



## Área XI

# Ciencias ómicas y edición de genomas



Contenido

DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA IMPLEMENTAR CRISPR-CAS9 EN LEVADURAS NO CONVENCIONALES <i>Kluyveromyces marxianus</i> AUTÓCTONAS DE MÉXICO Jenny Elizabeth Espinosa Ortega, Sylvie Le Borgne, Andrea Sabido-Ramos	380
VALIDACIÓN <i>in vivo</i> DE ENHANCERS TEJIDO-ESPECÍFICOS PUTATIVOS DURANTE EL DESARROLLO DE <i>Drosophila melanogaster</i> Juan Pablo Cruz Santos, Carlos Daniel Luna Gómez, Katarzyna Oktaba Sosin	381
ANÁLISIS DE GENÓMICA COMPARATIVA DE UN CONSORCIO CON BACTERIAS DEL GOLFO DE MÉXICO PARA LA DEGRADACIÓN DE PETRÓLEO EN AGUA DE MAR Jorge Alexander Rojas-Vargas, Libertad Adaya, Alexei Licea-Navarro, Hortencia Silva-Jiménez, Alejandro Sánchez-Flores, y Liliana Pardo-López.	382
COMPARACIÓN DE TRANSCRIPTOMAS DE DOS POBLACIONES DE GALPHIMIA SPP. PARA IDENTIFICAR GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE LAS GALFIMINAS Dianella Iglesias, María Luisa Villarreal, Ashutosh Sharma	383
EVALUACIÓN DEL PROTEOMA DE PARED CELULAR DE NEUROSPORA CRASSA PARA EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE DESPLIGUE DE PROTEÍNAS: CARACTERIZACIÓN DE LA GPI-PROTEÍNA, ACW-1 Ana Sofía Ramírez-Pelayo y Jorge Verdín	384
CARACTERIZACIÓN DEL METABOLISMO DE ESPECIES TERRESTRES Y MARINAS DE MÉXICO Jorge Xool Tamayo, Alan Hernández Melgar, Erick Huerta Romero, Nadia Caram Salas, Luz Garduño Villaseñor, María Arteaga Uribe, Mario Salazar Ceseña, Rodrigo Méndez Alonzo, Sara Fadia Ceccarelli, Lorena Riveroll Durán, Edelweiss Rangel Montoya, Jimena Carrillo Tripp, Nahum Valente Hernández, Olga Callejas Negrete, Rosa Mouriño Pérez, Rufina Hernández Martínez, Laura Gómez Consarnau, Miguel Cuevas Cruz, Erick Gutiérrez Grijalva, Esperanza Martínez Romero, José Aguirre Noyola, Patricia Valdespino Castillo, Robert Winkler, Diana Franco Vázquez, Laura Pérez Flores, Laila Partida Martínez, Rafael Bello Bedoy, Esteban López Sampedro, Hilda León Tejera, Magali Honey Escandon, Luis Donis Maturano, Cuauhtémoc Licon Cassani, Mario Figueroa Saldivar, Ernesto Beltrán Partida, Víctor Reinoso Rosales, María Venegas Reza, Martha Manzano Mora, Roberto Arreguín Espinosa, Daniela Trujillo Silva, Francisco Barona Gómez, Hilda Ramos Aboites, Ingrid Rodríguez Buenfil, Juan Ramírez Suárez, Laura Contreras Angulo, Lilian Palomino Álvarez, Nancy Suarez Mozo, Nuno Simões, Pedro Homá Canche, Felipe Vázquez Flota, Marcela Gamboa Angulo, Jaime Martínez Castillo, Aldo Moreno Ulloa	385
ESTUDIO DEL METABOLISMO DE HIDROCARBUROS EN LA PIEL DE SUJETOS EXPUESTOS A DERIVADOS DE PETRÓLEO Alan Gerardo Hernández-Melgar, Abraham Guerrero Ruíz, Aldo Moreno-Ulloa	386



COMPARACIÓN CUANTITATIVA ENTRE ESTRATEGIAS DE REDUCCIÓN DE GENOMA Y PROTEOMA PARA LA REDIRECCIÓN DE RECURSOS CELULARES A FUNCIONES SINTÉTICAS Elisa Márquez Zavala, José Utrilla Carreri	387
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO EN RESPUESTA AL ESTRÉS COMBINADO POR RADIACIÓN UV-B Y FRÍO EN PIMIENTO MORRÓN ( <i>CAPSICUM ANNUUM</i> ) Brandon Morales, Claudia Villicaña, Rubén León, Luis Lighbourn, José Basilio, Josefina León	388
MODELO METABÓLICO A ESCALA GENÓMICA DE <i>Acinetobacter schindleri</i> ACE Mitsuo Nakakawa, Adrián Jiménez, Juan Carlos Sigala , Roberto Olivares Hernández	389
EVALUACION DEL METABOLISMO DE PRODUCCION DE GLUCÓGENO EN <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> LEU18496 Gabriela Cejas Añón, Sergio Hernández Jiménez, Roberto Olivares-Hernández, Gabriel Vigueras Ramírez	390
ENSAMBLE, ANOTACIÓN, Y CONSTRUCCIÓN DEL MODELO METABÓLICO A ESCALA GENÓMICA DEL HONGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> LEU18496 SIMBIONTE DE LA HORMIGA <i>Atta mexicana</i> Freddy Castillo-Alonso, Mitsuo José Enrique Nakakawa Montes de Oca, Juan Carlos Sigala Alanís, Gabriel Vigueras Ramírez, Roberto Olivares-Hernández	391

## DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA IMPLEMENTAR CRISPR-CAS9 EN LEVADURAS NO CONVENCIONALES *Kluyveromyces marxianus* AUTÓCTONAS DE MÉXICO

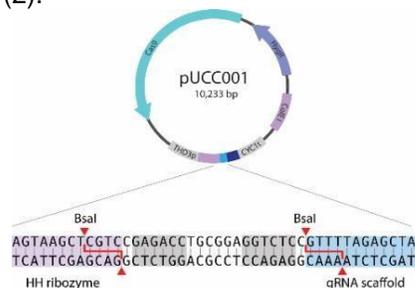
Jenny Elizabeth Espinosa Ortega<sup>1</sup>, Sylvie Le Borgne<sup>2</sup>, Andrea Sabido-Ramos<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Licenciatura en Ingeniería Biológica. Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, <sup>2</sup>Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Ciudad de México 05348  
[asabido@cua.uam.mx](mailto:asabido@cua.uam.mx)

**Palabras clave:** *K. marxianus*, CRISPR-Cas9, gRNA

**Introducción.** Entre las levaduras no convencionales más importantes se encuentra *Kluyveromyces marxianus*, pues posee la tasa de crecimiento más rápida de cualquier microbio eucarionte, es termotolerante, tiene la capacidad de asimilar un amplio espectro de sustratos y una baja tendencia a fermentar en presencia de altas concentraciones de azúcar (1). Debido a la poca disponibilidad de herramientas moleculares en estas levaduras, su empleo como fábricas celulares se ha visto obstaculizado, aunado a ciertos rasgos en la biología de *K. marxianus* que limitan su manipulación genética, como el sistema de reparación mediado por la unión de extremos no homólogos (NHEJ), lo que dificulta la integración de genes cromosomales de manera dirigida y precisa (2). Se ha demostrado que al inactivar cualquiera de los genes del sistema NHEJ, se mejora la capacidad para integrar ADN exógeno, favoreciendo el sistema de recombinación homólogo en *K. marxianus* (3).

El objetivo de este trabajo es proponer por primera vez en levaduras mexicanas de *Kluyveromyces marxianus*, un protocolo de Ingeniería genética basado en el uso de CRISPR-Cas9 para la edición fina de genes cromosomales, en particular de YKU80, uno de los genes centrales de la ruta NHEJ.

**Metodología.** Se utilizará el plásmido de edición pUCC001, el cual posee el gen *Cas9* bajo control del promotor de *A. adenivorans* y los elementos necesarios para expresar la molécula de ARN guía (gRNA) en *K. marxianus* (2).



**Fig. 1.** Mapa del plásmido pUCC001. Se muestra en gris la región delimitada por los sitios Bsal que permite el ensamblaje de nuevos gRNA's (2).

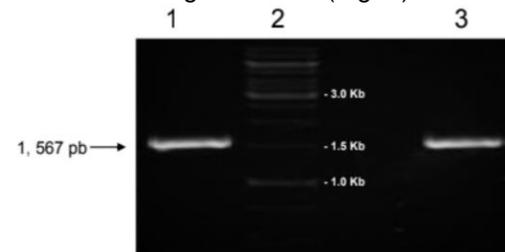
**Resultados.** Se proponen una serie de 7 pasos:

1. *Diseño in silico de gRNA's* a través de la página CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) utilizando como gen blanco a YKU80 (Tabla 1).

**Tabla 1.** gRNA's utilizados en este trabajo. El nombre corresponde a la posición nucleotídica dentro del gen YKU80. Se omite la secuencia PAM, overhangs en negritas.

Nombre	Secuencia
146	<b>CGTC</b> AAGAAAGACAGACTACGTCC
997	<b>CGTC</b> GGTATCGATATCAGAGGGTT
1670	<b>CGTC</b> TTTTGTCCCATAGGACCCCT

2. *Validación de gRNA's* mediante la amplificación de la región a inactivar del gen YKU80 (Fig. 2).



**Fig. 2.** PCR con los gRNAs 146 y 1670. Carril 1: Genómico de *K. marxianus* CBS 6556 (control), 2. Marcador de peso, 3. Genómico de *K. marxianus* 24 (aislada de la planta de agave).

3. *Alineamiento de gRNA's complementarios.*

4. *Ensamblaje del plásmido de edición y gRNA's.* Los oligos alineados con overhangs específicos serán clonados en el sitio Bsal del pUCC001 mediante ensamblaje Golden Gate.

5. *Transformación de células de E. coli con el plásmido generado y selección de candidatas.*

6. *Generación de mutantes K.marxianus.* Transformación de las levaduras con los plásmidos purificados de 5 a través del protocolo LiAc/ssDNA/PEG (4).

7. *Eliminación del pUCC001 y comprobación de la edición de YKU80.*

**Conclusiones.** Se espera que el desarrollo de este protocolo permita implementar de manera rápida y eficiente el uso de la técnica CRISPR por primera vez en levaduras de *K. marxianus* autóctonas mexicanas y con ello favorecer la integración sitio dirigida de ADN exógeno.

**Agradecimiento.** Apoyo PRODEP 47410680.

**Bibliografía.**

- Lane MM, Burke N, Karreman R, Wolfe KH, O'Byrne CP, Morrissey JP. (2011). *Antonie Van Leeuwenhoek* 100: 507-519.
- Rajkumar AS Varela JA, Juergens H, Daran JG, Morrissey JP. (2019). *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7: 97.
- Nambu-Nishida Y, Nishida K, Hasunuma T, Kondo A. (2017). *Sci. Rep.* 7: 8993.
- Cernak R, Estrela R, Poddar S, Skerker JM, Cheng YF, Carlson AK, et al. (2018). *MBio.* 9: 1-16.

## VALIDACIÓN *in vivo* DE ENHANCERS TEJIDO-ESPECÍFICOS PUTATIVOS DURANTE EL DESARROLLO DE *Drosophila melanogaster*

Juan Pablo Cruz Santos, Carlos Daniel Luna Gómez, Katarzyna Oktaba Sosin. CINVESTAV Unidad Irapuato, Departamento de Ingeniería Genética. Irapuato, Guanajuato, México; CP. 36821  
k.oktaba@cinvestav.mx

*Palabras clave:* Enhancers, genómica, desarrollo.

**Introducción.** Los enhancers son regiones genómicas no codificantes entre 150 a 1500 pb que interactúan con otras secuencias de DNA como los promotores, regulando la expresión espacio-temporal de un gen blanco en respuesta a diferentes señales como la unión de factores de transcripción (TF) en sus sitios de unión (TFBS), independientemente de la orientación a la que se encuentren respecto a su región de interacción (Haberle & Stark, 2018). El estudio de su función se ha visto limitado por la dificultad de su identificación. Utilizando herramientas genómicas, identificamos enhancers tejido-específicos putativos durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* en el establecimiento del eje dorso-ventral que a pesar de ser un proceso ampliamente descrito, poco se conoce sobre la regulación de los genes expresados en las líneas germinales de ectodermo dorsal, neuroectodermo y mesodermo que darán origen al resto de los tejidos. El objetivo de este trabajo es validar experimentalmente los enhancers tejido-específicos putativos que regulan el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

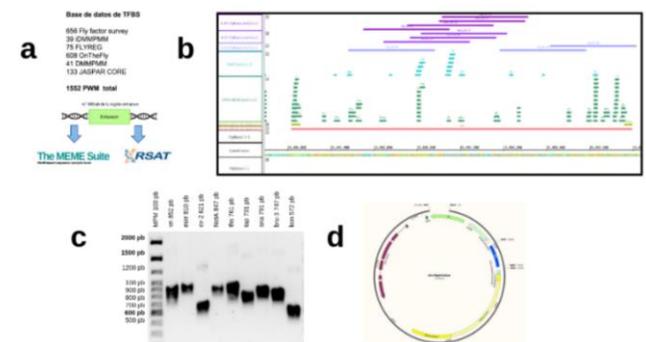
**Metodología.** Utilizamos embriones mutantes de *Drosophila melanogaster* que se mantienen en una sola línea germinal: *gd<sup>7</sup>* ectodermo dorsal, *Toll<sup>tm9/rm10</sup>* neuroectodermo y *Toll<sup>10B</sup>* mesodermo, para cada tipo realizamos experimentos de RNA-Seq y ChIP-seq dirigido a las marcas epigenéticas de enhancers activos: H3K4me1, H3K27ac y H3K18ac, considerando dos escalas temporales de 2-4 h y 6-8 h después de la fertilización. Con estos datos y empleando datos públicos de ATAC-Seq (Cusanovich et al., 2018) realizamos análisis bioinformáticos para identificar los enhancers tejido- específicos putativos. Para validar los resultados, seleccionamos 9 enhancers-candidatos y los clonamos en un vector con un gen reportero (Perry et al., 2011) para generar moscas transgénicas. Empleando la técnica FISH, pretendemos realizar el análisis del patrón de la expresión espacio-temporal del gen reportero en los embriones.

**Resultados.** Seleccionamos 3 enhancers por tejido para validar, considerando el enriquecimiento de las señales de ChIP-Seq de las marcas epigenéticas y cuyo gen blanco está involucrado en el desarrollo de *Drosophila*. Para delimitar las regiones a evaluar, realizamos la búsqueda de TFBS usando MEME y

RSAT, y considerando datos públicos de ChIP-seq de Factores de Transcripción (FlyBase).

**Tabla 1.** Enhancer seleccionados para validar por cada tejido

Gene	Función	Tiempo	tamaño
cv-2	Ligando de BMP	Temprano y tardío (2)	621 pb
vn	Ligando de EGFR	Tardío	852 pb
mirr	Factor de transcripción	Tardío (2)	810 pb
ths	Factor de crecimiento de Fibroblastos	Temprano (2)	762 pb
tap	Factor de transcripción	Tardío	731 pb
NetA	Morfógeno	Tardío (2)	843 pb
sna	Factor de transcripción	Temprano	791 pb
kon	Proteína transmembranal	Tardío	572 pb
bru-3	Proteína de unión a RNA	Tardío	747 pb



**Fig. 1.** a) Búsqueda de TFBS en los enhancers seleccionados b) TFBS identificados *in silico* y con datos de ChIP-seq dentro del enhancer candidato de *sna* c) Productos de PCR para clonar dentro del vector PPhiYellow d) construcciones inserto-vector (*ths*) para generar moscas transgénicas y observar el patrón de expresión del gen reportero.

**Conclusiones.** El proyecto se encuentra en fase experimental para observar los patrones de expresión del gen reportero y el funcionamiento de los enhancers a evaluar.

**Agradecimiento.** Al CONACYT por la beca nacional de maestría. Al posgrado de Biología Integrativa.

### Bibliografía.

- (1)Haberle, V., Stark, A. (2018). *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19 (10): 621–637.
- (2)Cusanovich, D. A., Reddington, J. P., Garfield, D. A., Daza, R. M., Aghamirzaie, D., Marco-Ferreres, R., Pliner, H. A., Christiansen, L., Qiu, X., Steemers, F. J., Trapnell, C., Shendure, J., & Furlong, E. E. M. (2018). *Nature*, 555 (7697): 538–542.
- (3)Perry, M. W., Boettiger, A. N., Bothma, J. P., & Levine, M. (2010). *Current Biology.* 20 (17): 1562–1567.



## ANÁLISIS DE GENÓMICA COMPARATIVA DE UN CONSORCIO CON BACTERIAS DEL GOLFO DE MÉXICO PARA LA DEGRADACIÓN DE PETRÓLEO EN AGUA DE MAR

Jorge Alexander Rojas-Vargas, Libertad Adaya, Alexei Licea-Navarro, Hortencia Silva-Jiménez, Alejandro Sánchez-Flores, y Lilita Pardo-López. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, C.P. 62210  
jorge.rojas@ibt.unam.mx

*Palabras clave: degradación, consorcio, genómica comparativa.*

**Introducción.** La exposición de petróleo en el océano representa un enorme riesgo para el ambiente. Una propuesta para remediarlo consiste en aprovechar el potencial de ciertos microorganismos para degradar hidrocarburos. Y, a diferencia de una sola bacteria, las comunidades bacterianas ofrecen una mayor variedad de genes degradadores (1). Mediante un proceso de tamizaje estadístico, se seleccionaron 4 cepas del Golfo de México para la remoción de crudo ligero, de un conjunto de 111 aislados. El estudiar la maquinaria genética de esta comunidad, y la distancia filogenética de algunos genes claves para la degradación, daría más claridad sobre cómo podría estar funcionando este consorcio. El objetivo: identificar los aislados de un consorcio y su potencial para degradar hidrocarburos.

**Metodología.** El ADN extraído de cada aislado se secuenció por Illumina y se ensambló usando el pipeline A5. La asignación taxonómica se hizo por medio de MiGA y del servidor TYGS (2). La anotación de los genomas se hizo utilizando RAST. El análisis filogenético de las cepas se realizó extrayendo las proteínas ribosomales de las subunidades grande y pequeña de las cepas con mayor % ANI y %AAI. Se hizo una búsqueda por homología de secuencias de aminoácidos de enzimas claves para la degradación de hidrocarburos, y luego su análisis filogenético. Finalmente, se estudió la remoción de petróleo ligero API 35, por gravimetría a tiempo final de 75 días, en un medio de agua de mar enriquecido con nitrógeno y fósforo. Se probaron las cepas por separado y en consorcio.

**Resultados.** Luego del ensamblado, la asignación taxonómica de los aislados se resume en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros obtenidos para determinación de la taxonomía de los aislados del consorcio

Género	Posible especie <sup>a</sup>	Mash D	%ANI	dDDH	Diferencia contenido G+C
<i>Alcanivorax</i>	<i>xenomutans</i>	0.013	98.43	85	0.11
<i>Paenarthrobacter</i>	<i>sp.</i>	0.135	85.59	25.2	0.04
<i>Pseudomonas</i>	<i>aestusnigri</i>	0.028	97.01	73.1	0.26
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	0.009	99.43	95	0.43

<sup>a</sup> Las cepas contra las que se hicieron los cálculos fueron *A. xenomutans* JC109, *Paenarthrobacter nicotinovorans* JCM3874, *P. aestusnigri* CECT8317 y *P. aeruginosa* DSM50071

El análisis filogenético de las cepas, utilizando las

subunidades SSU y LSU ribosomales, reveló la formación de 2 clados principales: en uno se agruparon las 3 cepas pertenecientes al Phylum Proteobacteria (*Alcanivorax* y las 2 *Pseudomonas*), y en otro la del Phylum Actinobacteria (*Paenarthrobacter*). La búsqueda de genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos reveló un grupo variado de éstos. Entre los genes comunes para las Proteobacteria, se encontraron las monooxigenasas *alkB1* y *alkB2* para alcanos de cadenas cortas y medianas, *almA* para alcanos de cadenas largas (3), rubredoxinas reductasa, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, y reguladores transcripcionales como *alkN* y *alkS*. Entre los genes menos comunes en las cepas, y presentes en su mayoría en la *Paenarthrobacter*, están la catecol 1,2 dioxigenasa, benzoato 1,2 dioxigenasa, gentisato 1,2 dioxigenasa, protocatecuato 3,4 dioxigenasa, ciclohexanona monooxigenasa y antranilato dioxigenasa, todas involucradas en la degradación de algunos compuestos monoaromáticos (1). Un análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos reveló divergencias superiores al 80% entre homólogos en algunos casos, sugiriendo una posible preferencia entre sustratos, como es el caso de las dos monooxigenasas *alkM* en *Acinetobacter sp.* M1 (4). Con la prueba de remoción de petróleo API 35, se alcanzaron remociones cercanas al 40% con las cepas por separado, y alrededor del 60% en consorcio, luego de 75 días de incubación, en concordancia con lo observado *in silico*.

**Conclusiones.** La complementariedad en la maquinaria metabólica del consorcio encontrado mediante el análisis genómico, y los resultados de la prueba de remoción de petróleo API 35, hacen inferir que los 4 aislados trabajan de forma sinérgica para favorecer la remoción de una mezcla de hidrocarburos.

**Agradecimiento.** Se agradece al Fondo Sectorial CONACYT-SENER- Hidrocarburos, proyecto 201441.

### Bibliografía.

- Xu, X.; Liu, W.; Tian, S.; Wang, W.; Qi, Q. et al. (2018) *Front. Microbiol.* 9 (2885).
- Meier-Kolthoff, J.P. & Göker, M. (2019). *Nat Commun*, vol. 10 (2182).
- Wang, W. & Shao, Z. (2012). *FEMS Microbiol Ecol* 80: 523–533
- Tani A, Ishige T & Sakai Y (2001). *J Bacteriol* 183: 1819–1823



## COMPARACIÓN DE TRANSCRIPTOMAS DE DOS POBLACIONES DE *GALPHIMIA* SPP. PARA IDENTIFICAR GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE LAS GALFIMINAS

Dianella Iglesias, María Luisa Villarreal, Ashutosh Sharma. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigación en Biotecnología. Cuernavaca, CP:62209  
[iglesiasdia@gmail.com](mailto:iglesiasdia@gmail.com)

*Palabras clave:* anotación funcional, expresión diferencial, triterpenoides.

**Introducción.** *Galphimia* spp. es una planta con efectos ansiolítico y sedantes (1) debido a la presencia de compuestos triterpenoides modificados denominados galfiminas (2). La ruta de síntesis de las galfiminas no se encuentra elucidada aún. Si se tienen en cuenta las propiedades biológicas de estos metabolitos, sería de utilidad el uso de herramientas biotecnológicas como la Transcriptómica para identificar los genes que codifican enzimas claves en la producción de estos triterpenoides.

El objetivo de este trabajo fue comparar transcriptomas de dos poblaciones de *Galphimia* spp., una productora y otra no productora de galfiminas para identificar genes que codifican enzimas de la ruta de síntesis de estos triterpenoides.

**Metodología.** Se secuenciaron librerías de cDNA de muestras de hojas y raíces de *Galphimia* spp de una población de Guanajuato, productora de galfiminas, así como de hojas de Tepoztlán, población no productora de galfiminas, en la plataforma Illumina Next Seq 550. Se ensamblaron los transcriptomas mediante Trinity. El análisis de expresión diferencial se realizó con edgeR y la anotación funcional en Blast2GO en tres niveles de ontología génica.

**Resultados.** Se observaron transcritos con expresión diferencial, regulados positiva y negativamente con un elevado nivel de significación estadística.

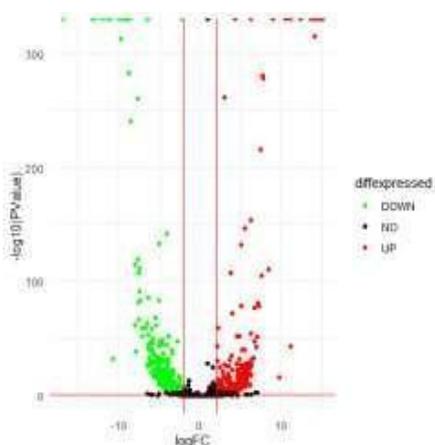


Fig. 1. Expresión diferencial de transcritos de las poblaciones de Guanajuato y Tepoztlán de *Galphimia* spp.

Se obtuvieron porcentajes significativos de mapeo y anotación en el nivel de ontología génica Función Molecular (FM) y Componente Celular (CC). En el nivel FM, la mayor parte de los transcritos anotados estuvieron relacionados con la actividad de oxidorreductasas, hidrolasas y de unión a iones metálicos. En el nivel Componente Celular, estos se encuentran localizados en su mayoría en el cloroplasto, formando parte de complejos proteínicos y de componentes integrales.

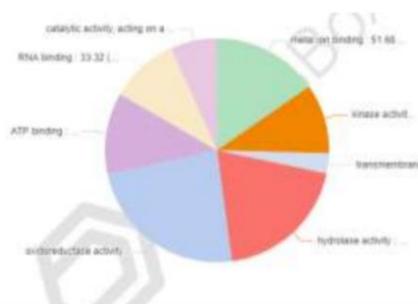


Fig. 2. Distribución de transcritos en el nivel de ontología génica Función Molecular

**Conclusiones.** Se hallaron transcritos con expresión diferencial regulados positivamente, con una elevada significación estadística. Estos se encontraron asociados a cloroplastos o proteínas con actividad quinasa, hidrolasa y de transporte.

**Agradecimiento.** CONACYT, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, CEIB.

### Bibliografía.

- Romero-Cerecero O, Islas-Garduño AL, Zamilpa A, Pérez- García M, Tortoriello J. (2018). *Evid Based Complementary Altern Med*. 2018: 1-8.
- Toscano RA, Ortega A, Maldonado E, Gaviño R, Lozoya X, Tortoriello J. (1993). *Acta Crystallogr. Sect. C*. 49 (4): 774- 776.

## EVALUACIÓN DEL PROTEOMA DE PARED CELULAR DE *NEUROSPORA CRASSA* PARA EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE DESPLIEGUE DE PROTEÍNAS: CARACTERIZACIÓN DE LA GPI-PROTEÍNA, ACW-1

Ana Sofía Ramírez-Pelayo y Jorge Verdín

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Industrial, Zapopan, Jalisco, 45019, anramirez\_al@ciatej.edu.mx

*Palabras clave:* despliegue de proteínas, *Neurospora crassa*, proteoma

**Introducción.** El despliegue de proteínas permite funcionalizar la superficie celular, la membrana plasmática o la pared celular, de un microorganismo mediante la expresión de una fusión compuesta de una proteína con propiedades interesantes o útiles (pasajero) unida covalentemente a una proteína que reside nativamente en la superficie celular (ancla). Esta tecnología se usa para generar biocatalizadores de célula completa, bioprocesos consolidados, seleccionar ligandos de alta afinidad, entre otros. Su diseño racional implica conocer el papel que desempeña el ancla en la superficie celular para saber si es factible usarla o no, en caso de que el despliegue resultara deletéreo para su función normal. La pobre caracterización de los proteomas de superficie celular dificulta la implementación de sistemas de despliegue en ciertos microorganismos, sobre todo aquellos con aplicación biotecnológica como hongos filamentosos. En el presente trabajo se caracterizó funcionalmente una proteína de pared celular, la GPI-proteína ACW-1 (NCU08936), del hongo filamentososo *Neurospora crassa* para usarla como ancla en un sistema de despliegue de proteínas en este microorganismo.

**Metodología.** Se identificaron los ortólogos de ACW-1 en otros hongos mediante un análisis *in silico* de secuencias proteicas y reconstrucción filogenética por método de Neighbor-Joining (1 y 2). Se observó la morfología de cepas *N. crassa*  $\Delta acw-1$  (*Nc*  $\Delta acw-1$ ) en comparación con *N. crassa* WT (*Nc* WT) de las colonias bajo microscopio óptico y se evaluó su crecimiento en condiciones normales y de inhibición con CFW ("Calcofluor White") (0.25-1 mg/mL) (3). Se construyó una fusión de despliegue usando ACW-1 como ancla y GFP como pasajero por ensamblado Gibson (Fig 1A) (4), y se transformó en *N. crassa* (FGSC-9717) por electroporación. Se evaluó la localización celular del despliegue mediante microscopía confocal de fluorescencia (5).

**Resultados.** El homólogo de ACW-1 en *S. cerevisiae*, Ecm33p, está involucrado en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. *Nc*  $\Delta acw-1$  presentó una morfología aberrante en las hifas que se caracterizó por una ramificación errática. *Nc*  $\Delta acw-1$  creció a la misma

velocidad que *Nc* WT en condiciones normales. En presencia de CFW, ambas cepas se inhibieron al aumentar la concentración, pero *Nc*  $\Delta acw-1$  fue más resistente que *Nc* WT (0.75 mg/mL) (Fig 1B). La señal fluorescente de la fusión de ACW-1 y GFP (GFP-V5-ACW-1) se observó mayoritariamente en la periferia (Fig 1D, flechas amarillas) y los septos de las hifas (Fig 1D, flechas blancas).

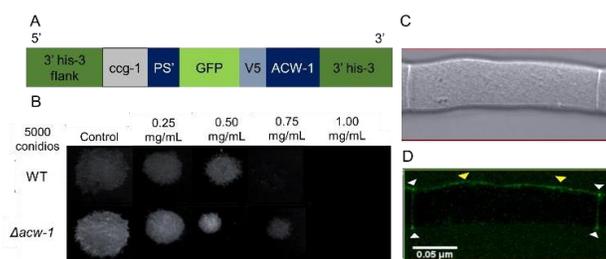


Fig. 1. A. Fusión de despliegue GFP-V5-ACW-1. B. Crecimiento de cepas WT y  $\Delta acw-1$  en presencia de CFW. C) Contraste de fases y D) canal de fluorescencia de la porción distal de una hifa que expresa la fusión de despliegue GFP-V5-ACW-1. Contraste ajustado en Image J.

**Conclusiones.** ACW-1 probablemente está involucrada en el mantenimiento de la pared celular de *N. crassa*, pero no parece que sea necesaria para su supervivencia, por lo que sería una buena opción como ancla. La señal fluorescente de GFP-V5-ACW-1 en la periferia de hifas vegetativas y mayoritariamente alrededor de septos indican la probable localización del despliegue de proteínas en esta región.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue apoyado por SENER- CONACYT "Sustentabilidad Energética", proyecto 245750.

### Bibliografía.

1. Caro, L.; Tettelin, H.; Vossen, J.; Ram, A.; van den Ende, H.; Klis, F. (1997). *Yeast*. 13 (15): 1477-1489.
2. Altschul, S.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.; Lipman, D. (1990). *J Mol Bio*. 215 (3): 403-410.
3. Ram, A.; Klis, F. (2006). *Nat Protoc*. 1 (5): 2253-2256.
4. Gibson, D.; Young, L.; Chuang, R.; Venter, J.; Hutchison, C.; Smith, H. (2009). *Nat Methods*. 6 (5): 343-345.
5. Hickey, P.; Jacobson, D.; Read, N.; Glass, L. (2002). *Fungal Genet Biol*. 37 (1): 109-119.



## CARACTERIZACIÓN DEL METABOLISMO DE ESPECIES TERRESTRES Y MARINAS DE MÉXICO

Jorge Xool Tamayo<sup>1</sup>, Alan Hernández Melgar<sup>1</sup>, Erick Huerta Romero<sup>1</sup>, Nadia Caram Salas<sup>1</sup>, Luz Garduño Villaseñor<sup>2</sup>, María Arteaga Uribe<sup>2</sup>, Mario Salazar Ceseña<sup>2</sup>, Rodrigo Méndez Alonzo<sup>2</sup>, Sara Fadia Ceccarelli<sup>2</sup>, Lorena Riveroll Durán<sup>3</sup>, Edelweiss Rangel Montoya<sup>4</sup>, Jimena Carrillo Tripp<sup>4</sup>, Nahum Valente Hernández<sup>4</sup>, Olga Callejas Negrete<sup>4</sup>, Rosa Mourinho Pérez<sup>4</sup>, Rufina Hernández Martínez<sup>4</sup>, Laura Gómez Consarnau<sup>5</sup>, Miguel Cuevas Cruz<sup>5</sup>, Erick Gutiérrez Grijalva<sup>6</sup>, Esperanza Martínez Romero<sup>7</sup>, José Aguirre Noyola<sup>7</sup>, Patricia Valdespino Castillo<sup>8</sup>, Robert Winkler<sup>9</sup>, Diana Franco Vázquez<sup>10</sup>, Laura Pérez Flores<sup>10</sup>, Laila Partida Martínez<sup>11</sup>, Rafael Bello Bedoy<sup>12</sup>, Esteban López Sampedro<sup>13</sup>, Hilda León Tejera<sup>13</sup>, Magali Honey Escandon<sup>13</sup>, Luis Donis Maturano<sup>14</sup>, Cuauhtémoc Licona Cassani<sup>15</sup>, Mario Figueroa Saldivar<sup>16</sup>, Ernesto Beltrán Partida<sup>17</sup>, Víctor Reinoso Rosales<sup>18</sup>, María Venegas Reza<sup>19</sup>, Martha Manzano Mora<sup>19</sup>, Roberto Arreguín Espinosa<sup>19</sup>, Daniela Trujillo Silva<sup>20</sup>, Francisco Barona Gómez<sup>21</sup>, Hilda Ramos Aboites<sup>21</sup>, Ingrid Rodríguez Buenfil<sup>22</sup>, Juan Ramírez Suárez<sup>23</sup>, Laura Contreras Angulo<sup>24</sup>, Lilian Palomino Álvarez<sup>25</sup>, Nancy Suarez Mozo<sup>25</sup>, Nuno Simões<sup>25</sup>, Pedro Homá Canche<sup>25</sup>, Felipe Vázquez Flota<sup>26</sup>, Marcela Gamboa Angulo<sup>27</sup>, Jaime Martínez Castillo<sup>28</sup>, Aldo Moreno Ulloa<sup>1,29</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Innovación Biomédica, CICESE, Ensenada, C.P.22860; <sup>2</sup>Departamento de Biología de la Conservación, CICESE, Ensenada, C.P.22860;

<sup>3</sup>Departamento de Biotecnología Marina, CICESE, Ensenada, C.P.22860; <sup>4</sup>Departamento de Microbiología Experimental, CICESE, Ensenada, C.P.22860; <sup>5</sup>Departamento de Oceanografía Biológica, CICESE, Ensenada, C.P.22860; <sup>6</sup>CIAD, Culiacán, México C.P.80110; <sup>7</sup>CCG, UNAM, Cuernavaca, C.P.62210; <sup>8</sup>Departamento Académico de Ingeniería en Pesquerías, UABC, La Paz, C.P.23080; <sup>9</sup>Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV, Irapuato, C.P.36824; <sup>10</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, UAM, Ciudad de México, C.P.9340; <sup>11</sup>Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Irapuato, C.P.36824; <sup>12</sup>Facultad de Ciencias, UABC, Ensenada, C.P.22860; <sup>13</sup>Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México, C.P.4510; <sup>14</sup>Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepan de las Barras, C.P.54090; <sup>15</sup>Facultad de Ingeniería y Ciencias, ITESM, Monterrey, C.P.64849; <sup>16</sup>Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, C.P.4510; <sup>17</sup>Instituto de Ingeniería, UABC, Mexicali, C.P.21280; <sup>18</sup>Instituto de Biología, UNAM, Ciudad de México, C.P.4510; <sup>19</sup>Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México, C.P.4510; <sup>20</sup>PICYT, San Luis Potosí, C.P.78216; <sup>21</sup>LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato, C.P.36824; <sup>22</sup>Subsede sureste, CIATEJ, Mérida, C.P.97302; <sup>23</sup>Tecnología de Alimentos de Origen Animal, CIAD, Hermosillo, México C.P.83304; <sup>24</sup>Tecnología de Alimentos y Biotecnología, CIAD, Culiacán, C.P.80110; <sup>25</sup>UMDI-Sisal, UNAM, Sisal, C.P.54090; <sup>26</sup>Unidad Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, CICY, Mérida, C.P.97205; <sup>27</sup>Unidad de Biotecnología, CICY, Mérida, C.P.97205; <sup>28</sup>Unidad de Recursos Naturales, CICY, Mérida, C.P.97205; <sup>29</sup>Laboratorio MetPro, CICESE, Ensenada, C.P.22860

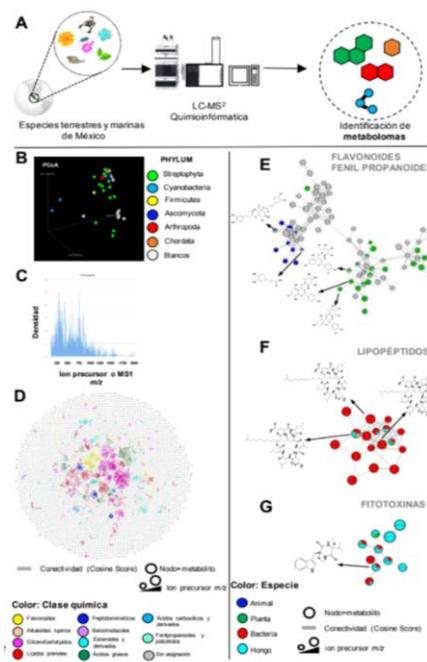
[jxool@cicese.mx](mailto:jxool@cicese.mx); [amoreno@cicese.mx](mailto:amoreno@cicese.mx)

*Palabras clave:* Espectrometría de masas; Quimioinformática; Metabolómica.

**Introducción.** México posee un gran repertorio de especies terrestres y marinas con el potencial de sintetizar metabolitos secundarios de interés biotecnológico y biomédico. Algunos estudios han identificado ciertos metabolitos de especies colectadas en el territorio del país, incluyendo principalmente plantas. No obstante, dichos estudios han sido limitados con respecto a la capacidad de analizar sistemáticamente varias especies, comparar los perfiles metabolómicos entre especies e identificar metabolitos. En este trabajo presentamos datos preliminares del Proyecto **METabolómica del territorio México** (denominado MÉTxico), el cual trata de caracterizar los metabolomas de especies terrestres y marinas que habitan en el país. Esta información generada a nivel metabolómico incidirá en la bioprospección y quimiotaxonomía de especies, así como en la identificación de metabolitos con potencial biotecnológico y biomédico.

**Metodología.** Se emplearon 3 aproximaciones principales: 1) Recolección de especies terrestres y marinas a través de una colaboración multiinstitucional; 2) Extracción de los metabolomas (metanol:acetato de etilo:acetonitrilo) y adquisición de datos por LC-MS<sup>2</sup> (Agilent 1260 Infinity-Accurate Mass QTOF 6530). 3) Análisis e identificación de los metabolitos empleando software (Proteowizard, Cytoscape) y plataformas en línea de libre acceso (<https://gnps.ucsd.edu>) (Fig. 1A) (1,2).

**Resultados.** Hasta ahora se han analizado 29 especies (plantas, bacterias, hongos, insectos) (Fig. 1B), cuyos metabolomas comprenden compuestos entre 100-1970 Da (Fig. 1C) pertenecientes a diversas clases químicas (Fig. 1D). Se identificaron compuestos con predominancia en ciertas especies, incluyendo flavonoides en plantas, fenil propanoides en animales (Fig. 1E), lipopéptidos en bacterias (Fig. 1F) y fitotoxinas en hongos (Fig. 1G). **Conclusiones.** Este estudio demuestra la relevancia del empleo de la LC-MS<sup>2</sup> y quimioinformática para entender el metabolismo y la diversidad química de especies.



**Fig. 1.** Esquema general de la metodología y resultados de los avances del Proyecto MÉTxico. A) Pasos generales de la metodología. B) PCoA de la distribución espacial de las especies analizadas. C) Histograma de la masa-carga ( $m/z$ ) de los metabolitos detectados. D) Clasificación química de los metabolitos detectados. E-G) Distribución de metabolitos por especie.

**Agradecimiento.** Estancias Posdoctorales por México (ID: 133718) CONACyT. Apoyos para Adquisición y Mantenimiento de Infraestructura en Instituciones y Laboratorios de Investigación Especializada (ID: 300437) CONACyT. Laboratorio MetPro.

### Bibliografía.

1.-Aron, A.T., Gentry, E.C., McPhail, K.L. *et al. Nat Protoc* **15**, 1954–1991 (2020). 2.-Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Ideker, T. (2003). *Genome Research*, **13**(11), 2498–2504.

## ESTUDIO DEL METABOLISMO DE HIDROCARBUROS EN LA PIEL DE SUJETOS EXPUESTOS A DERIVADOS DE PETRÓLEO

Alan Gerardo Hernández-Melgar<sup>1</sup>, Abraham Guerrero Ruiz<sup>2</sup> y Aldo Moreno-Ulloa<sup>1,3</sup>,

<sup>1</sup>Laboratorio MS2, Departamento de Innovación Biomédica, CICESE, Ensenada, C.P: 22860; <sup>2</sup>Unidad Regional Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, CIAD, Mazatlán, C.P: 82112; Laboratorio MetPro, CICESE, Ensenada, C.P: 22860.  
[alangerardo@cicese.edu.mx](mailto:alangerardo@cicese.edu.mx)

*Palabras Clave:* Metabolómica; piel; espectrometría de masas

**Introducción.** Los hidrocarburos (HC) derivados del petróleo están presentes en el ambiente y la piel está constantemente expuesta a ellos. Reportes epidemiológicos sugieren una correlación positiva entre la exposición a HC y la aparición de lesiones en la piel (1). Estudios *in vitro* han demostrado la generación de metabolitos tóxicos y carcinogénicos derivados de la degradación de ciertos HC por bacterias y células mamíferas (2,3). No obstante, aquella evidencia es indirecta y, por lo tanto, se desconoce que ocurre directamente en la piel de sujetos expuestos a HC. Los objetivos de este trabajo consisten en entender el metabolismo *in situ* de HC y el efecto de la exposición crónica a HC sobre el microbioma de la piel.

**Metodología.** Se seleccionaron 2 cohortes; sujetos con exposición crónica a HC (trabajadores de talleres mecánicos) y sin exposición (Fig. 1). A cada sujeto de las cohortes se le tomaron 2 muestras superficiales (mano y hombro) con un hisopo de algodón para su posterior análisis por secuenciación del amplicón ARNr 16S y metabolómica (4). Una vez colectadas las muestras, los metabolitos se analizaron mediante HPLC-MS<sup>2</sup>. Para la secuenciación del gen ARNr 16S se siguió la metodología indicada por Illumina. Los datos de ambas técnicas, se analizaron según lo reportado por Moreno-Ulloa *et al.* 2020 (5).

**Resultados.** Los sujetos expuestos a HC presentan una mayor diversidad microbiana (Fig. 2a). El análisis de varianzas, utilizando las distancias de UniFrac (Fig. 2b), sugiere que la exposición a HC y el sitio corporal de muestreo están asociados con la composición de las comunidades bacterianas. El análisis cuantitativo de la abundancia microbiana sugiere una mayor abundancia de bacterias pertenecientes a la familia de *Micrococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhodobacteraeae* en sujetos expuestos vs. No expuestos (Fig. 2c y 2d).

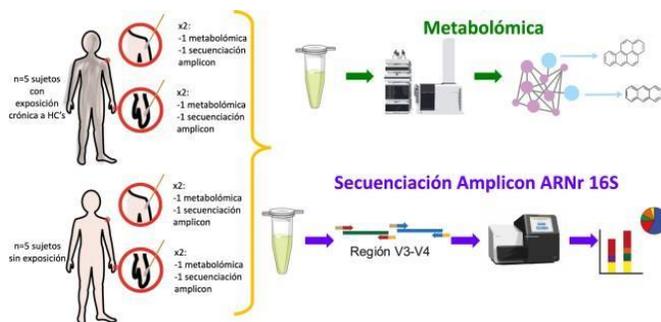


Fig. 1. Metodología general seguida en este estudio.

La predicción del estado funcional de las comunidades microbianas por PICRUST, sugiere un incremento en la degradación de HC en las manos de sujetos expuestos vs. No expuestos (Fig. 2f). El análisis metabolómico de los datos muestra una diversidad química del metaboloma detectado en la piel de las cohortes (Fig. 2g). Mediante análisis multivariantes y no supervisados de agrupación se sugiere un patrón de diferenciación entre los sujetos expuestos vs. No expuestos, particularmente a nivel de la mano (exposición directa a HC) (Fig. 2h y 2i). Mediante la cuantificación diferencial de la abundancia de metabolitos entre grupos; se observa una diferencia de varios metabolitos en la mano de sujetos expuestos (Fig. 2j y 2k).

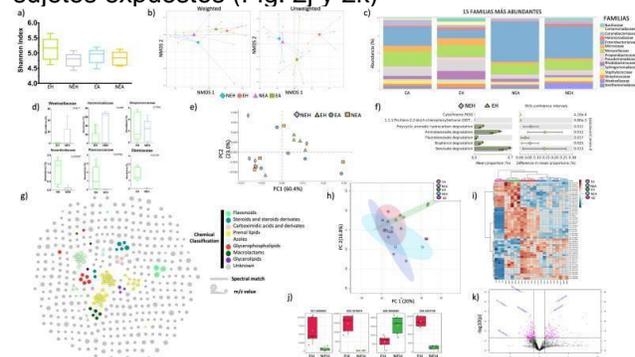


Figura 2. Resultados de los análisis metabolómicos y de secuenciación. Donde EH: mano expuesta, NEH: mano no expuesta, EA: brazo expuesto y NEA: brazo no expuesto.

**Conclusiones.** Nuestros datos sugieren que sujetos crónicamente expuestos a HC (aceites, lubricantes industriales) presentan cambios en la microbiota de la piel y un mayor metabolismo de HC en zonas de su cuerpo (mano) con mayor exposición a HC comparado con sujetos sin exposición crónica a derivados de petróleo.

**Agradecimiento.** Al CONACYT por la beca recibida con número 799364. Apoyos para Adquisición y Mantenimiento de Infraestructura en Instituciones y Laboratorios de Investigación Especializada CONACYT (ID: 300437).

### Bibliografía.

1. Leung, Y., *et al.* (2020), *Microbiomes*, 8.
2. Sowada, J., *et al.* (2017), *Arch Toxicol*, 91(6) 2331-2341
3. Gao, P., *et al.* (2018), *El* 119 466-477.
4. Bouslimani, A., *et al.* (2015), *PNAS*, 112(17) E2120-E2129.
5. Moreno-Ulloa, A., *et al.* (2020) *mSystems* 5(6).



## COMPARACIÓN CUANTITATIVA ENTRE ESTRATEGIAS DE REDUCCIÓN DE GENOMA Y PROTEOMA PARA LA REDIRECCIÓN DE RECURSOS CELULARES A FUNCIONES SINTÉTICAS

Elisa Márquez Zavala, José Utrilla Carreri. Centro de Ciencias Genómicas UNAM Departamento de Biología de Sistemas y Biología Sintética. Cuernavaca, 62210.

emarquez@lcg.unam.mx

*Palabras clave: minimización recursos proteoma*

**Introducción.** La creación de cepas de producción es complicada, ya que una célula es un sistema complejo, por lo que una célula simple facilitaría su comprensión e ingeniería. En un enfoque biotecnológico en el cual la célula está en un ambiente controlado, se pueden eliminar características que no le son útiles en esa condición, reduciendo la complejidad del sistema y el desvío de recursos celulares (1). En su mayoría, las minimizaciones que se han realizado se han enfocado en la reducción del genoma (1) sin considerar de manera precisa el cambio en la asignación de recursos. Utilizando el modelo de metabolismo y expresión iLE1678-ME (2), y datos experimentales, Lastiri-Pancardo et al. (3) fueron capaces de identificar 3 intervenciones que maximizaron el ahorro de recursos celulares que serían usados para expresar funciones no esenciales. La cepa resultante incrementó su producción de proteína recombinante en un 18% y liberó un 0.5% de su proteoma. Demostrando que la minimización de proteoma no esencial puede llevar a la redirección de recursos a proteínas recombinantes. Pero no hay una formalización sobre los costos de producción de proteínas y genes que nos permita hacer una comparación cuantitativa entre la reducción de genoma y proteoma para elegir la estrategia más efectiva. Este trabajo busca identificar una estrategia de minimización de la expresión de funciones de cobertura para generar diseños de intervenciones genéticas.

**Metodología.** Se utilizaron datos proteómicos de la literatura (4), así como datos de los genes eliminados en 9 cepas minimizadas por enfoque genómico (5) y 1 de enfoque proteómico (3) y se compararon los porcentajes liberados. También se utilizó el modelo iLE1678-ME para calcular costos de replicación, transcripción y producción de proteína. Por último, se utilizaron datos de aportación al fitness (6) para buscar los genes con mayor al proteoma sin provocar fenotipos negativos.

**Resultados.** Una mayor eliminación de genoma no garantiza una eliminación equivalente de proteoma (Figura 1). En general es más costosa en términos de ATP la producción de proteína que la replicación o la transcripción. El unir el enfoque de minimización de proteoma con datos de adecuación pueden permitirnos liberar una cantidad de proteoma comparable a otras cepas minimizadas que tienen mucho más genoma

eliminado, y esto con pocas mutaciones (Figura 2).

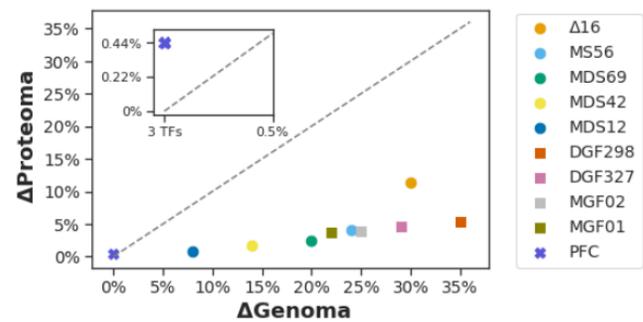


Fig. 1. Relación entre eliminación de genoma y proteoma

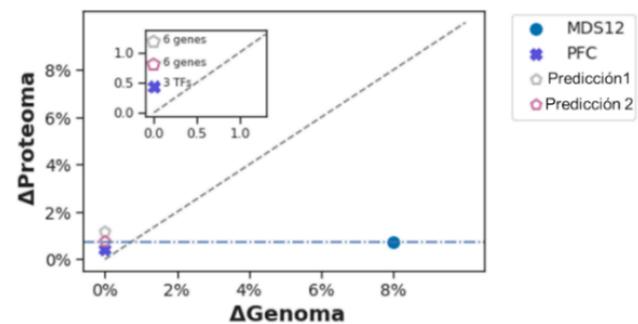


Fig. 2. Comparación de la predicción de liberación de proteoma entre cepas minimizadas y genes blanco obtenidos en este estudio.

**Conclusiones.** Eliminar más genoma no indica una eliminación equivalente de proteoma y puede comprometer la aptitud de la célula. Una reducción de proteoma es la más adecuada para liberar recursos ya que es la más costosa. El combinar la reducción de proteoma con datos de fitness nos puede permitir crear cepas de producción eficientes con pocas mutaciones.

**Agradecimiento.** Proyecto Newton advanced fellowship NA160328

### Bibliografía.

1. Colijn, C., Brandes, A., Zucker, J., Lun, D. S., Weiner, B., Farhat, M. R., ... & Galagan, J. E. (2009). PLoS Comput Biol. 5 (8): e1000489.
2. Bordbar, A., Monk, J. M., King, Z. A., & Palsson, B. O. (2014). Nature Reviews Genetics. 15(2): 107-120.
3. Lastiri-Pancardo, G., Mercado-Hernández, J. S., Kim, J., Jiménez, J. I., & Utrilla, J. (2020). Nature Chemical Biology. 16(9): 1026-1033.
4. Schmidt, A., Kochanowski, K., Vedelaar, S., Ahrné, E., Volkmer, B., Callipo, L., ... & Heinemann, M. (2016). Nature biotechnology. 34 (1): 104-110.
5. Kurokawa, M., & Ying, B. W. (2020). Microorganisms. 8 (1): 3.
6. Price, M. N., Wetmore, K. M., Waters, R. J., Callaghan, M., Ray, J., Liu, H., ... & Deutschbauer, A. M. (2018). Nature. 557(7706): 503-509.



## ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO EN RESPUESTA AL ESTRÉS COMBINADO POR RADIACIÓN UV-B Y FRÍO EN PIMIENTO MORRÓN (*CAPSICUM ANNUUM*).

Brandon Morales<sup>1</sup>, Claudia Villicaña<sup>2</sup>, Rubén León<sup>3</sup>, Luis Lighbourn<sup>3</sup>, José Basilio<sup>1</sup>, Josefina León<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Carretera a Eldorado Km 5.5, Campo el Diez. C.P. 80110. Culiacán, Sinaloa, México. Tel. +52 (667)4806950. <sup>2</sup>CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Carretera a Eldorado Km 5.5, Campo el Diez, C.P. 80110. Culiacán, Sinaloa, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Genética, Instituto de Investigación Lighbourn, A. C., Cd. Jiménez, Chihuahua, 33981, México. Correo: bmorales220@estudiantes.ciad.mx

*Palabras clave: Capsicum; estrés abiótico; transcriptómica.*

**Introducción.** El pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) está clasificado como una solanácea de importancia económica con alto valor nutricional. Sin embargo, su producción está limitada por factores abióticos como la baja temperatura y la radiación UV-B, que pueden causar grandes daños a los cultivos. Las plantas pueden responder a los factores ambientales estresantes induciendo varios cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. La técnica RNA-Seq se aplica ampliamente para estudiar la expresión génica global en numerosos procesos relacionados con la biología vegetal, incluidas las respuestas inducidas por el estrés abiótico, proporcionando información relevante sobre los genes y las vías que participan en las respuestas inducidas por el estrés.

En este estudio, se analizó la expresión génica diferencial de tallos de plantas de *C. annuum* expuestas al estrés combinado por radiación UV-B y frío, por 1, 3 y 25 h, para obtener conocimientos sobre la dinámica temporal de los genes y vías moduladas por estos factores.

**Metodología.** Semillas de pimiento morrón comercial cv. Canon (Zeraim Gedera Syngenta; Israel) se germinaron y se mantuvieron como fue descrito previamente (1). Se recolectaron los tallos, y se aisló el ARN total de 50-100 mg de tejido usando el reactivo Trizol (Ambion, Life Technologies, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se prepararon bibliotecas de ADNc de 150 lecturas de extremos emparejados en el sistema de bibliotecas Illumina TruSeq. Posteriormente, las bibliotecas se secuenciaron en la plataforma Illumina NextSeq-500 de acuerdo con el proveedor de servicios de secuenciación (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, (LANGEBIO) Unidad CINVSTAV- IPN, Irapuato, Guanajuato, México. Para el análisis bioinformático se utilizaron los programas FastQC, Hisat2, Htseq-count y Deseq2 (2). El enriquecimiento de la ontología genética (OG) se realizó en UNIPROTKB y AgriGO. También realizamos el enriquecimiento de las vías en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG).

**Resultados.** En el tratamiento combinado de UV-B y frío a 1, 3 y 25 h, se identificaron 281, 280 y 326 genes expresados diferencialmente (GED), de los cuales 154, 167 y 138 estaban regulados positivamente y 127, 113 y

188, regulados negativamente; respectivamente. Para el tratamiento combinado de UV-B y frío después de 1 h de exposición, el análisis de enriquecimiento de OG mostró que la actividad hidrolasa y la respuesta al estrés fueron estadísticamente significativas. Para el tratamiento de 3 h, cuatro categorías fueron estadísticamente significativas: respuesta al estímulo abiótico, respuesta al estrés, proceso metabólico de carbohidratos y proceso biosintético. Para el tratamiento a las 25 h, tres categorías fueron estadísticamente significativas: actividad hidrolasa, respuesta al estrés y proceso metabólico de carbohidratos. Con respecto al papel relevante de UV-B y frío en la modulación del metabolismo revelado por el enriquecimiento de la OG, se analizó los GED utilizando el mapa de enriquecimiento de KEGG. El análisis mostró que los GED pertenecientes al ritmo circadiano-planta y la biosíntesis de flavonoides fueron los más enriquecidos para genes regulados positivamente en 1, 3 y 25 h. Mientras que para los genes regulados negativamente ninguna vía fue significativa a 1 h, para 3 h se observó que solo la vía de señalización MAPK fue estadísticamente significativa. Y en 25h, sólo la biosíntesis de sesquiterpenoides y triterpenoides fueron estadísticamente significativas.

**Conclusiones.** Se observó que en respuesta al estrés combinado por frío y radiación UV-B en *C. annuum*, genes asociados a flavonoides y al ritmo circadiano se mantienen sobre expresados durante todos los tiempos de exposición. Por lo que se considera que tienen un papel importante en la respuesta al estrés.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue apoyado por FOSEC SEP- INVESTIGACIÓN BÁSICA, Proyecto No. A1-S-8466. Cátedras CONACYT: Proyecto No. 784. Lighbourn Research. Convenio: 589683, Proyecto: Análisis Transcripcional de Pimiento Morrón (*Capsicum annuum* L.) bajo estrés abiótico. Los autores agradecen a Q.F.B. Jesús Héctor Carrillo Yáñez por asistencia técnica crítica.

### Bibliografía.

1. León-Chan R.G., López-Meyer M., Osuna-Enciso T., Sañudo-Barajas J., Heredia J. & León-Félix J. (2017). *Environ Exp Bot.*, 139(1): 143-151
2. Li J. & Liu X. (2019). *PeerJ.* 7:e6832.



## MODELO METABÓLICO A ESCALA GENÓMICA DE *Acinetobacter schindleri* ACE

Mitsuo Nakakawa<sup>b</sup>, Adrián Jiménez<sup>c</sup>, Juan Carlos Sigala<sup>a</sup>, Roberto Olivares Hernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de Mexico, 05348, México

<sup>b</sup> Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa

<sup>c</sup> Licenciatura en Ingeniería Biológica, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa

*Palabras clave:* *Acinetobacter schindleri* ACE, modelo metabólico, catabolismo de acetato.

**Introducción.** Las especies de *Acinetobacter* tienen la capacidad de degradar compuestos aromáticos y de crecer eficientemente con fuentes de carbono gluconeogénicas como el acetato. Estas características en especies no patógenas las hacen atractivas para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, como la detoxificación de hidrolizados de biomasa vegetal. En particular, la cepa *Acinetobacter schindleri* ACE ha sido aislada y cultivada en laboratorio reportando tasas muy altas de crecimiento,  $0.93 \text{ h}^{-1}$  (1, 2). Con la finalidad de poder evaluar el metabolismo gluconeogénico de esta bacteria, en este trabajo se presenta un modelo metabólico a escala genómica (MMEG) y las predicciones de la distribución de flujo bajo ciertas condiciones de interés.

**Metodología.** Se empleó la secuencia genómica de *Acinetobacter schindleri* ACE depositada en NCBI (GenBank: CP015615.1) para llevar a cabo la reconstrucción de la red metabólica (1). Por medio de la herramienta Carveme (3) se obtuvo un borrador del modelo de manera automática, utilizando como plantilla un modelo universal. Posteriormente, el borrador fue refinado de manera manual calculando las distribuciones de flujos por medio de FBA (flux balance analysis) (4) llenando los vacíos de la red metabólica hasta lograr predicciones consistentes de las tasas de crecimiento experimentales.

**Resultados.** El modelo metabólico a escala de genómica de *A. schindleri* ACE (iMN845) se compone de 1870 reacciones, 1267 metabolitos y 845 GPR (gen-proteína-reacción).

Organismo	Modelo	Año
<i>A. schindleri</i> ACE	iMN845	2021
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	iY2897	2019
<i>A. baumannii</i> AYE	iCN718	2018
<i>A. baylyi</i> ADP1	iMD787	2008

Tabla 1. Modelos metabólicos a escala genómica reportados para las especies de *Acinetobacter*.

De las reacciones que se incluyen en el modelo se puede observar la presencia de las reacciones del catabolismo de acetato. Para evaluar la distribución de flujos por medio de FBA se ocuparon datos de consumo de acetato reportados (2). Utilizando como función objetivo la tasa

de crecimiento se evaluaron las predicciones de crecimiento, los balances de materia de los flujos extracelulares y la distribución de flujo principalmente en las reacciones del metabolismo central de carbono.

Inicialmente las predicciones de flujo estaban por encima de  $1 \text{ h}^{-1}$  y el modelo predecía la producción de glicolato. Al revisar en detalle el catabolismo del glicolato, el modelo tiene anotada dos glicolato deshidrogenasas, una que depende de NAD (GLYCLTDx) y otra de NADP (GLYCLTDy). Ambas reacciones involucran al glioxilato como metabolito, el cual puede ser transformado a (S)-Malato por la malato sintasa (1). Se determinó que los flujos del glicolato repercuten en el ciclo TCA y del glioxalato, lo que puede explicar por qué la tasa de crecimiento es sensible al metabolismo de glicolato en el modelo (Fig. 1).

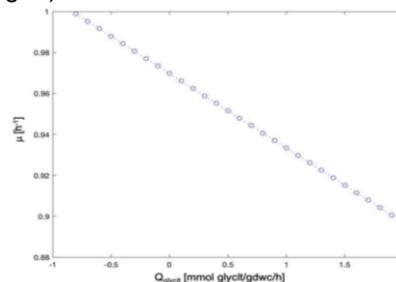


Fig. 1. Flujo de glicolato contra tasa de crecimiento del MMEG de *Acinetobacter schindleri* ACE.

**Conclusiones.** En este trabajo se presenta el primer modelo metabólico a escala genómica de *Acinetobacter schindleri* ACE el cual tiene la capacidad de predecir la alta tasa de crecimiento que se reporta experimentalmente. Esta capacidad predictiva está relacionada a un flujo de glicolato, lo cual es novedoso para el metabolismo gluconeogénico bacteriano, y apunta al diseño experimental para evaluar esta relación.

**Agradecimiento.** Se agradece a CONACYT por el financiamiento a través del proyecto A1-S-30750, y a la UAM por el apoyo de infraestructura.

- Bibliografía.** Sigala, J. C., Suárez, B. P., Lara, A. R., Le Borgne, S., Bustos, P., Santamaría, R. I., & Martínez, A. (2017). *Microbiology*, 163(7), 1052-1064.
- Sigala, J. C., Quiroz, L., Arteaga, E., Olivares, R., Lara, A. R., & Martínez, A. (2019). *FEMS microbiology letters*, 366(12)
  - Machado, D., Andrejev, S., Tramontano, M., & Patil, K. R. (2018). *Nucleic acids research*, 46(15), 7542-7553.
  - Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). *Nature biotechnology*, 28(3), 245-248.



## EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DE PRODUCCIÓN DE GLUCÓGENO EN *Leucoagaricus gongylophorus* LEU18496

Gabriela Cejas Añón<sup>1</sup>, Sergio Hernández Jiménez<sup>2</sup>, Roberto Olivares-Hernández<sup>2</sup>, Gabriel Viguera Ramírez<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, CDMX

<sup>2</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa, CDMX, 05348, México.

[jviguera@cua.uam.mx](mailto:jviguera@cua.uam.mx)

**Palabras clave:** *Leucoagaricus gongylophorus*, rendimientos, análisis de modo elemental.

**Introducción.** El hongo *Leucoagaricus gongylophorus* vive en una asociación mutualista con la hormiga *Atta mexicana* (1), donde la hormiga transporta materia vegetal al nido para cultivar el hongo. El hongo utiliza estos polímeros vegetales para liberar azúcares, de los cuales, una fracción es aprovechada por el mismo hongo para satisfacer sus requerimientos energéticos, y otra fracción es almacenada en forma de glucógeno dentro de estructuras globulares conocidas como gongliodias, las cuales constituyen alimento para las hormigas (2). Para estudiar las capacidades de producción de glucógeno se puede utilizar herramientas computacionales como el análisis de modos de flujo elemental (3). Este trabajo se enfocó en la construcción de una red metabólica del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* LEU18496 y en calcular los estados de la red en donde el rendimiento de producción de glucógeno es el mayor a partir de distintas fuentes de carbono.

**Metodología.** Para realizar la construcción de la red metabólica del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos de las enzimas que catalizan las reacciones que eran de nuestro interés. A las secuencias de aminoácidos de estas enzimas se le realizó un alineamiento de secuencias proteína-proteína utilizando la herramienta BLASTp con las tres anotaciones que existen en NCBI para el género *Leucoagaricus* sp. El análisis de modos elementales fue implementado utilizando la herramienta METATOOL (4).

**Resultados.** A partir de los resultados obtenidos en el alineamiento de secuencias fue posible la construcción de una red metabólica del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus*. La red consiste en 58 reacciones con las cuales se pudo llevar a cabo el análisis de modos elementales. Estas reacciones involucran la degradación de los sustratos pectina, xilano y celulosa y la vía de síntesis de glucógeno, tal cual se muestra en la Fig.1. Se apreció que este hongo es capaz de sintetizar glucógeno utilizando la vía de síntesis propuesta en esta red metabólica y replicando lo que se ha observado para otros *Leucoagaricus* sp. Como resultado del análisis computacional se obtuvieron 273 modos elementales, de los cuales 107 estuvieron involucrados en la síntesis de glucógeno a partir de los sustratos modelos utilizados. La xilosa fue el sustrato más utilizado para la síntesis de glucógeno en este análisis.

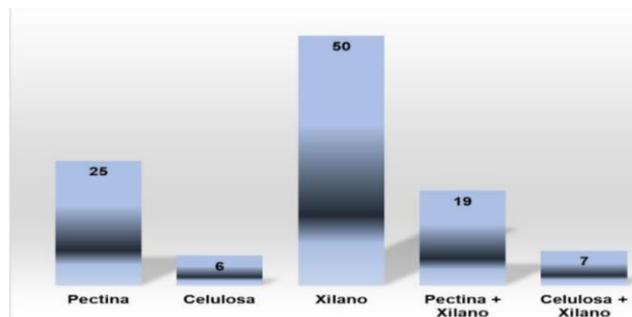


Fig. 1. Distribución de modos de los sustratos utilizados obtenidos a partir del análisis de modo elemental

Tabla 1. Modos elementales obtenidos con mayor rendimiento para cada sustrato.

Modo elemental número	Sustratos	Y (mol glucógeno/mol sustrato)
93	Pectina	0.5
165	Celulosa	0.5
14	Xilano	2.0
210	Xilano + Pectina	0.4
54	Xilano + Celulosa	0.3

**Conclusiones.** Se logró anotar una red metabólica del metabolismo central del carbono de *L. gongylophorus* para el análisis de la síntesis de glucógeno, por medio del análisis de modos elementales. El resultado muestra 273 modos elementales, de los cuales 107 estuvieron involucrados en la síntesis de glucógeno y el rendimiento teórico Glucógeno Sustrato fue mayor utilizando Xilosa como fuente de carbono. A partir de estos resultados se desea hacer la evaluación experimental.

**Agradecimiento.** Se agradece a CONACYT por la beca de posgrado otorgada a Gabriela Cejas; a SEP-CONACYT por el financiamiento otorgado al proyecto No. 287615; y a la UAM.

### Bibliografía.

- (1) Maya-Yescas M, et al. (2021). *Biotechnology Letters*, 43(4), 845- 854.
- (2) Viguera G, et al. (2017). *Letters in Applied Microbiology*. 65(2),173- 181.
- (3) Trinh, C. T., & Thompson, R. A. (2012). *Reprogramming microbial metabolic pathways*, 21-42.
- (4) Kamp, A. V., & Schuster, S. (2006). *Bioinformatics*, 22(15), 1930-1931.



## ENSAMBLE, ANOTACIÓN, Y CONSTRUCCIÓN DEL MODELO METABÓLICO A ESCALA GENÓMICA DEL HONGO *Leucoagaricus gongylophorus* LEU18496 SIMBIOTE DE LA HORMIGA *Atta mexicana*

Freddy Castillo-Alonso<sup>1</sup>, Mitsuo José Enrique Nakakawa Montes de Oca<sup>1</sup>, Juan Carlos Sigala Alanís<sup>2</sup>, Gabriel Viguera Ramírez<sup>2</sup>, Roberto Olivares-Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, CDMX, México.

<sup>2</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa, CDMX, 05348, México.

[rolivares@correo.cua.uam.mx](mailto:rolivares@correo.cua.uam.mx)

*Palabras clave:* ensamble genómico, modelo metabólico a escala genómica, *Leucoagaricus gongylophorus*, LEU18496

**Introducción.** En la UAM-Cuajimalpa se identificó y aisló el hongo endémico *L. gongylophorus* LEU18496, simbiote de *Atta mexicana*. Este hongo es capaz de crecer sobre sustratos lignocelulósicos, produciendo enzimas con actividad lignocelulolítica y almacenando glucógeno (1). Por este motivo, se tiene interés en su aplicación como medio biológico para la hidrólisis de residuos de biomasa vegetal y poder utilizarla como materia prima en bioprocesos. Para conocer mejor las capacidades de este hongo para producir enzimas con actividad lacasa, celulasa y endoglucanasa, y almacenar glucógeno, se propone el desarrollo de un modelo metabólico a escala genómica (MMEG). El primer paso en la construcción del MMEG es la secuenciación y anotación del genoma; una vez identificadas las secuencias de proteínas codificadas se lleva a cabo la construcción de un primer borrador del modelo utilizando, en este caso, las herramientas Carveme y Aureme para su posterior validación (3).

**Metodología.** El ensamble genómico se realizó a partir de datos de secuenciación obtenidos mediante las plataformas Illumina HiSeq y Roche 454 utilizando SPAdes version 3.9.0. La predicción de genes se realizó utilizando la herramienta Augustus, utilizando conjuntos de genes reportados para *L. gongylophorus*, simbiote de la hormiga *A. cephalotes* (4). La anotación funcional de los genes se realizó utilizando la plataforma Blast2Go. A partir de las secuencias de proteínas obtenidas se realizaron alineamientos mediante BLASTp con secuencias proteicas reportadas para: *Aspergillus niger*, *Trametes sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Leucoagaricus sp.*, *Neurospora crassa*, *Ustilago maydis*, *Fusarium sp.* y *Trichoderma reesei*. Los dominios funcionales se obtuvieron de la base de datos INTERPRO y la asignación de funciones metabólicas mediante la base de datos KEEG.

**Resultados.** En este trabajo se presenta la anotación funcional del genoma de *L. gongylophorus* LEU18496 a partir de la secuenciación del genoma como primer paso para la construcción el MMEG. Al ensamblar los datos obtenidos por las dos plataformas de secuenciación fue posible incrementar el número de

genes comparado con los reportados para *L. gongylophorus* Ac12 (2).

En la Tabla 1 se presentan los resultados correspondientes a los ensambles genómicos:

**Tabla 1.** Características de los ensambles genómicos de *L. gongylophorus* LEU18496.

	Ensamble Illumina	Ensamble Híbrido (Illumina+ Roche 454)	Ensamble (Aylward et al., 2013)
Contigs	66552	93115	83777
18	7995	4632	1828
Contenido GC	40%	36%	31.5%
Bases totales	156,508,786	156,651,217	100,245,223
Genes	7534	8088	-----

A partir de los dominios encontrados en INTERPRO y KEEG fue posible asignar función a 6408 secuencias y asignar 1653 números EC (Enzyme Commission number).

**Conclusiones.** En este trabajo se secuenció y anotó el genoma de *L. gongylophorus* LEU18496. Se logró identificar 6408 secuencias de genes, de los cuales se pudieron asignar 1653 números EC. Esta información sirve para obtener el borrador del MMEG utilizando las herramientas Aureme y Carveme. Una vez obtenido el borrador se puede comenzar a validar la capacidad de simulación de la producción de glucógeno y de las enzimas, así como identificar condiciones de máxima productividad.

**Agradecimientos.** Se agradece a CONACYT por la beca de posgrado para Freddy Castillo y el financiamiento a través del proyecto A1-S-30750. A la UAM-Cuajimalpa por el apoyo para presentar este trabajo.

### Bibliografía.

- Viguera, G., Paredes-Hernández, D., Revah, S., Valenzuela, J., Olivares-Hernández, R., & Le Borgne, S. (2017). *Letters in applied microbiology*, 65(2), 173-181.
- Aylward, F. O., Burnum-Johnson, K. E., Tringe, S. G., Telling, C., Tremmel, D. M., Moeller, J. A. & Currie, C. R. (2013). *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3770-3778.
- Aite, M., Chevallier, M., Frioux, C., Trottier, C., Got, J., Cortés, M. P. & Siegel, A. (2018). *PLoS computational biology*, 14(5), e1006146.
- Stanke, M., & Morgenstern, B. (2005). *Nucleic acids research*, 33(suppl\_2), W465-W467.