciones ambientales distintas (Ortiz-Álvarez, 2015; Vázquez-Reyes, 2016) manteniéndose válida la pregunta de en qué momento o bajo qué condiciones es requerido que se exprese determinado gen *ALK-CYP52*, por lo cual, el contar con cepas de *D. hansenii* mutantes para estos genes sea necesario para continuar con el estudio de la expresión de los genes *ALK-CYP52* y obtener información que pueda aplicarse o funcione como antecedente en otros modelos

biológicos, y finalmente desembocar en el desarrollo de tecnologías para la biorremediación.

D. hansenii como modelo biológico para el desarrollo de tecnologías para la biorremediación resulta atractivo, dada su alta capacidad halotolerante, y por ende poder aplicarse en ambientes con alta salinidad. Para precisar acerca de datos previos de estudios genómicos realizados en *D. hansenii*, los genes *ALK1-CYP52*, *ALK2-CYP52* y *ALK3-CYP52* se encuentran en una misma región (Yadav & Loper, 1999; Ortiz-Álvarez, 2015; Vázquez-Reyes, 2016), río arriba de esta región se encuentra un gen responsable de la activación de la gluconeogénesis Dujon *et al.*, 2004; Vázquez-Reyes, 2016). En estudios recientes realizados por el grupo de trabajo se detectó que las regiones reguladoras de los genes *ALK-CYP52* muestran motivos en los que el factor determinante para su regulación sean las condiciones pH, la concentración de NaCl, o la fuente de nitrógeno predominantes en el ambiente (Datos no publicados. Ortiz-Álvarez, 2015; Vázquez-Reyes, 2016).

Al transformar cepas silvestres de *D. hansenii* con el vector construido pJETalk2/hph, se esperaba que en la levadura llevara a cabo un evento de sustitución por recombinación homóloga (Figura 16) y la selección de las mutantes se realizara por el fenotipo de resistencia a la higromicina de las clonas recombinantes (Gutierrez *et al.*, 1996). Sin embargo, en este trabajo, aunque se obtuvieron algunas clonas resistentes a la higromicina, los intentos para la transformación de *D. hansenii* Y-7624 y en consecuencia la recombinación homóloga para obtener las mutantes del gen *ALK2-CYP52* por electroporación resultaron infructuosos. Esto podría implicar que probablemente los métodos de transformación no fue el adecuado para este propósito, aunque claro, hay que explorar otras posibilidades y estandarizar un método que permita obtener mutantes con una alta eficiencia. Otros métodos para transformar levaduras incluyen la formación de protoplastos (Brachmann *et al.*, 2004), por choque térmico (Moqtaderi & Geisberg, 2013) y transformación con acetato de litio (Johnson *et al.*, 2005). Estos métodos podrían ser ensayados con las construcciones obtenidas en este trabajo

El método utilizado para la transformación de *D. hansenii* descrito por Minhas y colaboradores (2008) fue el primero en ser utilizado para obtener mutantes de *D. hansenii* por recombinación homóloga (a diferencia del método descrito por Sasse y Morschhäuser (2012) utilizado en *C. albicans*) obteniendo distintas mutantes de distintos genes. Posteriormente este mismo método fue utilizado por Biswas y colaboradores (2013), obteniendo 2 mutantes para el gen *DhXDH*. Por lo que pareciera quedar descartada la posibilidad de que *D. hansenii* presente una actividad DNAsa citoplásmica que hidrolice el DNA con el que se pretende transformar a la levadura, al menos que la cepa con la que se trabajó (*D. hansenii* Y-7624) en efecto sea refractaria a la transformación, por lo que sería preciso utilizar una cepa que ya se haya utilizada para obtener mutantes por recombinación homóloga (Figura 16).

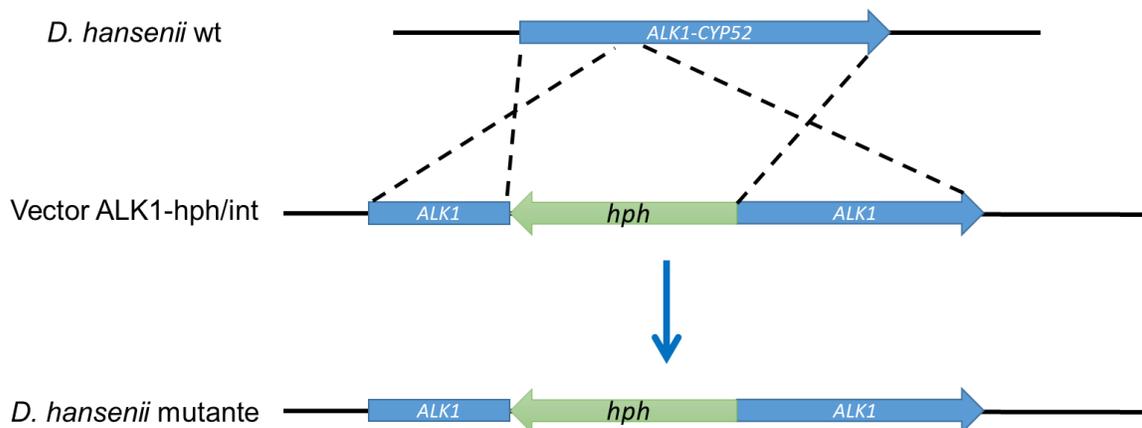


Figura 16. Modelo de sustitución por recombinación homóloga usado el vector pJETalk1/hph en *Debaryomyces hansenii*.

Finalmente, también existe la posibilidad de que el gen utilizado para la selección con higromicina de las recombinantes o mutantes no sea el adecuado, es decir no se exprese en esta levadura ya sea a nivel de transcripción o de traducción. Este parece ser el motivo más probable por el que los intentos de transformación resultaran infructuosos dado que *D. hansenii* pertenece al clado CTG (levaduras emparentadas con *C. albicans*) y los organismos pertenecientes a este clado tienen un uso preferencial de codones distinto de los organismos no pertenecientes al clado (Santos *et al.*, 2011), esta posibilidad finalmente obliga a utilizar otros casetes de selección o a utilizar una versión del gen *hph* optimizada para la expresión transcripcional y el uso preferencial de codones de *D. hansenii*. Cabe mencionar que un gen de resistencia a higromicina ya ha sido utilizado como un marcador de selección para la transformación de *D. hansenii* por Ricaurte y Govind (1999) aunque en este trabajo se reporta una pobre expresión del gen.

8. CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos construcciones genéticas denominadas pJETalk1/hph y pJETalk1/hph potencialmente útiles para la obtención de mutantes por recombinación homóloga de los genes *ALK1-CYP52* y *ALK2-CYP52* de *Debaryomyces hansenii*.

Los intentos para transformar por electroporación la cepa silvestre de *D. hansenii* Y-7624 con las construcciones obtenidas resultaron infructuosos posiblemente debido a la utilización de un marcador de selección inadecuado.

9. Prospectivas

- Obtener una construcción con el gen *ALK3-CYP52* interrumpido con un casete de selección.
- Estandarizar un método para transformar a *D. hansenii* y obtener mutantes para los genes de estudio.
- Analizar la expresión de los genes *ALK-CYP52* de *D. hansenii* y otras levaduras hidrocarbonoclastas bajo distintas condiciones ambientales (pH, alta presión osmótica, baja disponibilidad de nitrógeno asimilable, etc.) y con distintas fuentes de carbono (n-alcanos de distinto número de carbonos, compuestos xenobióticos hidrofóbicos, etc.).

10. REFERENCIAS

- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Biswas, D., Datt, M., Aggarwal, M., & Mondal, A. K. (2013). Molecular cloning, characterization, and engineering of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(4), 1613–1623.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., & Feldbrügge, M. (2004). A reverse genetic for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*. 272(1), 216-226.
- Campos-Guzman E. (2005). Expresión de la P450 de *Pichia guilliermondii* aislada de *Dentroctonus* spp. y su posible papel en la producción de feromonas. (Tesis de Maestría). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.
- Chen, W., Lee, M. K., Jefcoate, C., Kim, S. C., Chen, F., & Yu, J. H. (2014). Fungal cytochrome P450 monooxygenases: Their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin. *Genome Biology and Evolution*, 6(7), 1620–1634.
- Craft, D. L., Madduri, K. M., Eshoo, M., & Wilson, C. R. (2003). Identification and characterization of the *CYP52* family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to α,ω -dicarboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5983–5991.
- Črešnar, B., & Petrič, Š. (2010). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1814(1), 29–35.
- Csutak, O., Stoica, I., Ghindea, R., Tanase, A. M., & Vassu, T. (2010). Insights on yeast bioremediation processes. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 5066–5071.
- Danielson, P. B. (2002). The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6), 561–597.

- Das, N., & Chandran, P. (2010). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I. ... Souciet, J.-L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35–44.
- Froger, A.; Hall, J., (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, 6: 253.
- Fukuda, R. (2013). Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(6), 1149–54.
- Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., & Sayadi, S. (2015). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial wastewater. *BioMed Research International*, 2015, 1-11.
- Gonzalez, N. A., Vázquez, A., Ortiz Zuazaga, H. G., Sen, A., Olvera, H. L., de Ortiz, S. P., & Govind, N. S. (2009). Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 26(2), 111–124.
- Graham-lorence, S., Amarneh, B., White, R. E., Peterson, J. a, & Simpson, E. R. (1995). A tree-dimensional model of aromatase cytochrome-P450. *Protein Science*, 4(6), 1065–1080.
- Gutierrez, J. A., Crowley, P. J., Brown, D. P., Hillman, J. D., Youngman, P., & Bleiweis, A. S. (1996). Insertional mutagenesis and recovery of interrupted genes of *Streptococcus mutans* by using transposon Tn 917: preliminary characterization of mutants displaying acid sensitivity and nutritional requirements. *Journal of Bacteriology*, 178(14), 4166–4175.
- Hannemann, F., Bichet, A, Ewen, K. M., & Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1770(3), 330–344.
- Hernández-Gama R. 2008. Transformación de alfa-pineno por levaduras aisladas del mesenterón de *Dendroctonus valens* LeConte. (Tesis de Maestría). Escuela

Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México.

Hoffman, C. S., & Winston, F. (1989). A transcriptionally regulated expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*, 84(2), 473–479.

Iida, T., Sumita, T., Ohta, A., & Takagi, M. (2000). The cytochrome P450ALK multigene family of an n -alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast*, 16,1077–1087.

Johnson, D. C., Cano, K. E., Kroger, E. C., & McNabb, D. S. (2005). Novel regulatory function for the CCAAT-binding factor in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 4(10), 1662–1676.

Käppeli, O. (1986). Cytochromes P-450 of yeasts. *Microbiological Reviews*, 50(3), 244–258.

Kogure, T., Horiuchi, H., Matsuda, H., Arie, M., Takagi, M., & Ohta, A. (2007). Enhanced induction of cytochromes P450alk that oxidize methyl-ends of n-alkanes and fatty acids in the long-chain dicarboxylic acid-hyperproducing mutant of *Candida maltosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 271(1), 106–111.

Kumar, S., Randhawa, A., Ganesan, K., Raghava, G. P. S., & Mondal, A. K. (2012). Draft genome sequence of salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* MTCC 234. *Eukaryotic Cell*, 11(7), 961–962.

Lépingle, A., Casaregola, S., Neuvéglise, C., Bon, E., Nguyen, H. V., Artiguenave, F., ... Gaillardin, C. (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Letters*, 487(1), 82–86.

Minhas, A., Biswas, D., & Mondal, A. K. (2008). Development of host and vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(2009), 95–102.

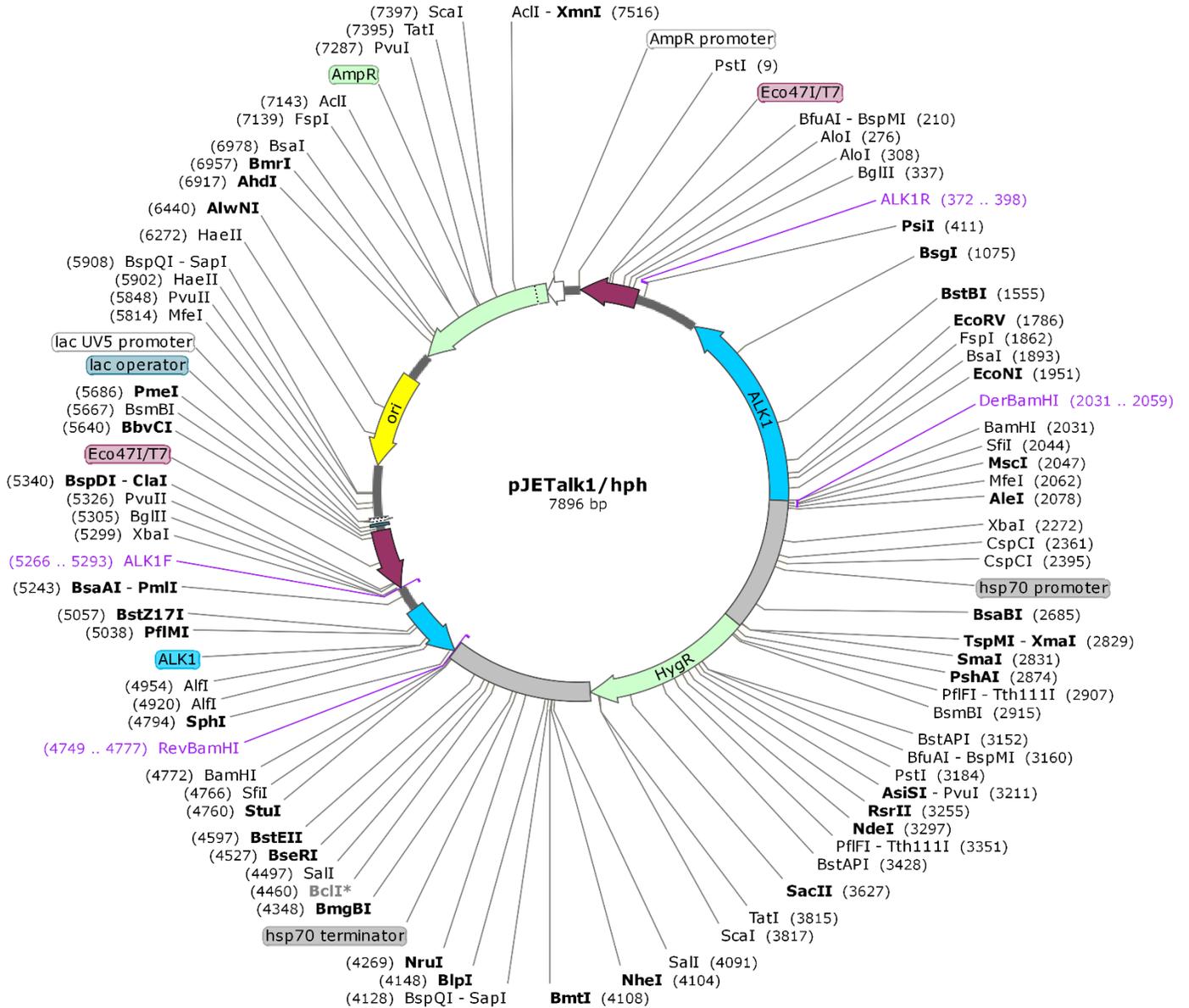
- Moqtaderi, Z., & Geisberg, J. V. (2013). Construction of mutant alleles in *Saccharomyces cerevisiae* without cloning: Overview and the delitto perfetto method. *Current Protocols in Molecular Biology*, (104), 1–17.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., ... Oakley, B. R. (2005). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), 1557–1566.
- Ortiz-Álvarez, J. M. (2014). Estudio de la capacidad hidrocarbonoclasta en cepas de *Yarrowia lipolytica* aisladas de suelos contaminados con gasolina. (Tesis de Licenciatura). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.
- Ortiz-Álvarez, J. M. (2015). Caracterización de algunos genes *ALK-CYP52* (codificantes para citocromos P450) de *Yarrowia lipolytica* y *Debaryomyces hansenii*. (Tesis de Maestría). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.
- Peixoto, R. S., Vermelho, A. B., & Rosado, A. S. (2011). Petroleum-degrading enzymes: Bioremediation and New Prospects. *Enzyme Research*, 2011.
- Ramírez-Elías, M. A. (2014). Microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo aislados de la rizósfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación. (Tesis de Doctorado). Colegio de posgraduados. Ciudad de México, México.
- Ricaurte, M. L., & Govind, N. S. (1999). Construction of plasmid vectors and transformation of the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 1(1), 15–19.
- Santos, M. A. S., Gomes, A. C., Santos, M. C., Carreto, L. C., & Moura, G. R. (2011). The genetic code of the fungal CTG clade. *Comptes Rendus Biologies*, 334(8–9), 607–611.

- Sasse, C., & Morschhäuser, J. (2012) Gene deletion in *Candida albicans* wild-type strains using the SAT1-flipping strategy. En Walker, J. M. (2012). *Methods in molecular biology*. (pp. 3-17). New York: Humana Press
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., ... Oakley, B. R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols*, 1(6), 3111–3120.
- Vázquez-Reyes, S (2016). Estudio de la capacidad hidrocarbonoclasta y análisis de tres genes *CYP52* de *Candida saitoana*. (Tesis de Licenciatura). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.
- Vera-Ponce de León, A. (2011). Fijación de nitrógeno y biotransformación del alfa pineno asociados a 3 gama-proteobacterias aisladas del intestino de *Dentroctonus* spp. (Tesis de Licenciatura). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.
- Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691.
- Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N., & Regev, A. (2007). Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature*, 449(7158), 54–61.
- Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6), 3003.1–3003.9
- Yadav, J. S., & Loper, J. C. (1999). Multiple P450alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene*, 226(2), 139–146.

Anexo I

Mapa de restricción de la construcción pJETalk1/hph

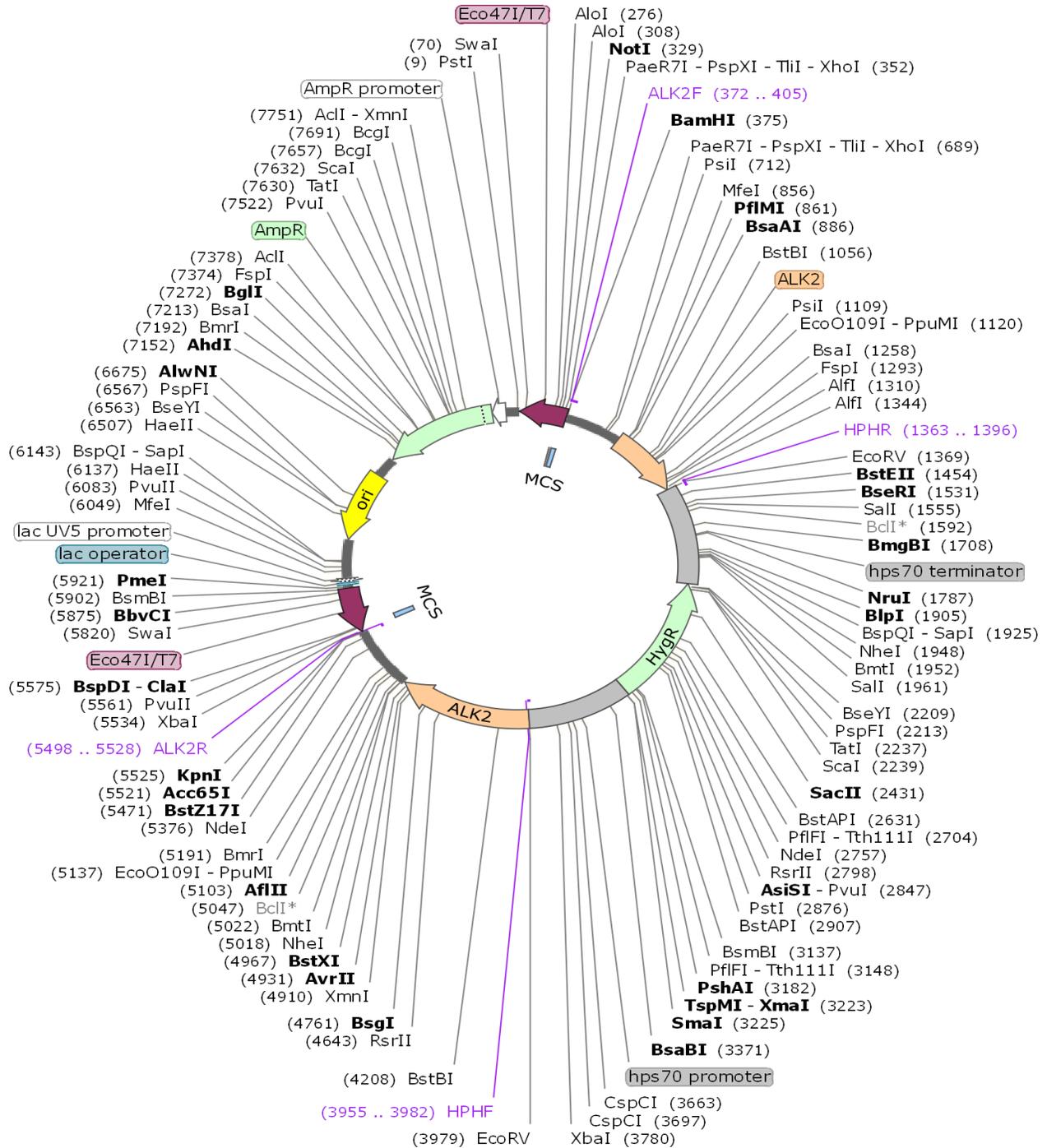
Created with SnapGene®



Anexo II

Mapa de restricción de la construcción pJETalk2/hph

Created with SnapGene®



pJET-ALK2/hph
8131 bp

Anexo III

Composición de los medios utilizados

Medio YPD	Cantidad (g)
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Dextrosa	20
Disolver en 1 litro de agua.	
Agregar 1.5 % de agarosa para preparar medio sólido	

Medio YPS	Cantidad (g)
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Sacarosa	103 (concentración final 0.3 M)
Disolver en 1 litro de agua.	
Agregar 1.5 % de agarosa para preparar medio sólido	

Medio LB (Luria Bertani)	Cantidad (g)
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Disolver en 1 litro de agua.	
Agregar 1.5 % de agarosa para preparar medio sólido	