



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Estudio de la función de la MAPK codificada por el gen Pc13g11680 de *Penicillium chrysogenum* y su relación con la vía de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas.”

TESIS

QUE PRESENTA

Q.A. HÉCTOR CHÁVEZ VELAZCO

MATRICULA 2202800531

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DIRECTOR:
DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO**

**Asesores:
Dr. Ulises Carrasco Navarro
Dr. Jesús Eduardo Zúñiga León**

**JURADOS: DR FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO
DR JESÚS EDUARDO ZÚÑIGA LEÓN
DRA. DULCE MARÍA ANDRADE PAVÓN
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO**

Iztapalapa, Ciudad de México, 28 de octubre de 2022

hectorchavezvelazco@hotmail.com

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Ciudad de México a 28 de octubre del 2022.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

"Estudio de la función de la MAPK codificada por el gen Pc13g11680 de *Penicillium chrysogenum* y su relación con la vía de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas."

que presentó

Q.A. Héctor Chávez Velazco

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Ulises Carrasco Navarro

Asesor: Dr. Jesús Eduardo León Zúñiga

Jurado:

Presidente: Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Jesús Eduardo Zúñiga León

Vocal: Dulce María Andrade Pavón

Vocal: Ulises Carrasco Navarro



Agradecimientos

Al Dr Francisco Fierro Fierro por aceptarme en su equipo de trabajo a pesar de mi solicitud tardía, por la experiencia tan grata de trabajar con usted.

Al Dr Ulises Carrasco Navarro. al Dr Jesús Eduardo Zúñiga León y la Dra Wylma Dolores Pérez Pérez, por sus consejos, asesorías y ayuda en la realización de este proyecto.

Al Dr Francisco José Fernández Perrino y la Dra Dulce María Andrade Pavón, por revisar este trabajo con celeridad.

A los compañeros de laboratorio Months, Minifer, Gerry, Reja, Vane, Fer, Yare y Chuerk, por su compañerismo, sus consejos y su amistad.

A mi hermana, por recorrer otro pedazo de la vida conmigo.

A mi familia, que siempre está conmigo.

A la UAM, por abrirme sus puertas.

Al pueblo de México.

RESUMEN

Una característica fundamental de los organismos es su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, para lo cual utilizan vías de señalización que permiten responder de manera adecuada a su entorno. Muchas señales son transmitidas por módulos conservados de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). La parte central de esta vía se encuentra representada por tres MAPKs (MAPKKK, MAPKK, MAPK), que se fosforilan de manera consecutiva hasta la MAPK y que desembocan en la activación o represión transcripcional de diversos genes. Existe un grupo denominado SAPK que son MAPK activadas bajo diversas condiciones de estrés, por ejemplo, las mutantes *Hog1* (una MAPK) de *Saccharomyces cerevisiae* son sensibles a una alta osmolaridad mientras que las mutantes *spc1* de *Schizosaccharomyces pombe* son sensibles a alta osmolaridad, choque térmico y estrés oxidante.

El objetivo del presente trabajo fue comprobar el papel que juega la MAPK codificada por el gen Pc13g11680 (que aquí llamamos PcHog) en transformantes silenciadas mediante RNAi de *P. chrysogenum* bajo tratamientos de estrés. Nuestros hallazgos indican que las transformantes RNAi son susceptibles a estrés. En condiciones hiperosmóticas se encontró que concentraciones crecientes de sorbitol provocan una menor extensión del micelio y falta de conidiación, mientras que en los conidios no se observó una disminución (no estadísticamente significativa) en las unidades formadoras de colonia (UFC), pero con daños al germinar y un tamaño más pequeño que los de la cepa silvestre bajo tratamiento. Las condiciones oxidantes resultaron ser más letales, se observó un retraso en la aparición del micelio conforme se aumentó la concentración de H₂O₂ y la ausencia de coloración verde.

También se estudió en qué grado se ve afectada la producción de penicilina, encontrándose que mientras en la cepa parental disminuye la biosíntesis del metabolito en las últimas etapas del ensayo, las transformantes continúan con la

producción. Finalmente, para conocer si la PcHog tiene conectividad con la vía de señalización mediada por la subunidad G α Pga1, se realizó un análisis mediante western blot. Esto permitió encontrar una mayor expresión de la proteína PcHog en una cepa con el gen *pga1* delecionado (Δ ga1), por lo que la conexión es evidente. Tas realizar un estudio de interactómica *in silico* se encontró, además, un alto grado de conectividad de PcHog con múltiples procesos celulares.

ABSTRACT

A fundamental characteristic of organisms is their ability to adapt to different environmental conditions, for which they use signaling pathways that allow them to respond appropriately to their environment. Many signals are transmitted by conserved modules of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). The central part of this pathway is represented by three MAPKs (MAPKKK, MAPKK, MAPK), which are consecutively phosphorylated to MAPK and lead to the transcriptional activation or repression of various genes. There is a group called SAPK that are MAPKs activated under various stress conditions, for example, the Hog1 mutants (a MAPK) of *Saccharomyces cerevisiae* are sensitive to high osmolarity while the *spc1* mutants of *Schizosaccharomyces pombe* are sensitive to high osmolarity, heat shock and oxidative stress.

The objective of this work was to verify the role played by MAPK encoded by the Pc13g11680 gene (named here PcHog) in RNAi-silenced transformants of *P. chrysogenum* under stress treatments. Our findings indicate that RNAi transformants are susceptible to stress. In hyperosmotic conditions, it was found that increasing concentrations of sorbitol cause a smaller extension of the mycelium and lack of conidiation, while in the conidia a decrease (not statistically significant) in the colony-forming units (CFU) was not observed, but with damage to the conidia. germinate and a smaller size than those of the wild strain under treatment. The oxidizing conditions turned out to be more lethal, a delay in the appearance of the mycelium was observed as the concentration of H₂O₂ increased and the absence of green coloration.

The degree to which penicillin production is affected was also studied, finding that while in the parental strain the biosynthesis of the metabolite decreases in the last stages of the assay, the transformants continue with production. Finally, to determine if PcHog has connectivity with the signaling pathway mediated by the G α Pga1 subunit, a western blot analysis was performed. This allowed us to find a

higher expression of the Pchog protein in a strain with the pga1 gene deleted (Δ ga1), so the connection is evident. After performing an in silico interactomic study, a high degree of connectivity of Pchog with multiple cellular processes was also found.

Contenido

1. Introducción	16
2. Antecedentes	17
2.1 Hongos filamentosos.....	17
2.2 <i>Penicillium chrysogenum</i>	17
2.3 Antibióticos β -lactámicos.....	20
2.4 Producción de penicilina.....	22
2.4.1. Represión de la biosíntesis de penicilina por fuente de carbono.....	25
2.4.2. Producción de penicilina en función del pH.....	26
2.4.3. Represión en la biosíntesis de penicilina por nitrógeno.....	26
2.4.5. Efecto del regulador global LaeA en la biosíntesis de penicilina.....	26
2.5 Transducción de señales intracelulares	27
2.6 Proteínas heterotriméricas.....	28
2.7 Proteín cinasas activadas por mitógenos.....	29
2.8 Silenciamiento mediante RNAi	31
2.9 Estrés oxidante	33
2.10 Estrés osmótico.....	35
2.11 Vía HOG - MAPK y hongos filamentosos.....	37
2.12 Bioinformática.....	39
2.13 Interactóma	40
2.14 Ontología genética.....	40
2.15 Western blot.....	41
3. Justificación.....	42
4. Hipótesis	43
5. Objetivos	44
5.1 Objetivo general.....	44
5.2 Objetivos particulares	44
6. Materiales y métodos.....	45
6.1 Microorganismos.....	45
6.2 Interactoma <i>in silico</i>	45

6.3 Obtención de esporas	46
6.4 Obtención de biomasa	47
6.5 Extracción de proteína	47
6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	48
6.7 Cuantificación de proteína	48
6.8 Western blot	49
6.9 Producción de penicilina	50
6.10 Estrés osmótico	51
6.10.1 Micelio	51
6.10.2 Conidios	52
6.11 Estrés oxidante	52
6.11.1 Micelio	52
6.11.2 Conidios	53
6.12 Silenciamiento del gen <i>Pc13g11680</i>	53
6.12.1. Plásmido empleado para el silenciamiento	53
6.13.2. Extracción de ADN de <i>P. chrysogenum</i>	54
6.13.3. PCR para la obtención del fragmento del gen <i>Pc13g11680 (PcHog)</i>	54
6.13.4. Digestión con <i>NcoI</i>	55
6.13.5. Ligación del plásmido con el fragmento del gen <i>Pc13g11680</i>	55
6.13.6. Transformación en <i>E. coli</i>	55
6.13.7. Extracción de ADN plasmídico	56
6.13.8. Extracción de ADN plasmídico	56
6.13.9. Obtención de protoplastos de <i>P. chrysogenum</i>	57
6.13.10. Transformación de <i>P. chrysogenum</i>	57
6.13.11. Confirmación de transformantes de <i>P. chrysogenum</i>	58
7. Resultados y discusión	59
7.1 Confirmación de transformantes	59
7.2 Interactoma <i>in silico</i>	60
7.3 Estrés osmótico	63

7.4 Estrés oxidante	70
7.5 Producción de penicilina	77
7.6 Western blot	80
8. Conclusiones	84
9. Perspectivas	85
Bibliografía	86

Lista de figuras

Figura 1. Secuenciación del genoma de <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255.....	19
Figura 2. Estructura química de los β -lactámicos.....	21
Figura 3. Mecanismo de acción de los antibióticos en organismos Gram negativos.	22
Figura 4. Clúster de biosíntesis de penicilina en hongos filamentosos.	23
Figura 5. Ruta de biosíntesis de penicilina.	25
Figura 6. Ciclo de las proteínas G heterotriméricas.	29
Figura 7. Esquema general de una vía MAPK.	31
Figura 8. Vía de silenciamiento mediante RNAi.....	33
Figura 9. Activación de la ruta MAPK Sty1 por estrés oxidante.....	35
Figura 10. Vía de activación de la MAPK HOG1 de levadura.....	37
Figura 11. Vía de activación de SakA y MpkC (ambas ortólogos de Hog1) de <i>Aspergillus</i>	38
Figura 12. Plásmido pGpdPki-RNAi.	54
Figura 13. Comprobación de transformantes.....	59
Figura 14. Interactoma in silico utilizando la base de datos STRING.	60
Figura 15. Proceso biológico en el que participan proteínas que interactúan con PcHog.....	61
Figura 16. Función molecular de las proteínas que interactúan con PcHog.	62
Figura 17. Componente celular donde se localizan las proteínas que interactúan con PcHog.....	63
Figura 18. 0 M sorbitol (24 h).....	64
Figura 19. 0.4M sorbitol (24 h)	64
Figura 20. 2M sorbitol (24h).....	64
Figura 21. 0.8M sorbitol (24 h)	64
Figura 22. 0 M sorbitol (48 h).....	65
Figura 23. 0.4 M sorbitol (48 h)	65
Figura 24. 2 M sorbitol (48 h).....	65
Figura 25. 0.8 M sorbitol (48 h)	65
Figura 26. 0 M sorbitol (72 h).....	66
Figura 27. 0.4 M sorbitol (72 h)	66
Figura 28. 2 M sorbitol (72 h).....	66
Figura 29. 0.8 M sorbitol (72 h)	66
Figura 30. 0 M sorbitol (96 h).....	67
Figura 31. 0.4 M sorbitol (96 h)	67
Figura 32. 2 M sorbitol (96 h).....	67
Figura 33. 0.8 M sorbitol (96 h)	67
Figura 34. 0 M sorbitol (120 h)	68
Figura 35. 0.4 M sorbitol (120 h).....	68

Figura 36. 2 M sorbitol (120 h)	68
Figura 37. 0.8 M sorbitol (120 h)	68
Figura 38. Prueba de estrés osmótico sobre conidios empleando tres diferentes concentraciones de sorbitol.....	69
Figura 39. prueba de estrés osmótico y oxidante sobre conidios (72 h).....	70
Figura 40. 0 mM H ₂ O ₂ (24 h).....	71
Figura 41. 100 mM H ₂ O ₂ (24 h)	71
Figura 42. 200 mM H ₂ O ₂ (24h).....	71
Figura 43. 150 mM H ₂ O ₂ (24 h)	71
Figura 44. 0 mM H ₂ O ₂ (48 h).....	72
Figura 45. 100 mM H ₂ O ₂ (48 h)	72
Figura 46. 150 mM H ₂ O ₂ (48 h)	72
Figura 47. 200 mM H ₂ O ₂ (48 h)	72
Figura 48. 0 mM H ₂ O ₂ (72 h).....	73
Figura 49. 100 mM H ₂ O ₂ (72 h)	73
Figura 50. 150 mM H ₂ O ₂ (72 h)	73
Figura 51. 200 mM H ₂ O ₂ (72 h)	73
Figura 52. 0 mM H ₂ O ₂ (96 h).....	74
Figura 53. 100 mM H ₂ O ₂ (96 h)	74
Figura 54. 150 mM H ₂ O ₂ (96 h)	74
Figura 55. 200 mM H ₂ O ₂ (96 h)	74
Figura 56. 0 mM H ₂ O ₂ (120 h).....	75
Figura 57. 100 mM H ₂ O ₂ (120 h).....	75
Figura 58. 150 mM H ₂ O ₂ (120 h).....	75
Figura 59. 200 mM H ₂ O ₂ (120 h).....	75
Figura 60. Prueba de estrés oxidante sobre conidios.....	76
Figura 61. Variación de pH de las diferentes cepas.....	78
Figura 62. Producción de biomasa (peso seco) de las diferentes cepas.	79
Figura 63. Producción de penicilina en peso seco.	80
Figura 64. SDS – PAGE 150 µg.....	81
Figura 65. Análisis de Western Blot.....	82

Lista de tablas

Tabla 1. Cepas empleadas durante los ensayos	45
Tabla 2. Composición del medio Power	46
Tabla 3. Composición del medio PMMY	47
Tabla 4. Composición de buffer de transferencia y solución TBST	49
Tabla 5. Composición del medio MCIP	50
Tabla 6. Composición del medio MCFP	50
Tabla 7. Composición del medio TSB	51
Tabla 8. Oligos diseñados para amplificar el fragmento del gen clonado en el plásmido pGpdPki-RNAi	55
Tabla 9. Composición del medio Luria-Bertani (LB)	56
Tabla 10. Composición de STET	56
Tabla 11. Composición de amortiguadores	57
Tabla 12. Oligos empleados para la confirmación de transformantes	58

Abreviaturas

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

BSA: albúmina bovina sérica

CSI: mejora de cepas clásicas

DTT: ditioneitol

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

SDS PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TBST: amortiguador tris salina + tween 20

TCA: ácido tricloroacético

1. Introducción

Los hongos filamentosos son de los organismos más abundantes en la biosfera y, además, impactan fuertemente a las actividades del ser humano, ya sea de forma negativa como patógeno o de manera positiva en diversas aplicaciones farmacéuticas, industriales, alimentarias o agrícolas, entre otras (**García-Rico & Fierro, 2017**).

Un ejemplo de ello es la producción industrial de antibióticos β lactámicos por *P. chrysogenum*, resultado de la mejora de cepas microbianas tras años de numerosas rondas de mutagénesis y selección. El análisis bioquímico y genético de esas cepas industriales ha llevado a identificar mutaciones importantes en ellas, aunque todavía queda por dilucidar gran parte de la base molecular que permita mejorar la productividad de forma dirigida (**Van Den Berg et al., 2008**).

En un trabajo previo a este, se realizó la construcción del plásmido de silenciamiento pGdpki-RNAi/*PcHog*, usado para transformar protoplastos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y obtener transformantes que se seleccionaron por su resistencia al antibiótico fleomicina.

El objetivo del presente trabajo fue identificar la función o funciones que lleva a cabo la MAPK (*PcHog*) (ortólogo de p38, Hog1 y Sty1) de *P. chrysogenum* tras analizar las características fenotípicas de los citados transformantes, silenciados para el gen Pc13g11680. Además, se elaboró un interactoma *in silico* para poder visualizar con mayor claridad las actividades en las que participa dicha proteína.

2. Antecedentes

2.1 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son típicamente organismos saprofitos (**EI-Enshasy, 2007**), habitan prácticamente todos los ambientes marinos y terrestres gracias a su capacidad de secreción de sustancias, lo que les permite la obtención de nutrientes y una serie de funciones especializadas. Son precisamente esas secreciones ricas en productos químicos, farmacéuticos y enzimáticos las que han provocado su utilización durante más de un siglo (**Cairns et al., 2021**). Como ejemplo, durante los últimos 70 años, el hongo filamentoso *P. chrysogenum* (ahora conocido como *P. rubens*), ha sido utilizado como productor por excelencia del antibiótico β -lactámico penicilina (**Wu et al., 2020**).

Las aplicaciones de los hongos filamentosos van más allá del aislamiento y uso de enzimas o metabolitos secundarios, ya que la producción de textiles, materiales de construcción y biosensores para enfermedades son algunos de sus otros múltiples usos (**Füting et al., 2021**). Algunos hongos filamentosos pueden actuar como patógenos en individuos inmunodeficientes (**Novohradská et al., 2017**) y también pueden ser productores de metabolitos secundarios dañinos, como las micotoxinas (**Issa & Tahergorabi, 2019**). El trabajo con hongos filamentosos está lejos de terminar, pues las secuencias del genoma de estos organismos ha revelado el potencial para producir más compuestos de los que actualmente se obtienen en el laboratorio, lo que ha llevado a desarrollar métodos que permitan la expresión de genes que se encuentran silenciados (**Nützmann et al., 2012**).

2.2 *Penicillium chrysogenum*

Fue en el año 1928 cuando Alexander Fleming observó actividad antimicrobiana provocada por un moho que contaminó accidentalmente cultivos en placa de Petri de *Staphylococcus sp.* Fleming identificó a este moho como *Penicillium rubrum*,

sin embargo cuatro años más tarde fue reclasificado como *Penicillium notatum*, y al compuesto inhibidor se le nombró penicilina. Aunque Fleming no amplió su trabajo al estudio clínico en humanos por los rendimientos tan bajos obtenidos (2 µg/mL) y estabilidad, años más tarde gracias a un esfuerzo realizado por universidades y laboratorios industriales de Inglaterra y Estados Unidos, los ensayos clínicos en heridos de guerra fueron posibles, por lo que en 1946 la penicilina en el mercado ya era un hecho (**Barreiro et al., 2012**).

La alta demanda del antibiótico derivada de la segunda guerra mundial. y los bajos títulos obtenidos del mismo fueron el detonante para que se iniciara el programa de mejora de cepas clásicas (CSI). Todo comenzó con el aislamiento de la cepa *P. chrysogenum* NRRL 1951, la cual fue sometida a selección de esporas, rayos X, radiación ultravioleta, selección por pérdida de pigmentos y exposición a gas mostaza de nitrógeno, lo cual no solo afectó la producción de antibióticos β-lactámicos sino también al metabolismo secundario en general. Una de las cepas derivadas de tales modificaciones es la cepa Wisconsin 54-1255, cuyo genoma se encuentra secuenciado (Figura 1) y ha revelado la presencia de grupos de genes biosintéticos que codifican metabolitos secundarios como roquefortinas, fungisporina, sideróforos, ácido penítrico, ω-hidroxiemodina, crisogenina, crisogina, el sesquiterpeno toxina PR y sorbicilinoídes, aunque la mayoría de los genes se han estudiado muy poco y faltan por ser caracterizados (**Guzmán-Chávez et al., 2018**).

Un estudio genómico comparativo de tres cepas de *P. chrysogenum* que forman parte del linaje principal de CSI, reveló que la cepa Wisconsin 54-1255 y la cepa DS17690 sufrieron un total de 215 y 869 mutaciones en sus genes, respectivamente, en comparación con su cepa NRRL 1951. Además, estas mutaciones se distribuyeron por el genoma entre diversas categorías funcionales, como metabolismo, transporte, transcripción, biosíntesis de metabolitos

secundarios, ciclo celular y producción y conversión de energía, sin afectar a una clase específica de genes (Salo et al., 2015).

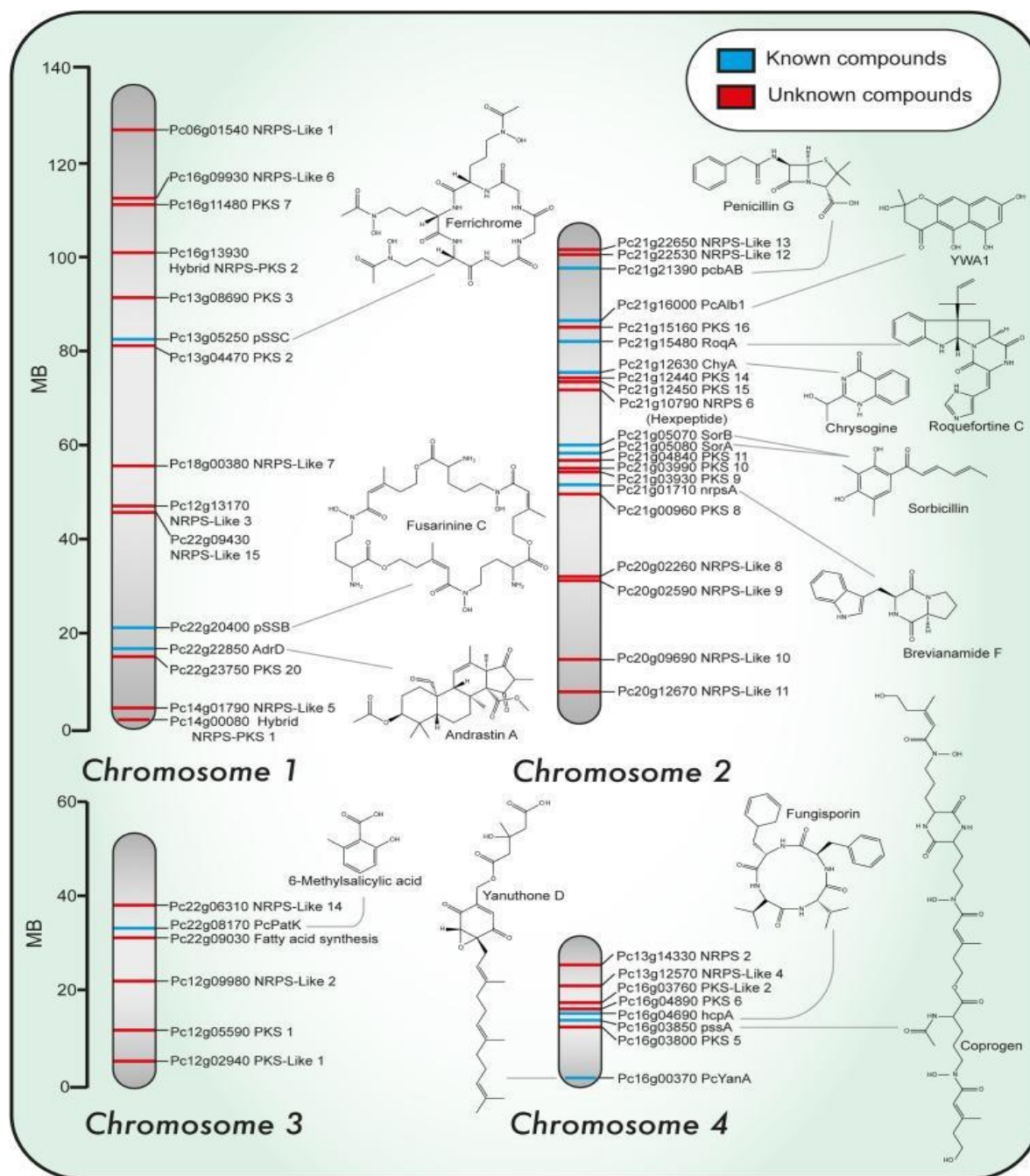
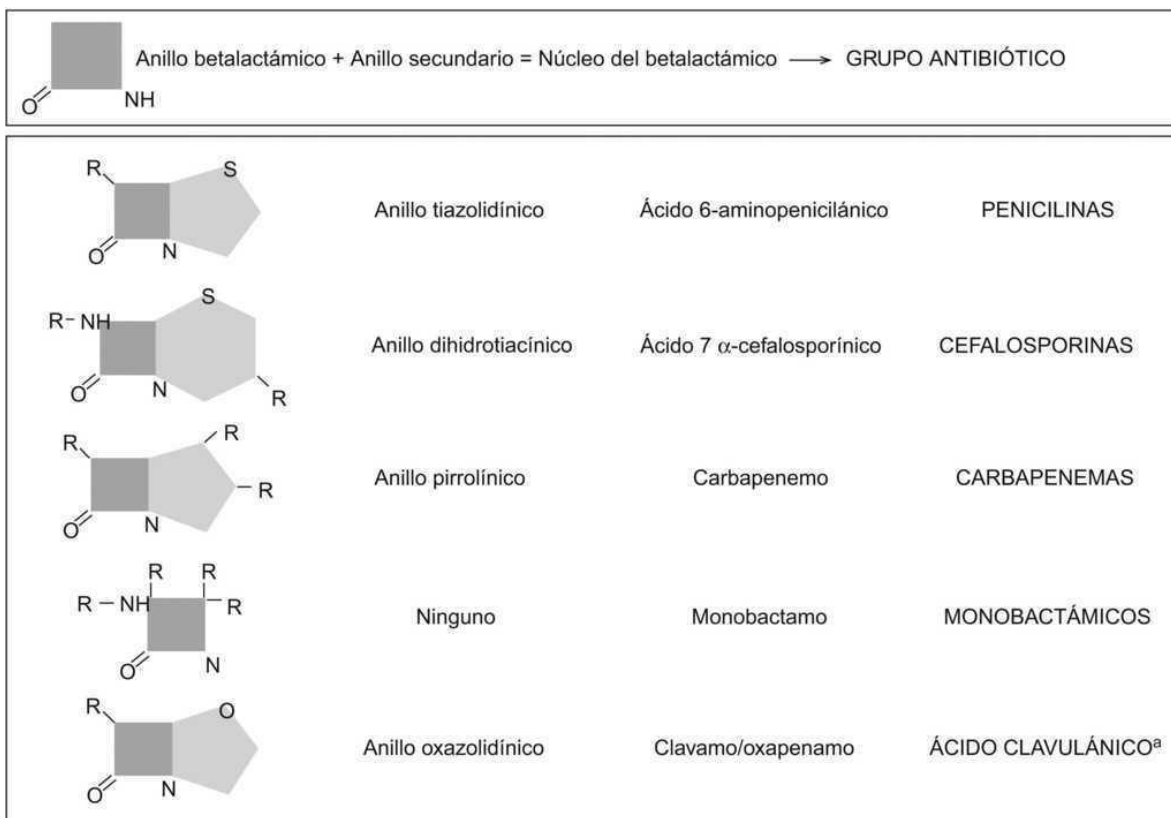


Figura 1. Secuenciación del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Tomada de Guzmán-Chávez et al. (2018).

2.3 Antibióticos β -lactámicos

El descubrimiento de los antibióticos en el siglo XX modificó drásticamente el combate contra las enfermedades infecciosas provocadas por bacterias, además de facilitar el trasplante de órganos y la cirugía a corazón abierto. Sin embargo, el mal uso de estos compuestos ha traído como consecuencia un aumento en la resistencia a los antibióticos: se estima que, sin acciones oportunas, en el año 2050 morirán aproximadamente 10 millones de personas anualmente por infecciones resistentes a los antibióticos (**Hutchings et al., 2019**). En la actualidad, se estima que existe un gasto anual aproximado de 15 000 millones de dólares estadounidenses en este tipo de antibióticos y que este gasto representa un 65% del mercado total de antibióticos (**Pandey, 2021**).

Los antibióticos β -lactámicos son un amplio grupo de moléculas, producidas naturalmente por diferentes organismos (**De Rosa et al., 2021**). Los compuestos de esta familia se prescriben con frecuencia, debido a su baja toxicidad y alta actividad (**Barreiro et al., 2012**). Con respecto a su estructura química, la presencia del anillo β -lactámico es característico de esta familia de antibióticos. Se trata de un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno; sin embargo, es necesario que el anillo esté unido a otros radicales (generalmente otros anillos) para la presencia de la actividad. El hecho de que diferentes cadenas laterales se asocien al esqueleto formado por los dos anillos (núcleo), genera diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de betalactamasas (**Suárez & Gudiol, 2009**). Es precisamente esa cadena la que le proporciona características antimicrobianas, farmacocinéticas y toxicológicas (**Gómez et al., 2015**). Su estructura esquemática puede observarse en la Figura 2.



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 2. Estructura química de los β -lactámicos.
Tomada de Suárez & Gudíol (2009).

Los antibióticos β -lactámicos presentan especificidad sobre las bacterias, y su mecanismo de acción se puede agrupar en cinco categorías: deterioro de la membrana citoplásmica, inhibición de la síntesis de la pared celular, proteínas, ácidos nucleicos e interrupción de la función y permeabilidad de la membrana. Las bacterias han desarrollado mecanismos que les han permitido generar resistencia a los fármacos, por ejemplo mediante una bomba de expulsión del antimicrobiano (que involucre transporte activo o por fuerza protón motriz), por la inactivación de las moléculas antimicrobianas (a través de β -lactamasas) o por mutaciones, ya sea de las proteínas de unión a penicilina (que terminan por modificar el objetivo

del fármaco) o de las porinas (que obstruyen la entrada del fármaco) (Fernandes et al., 2013).

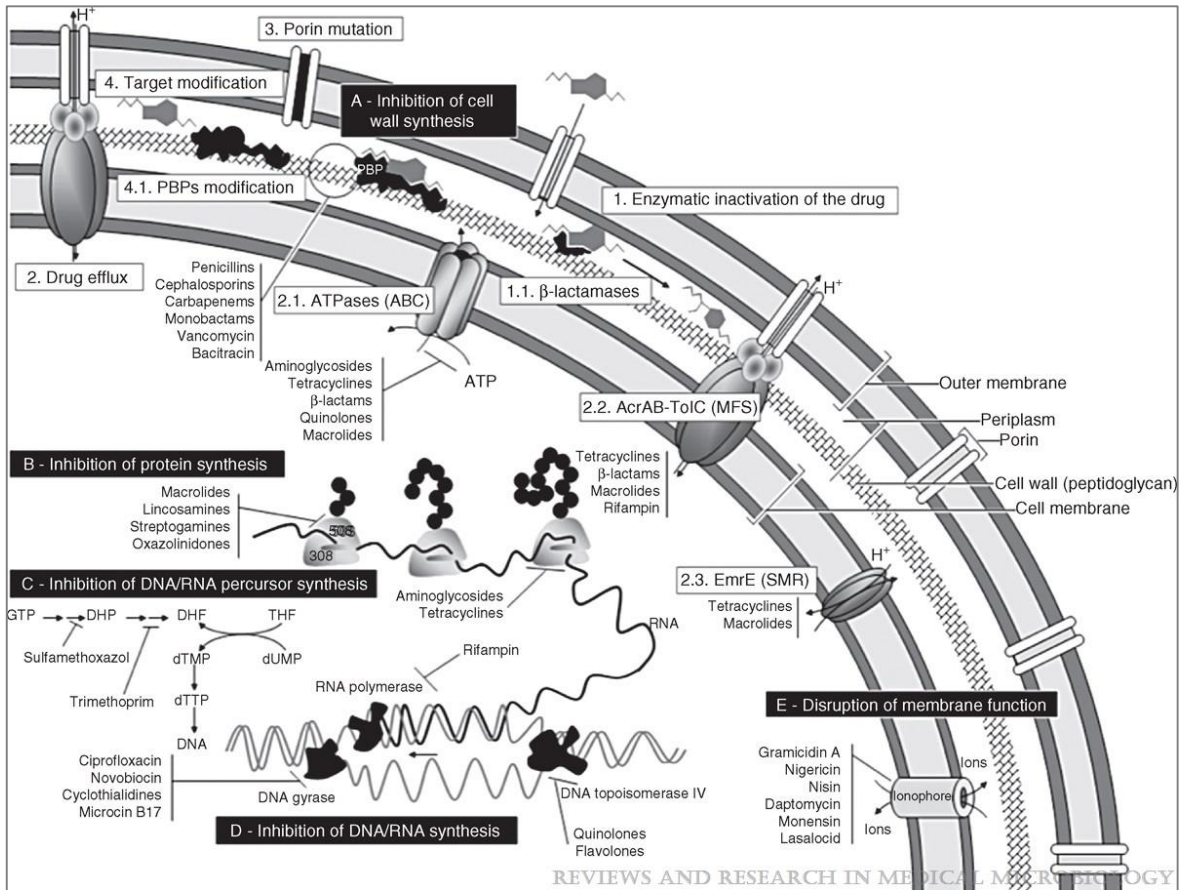


Figura 3. Mecanismo de acción de los antibióticos en organismos Gram negativos.
Tomada de (Fernandes et al., 2013).

2.4 Producción de penicilina

El antibiótico penicilina es uno de los antibióticos β -lactámicos de mayor concurrencia para tratar enfermedades infecciosas. Este antibiótico es el producto final de solo algunos hongos filamentosos, principalmente *P. chrysogenum* y *Aspergillus nidulans* (Brakhage et al., 2004). La estructura base de la penicilina

consta de un anillo β -lactámico fusionado a un anillo de tiazolidina y una cadena lateral acilo unida al grupo amino en el carbono seis (p.ej., en el caso de la penicilina F la cadena lateral es ácido 3-hexenoico y en la penicilina K la cadena lateral es ácido octanoico). Ambas penicilinas se producen naturalmente, sin embargo, cuando al medio de cultivo se le adicionan ácidos fenilacético y fenoxiacético, se produce bencilpenicilina (penicilina G) y fenoximetil penicilina (penicilina V), respectivamente (**Barreiro et al., 2012**).

Generalmente, los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentran en grupos junto a genes de resistencia a la toxicidad de los mismos metabolitos y, ocasionalmente, junto a genes para la biosíntesis de precursores de antibióticos. El grupo de genes de biosíntesis de penicilina son *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, además presentan la misma disposición en *P. chrysogenum*, *A. nidulans* y *Penicillium nalgiovense* (**Martín, 2000**).

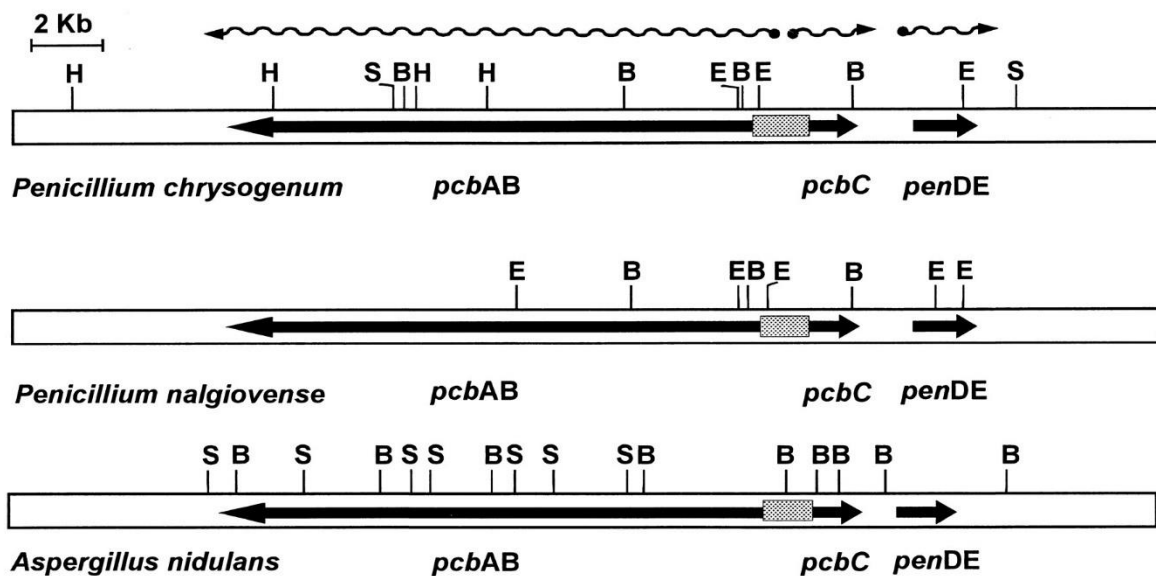


Figura 4. Clúster de biosíntesis de penicilina en hongos filamentosos. Tomada de(Martín, 2000).

La biosíntesis de penicilina es catalizada por tres enzimas, en una primera reacción de biosíntesis, tres aminoácidos (L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina) son condensados en el tripéptido δ - (L- α -aminoadípil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) por acción de la enzima citosólica ACV sintetasa, una enzima codificada por el gen *pcbAB*. Una segunda reacción, catalizada por la isopenicilina N sintasa, da como resultado isopenicilina N. Esta reacción se caracteriza por el cierre oxidativo del anillo del tripéptido lineal ACV, lo que repercute en la formación de un anillo bicíclico que conforma el anillo de tiazolidina y β -lactama. La isopenicilina N sintasa es codificada por el gen *pcbC*. Una última reacción es catalizada por la enzima isopenicilina N aciltransferasa; en esta tercera reacción la cadena lateral hidrófoba L- α -aminoadípato de la isopenicilina N se intercambia por un grupo fenilacetilo o fenoxiacetilo hidrófobo, dando como resultado penicilina G o penicilina V, respectivamente. La isopenicilina N aciltransferasa es codificada por el gen *penDE* (Ziemons et al., 2017).

Aunque la producción de penicilina no es crucial para la supervivencia de los organismos productores, diversos estudios han respaldado que una compleja red de condiciones, como pH ambiental, fuente de carbono y fuente de nitrógeno, interviene regulando la biosíntesis del metabolito (Brakhage et al., 2004).

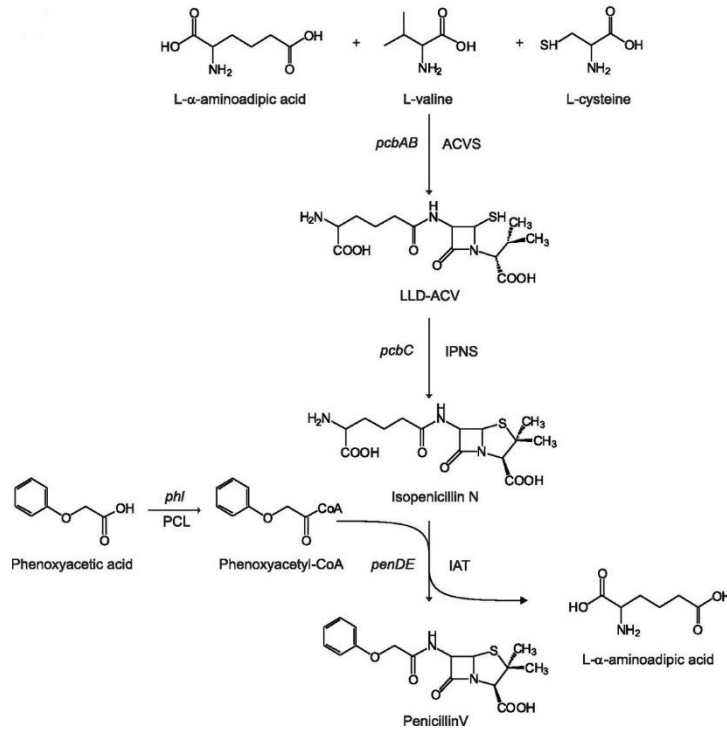


Figura 5. Ruta de biosíntesis de penicilina.
Modificada de(Weber, Polli, et al., 2012).

2.4.1. Represión de la biosíntesis de penicilina por fuente de carbono

Para la biosíntesis industrial de penicilina en *P. chrysogenum* se ha utilizado lactosa como fuente de carbono. También se ha probado con un lento aporte de glucosa (altas concentraciones de glucosa reprimen la formación de ACV, el primer intermediario de la vía de biosíntesis de penicilina). Las observaciones en *A. nidulans* resultan interesantes, pues se ha observado que la biosíntesis de penicilina se ve reprimida al usar sacarosa como fuente de carbono y en menor medida con glucosa, sin embargo, algunas cepas parecen ser menos sensibles a la glucosa (Martín, 2000). En *P. chrysogenum* se ha demostrado la participación del factor de transcripción CreA en la represión por glucosa: tras la delección de los sitios de unión CreA se pudo observar un aumento en la expresión del gen *pcbAB*.

También en transformantes silenciados del gen *creA* se observó la desrepresión total de la biosíntesis de penicilina (**Cepeda-García et al., 2014**).

2.4.2. Producción de penicilina en función del pH

PacC es un factor de transcripción que contiene tres dedos de zinc Cys₂His₂. En *A. nidulans* se observó que PacC regula la expresión del gen *pcbC* tras un ligero incremento en el pH (**Espeso et al., 1993**). PacC cuenta con tres sitios de unión en la región intergénica de los genes *pcbAB* y *pcbC* de *P. chrysogenum* (**Suárez & Peñalva, 1996**). Un efecto similar al de *A. nidulans* se observó en *P. chrysogenum*: aunque el efecto del pH alcalino parece más débil, los genes *pcbC* y *penDE* estimularon ligeramente su expresión (**Martín, 2000**).

2.4.3. Represión en la biosíntesis de penicilina por nitrógeno

Se demostró que en *P. chrysogenum* la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC* es reprimida por una concentración 40 mM de NH₄Cl (**Feng et al., 1994**). En *A. nidulans*, *Neurospora crassa* y *P. chrysogenum* los genes *areA*, *nit-2* y *nre* codifican para proteínas del tipo dedos de zinc que funcionan como factores de transcripción y reconocen secuencias consenso GATA. En *P. chrysogenum* la región intergénica comprendida entre *pcbAB* y *pcbC* cuenta con seis secuencias GATA, de las cuales dos son reconocidas por la proteína NRE, por lo que es probable que NRE medie la biosíntesis de penicilina en presencia de nitrógeno (**Brakhage, 2004**).

2.4.5. Efecto del regulador global LaeA en la biosíntesis de penicilina

Los reguladores globales son factores de transcripción que, en conjunto coordinan la respuesta de diversos genes a cambios ambientales (**Unoarumhi et al., 2016**). El regulador global LaeA controla la producción de metabolitos secundarios, incluyendo la producción de penicilina, la pigmentación y la esporulación (Weber, Bovenberg, et al., 2012). A través del silenciamiento en *P. chrysogenum* del gen que codifica para LaeA (PcLaeA), se observó una reducción en la biosíntesis de penicilina, así como defectos en la esporulación y pigmentación en la mutante

knock down, mientras que con la sobreexpresión de *PcLaeA* se observó un incremento en la biosíntesis del metabolito (**Kosalková et al., 2009**).

2.5 Transducción de señales intracelulares

La transducción de señales es un mecanismo controlado por cascadas de señalización, mediante el cual las células pueden interpretar y responder a estímulos externos, pudiendo de esta forma transmitir información bioquímica entre la membrana y núcleo celular (**Catozzi et al., 2016**). Los objetivos de las vías de señalización incluyen factores de transcripción que repercuten en la expresión génica y, por lo tanto, en la repuesta a las condiciones extracelulares (**Cooper, 2000**).

La mayoría de las plantas y animales comparten mecanismos básicos de señalización celular, sin embargo, algunos son poco frecuentes y otros únicos en cada reino. En las últimas décadas una gran cantidad de vías de señalización celular junto con sus componentes han sido identificadas. Esto implica muchos años de trabajo experimental, con técnicas genómicas y bioquímicas; de hecho determinar el papel de una proteína en una vía de señalización es de los trabajos experimentales más exhaustivos (**Valdespino-Gómez et al., 2015**). Por ejemplo, es común observar la presencia de cambios en la morfología de la célula, características de migración y repuesta a diferentes sustratos, usar transfección de células con plásmidos que expresan proteínas constitutivamente activas o inactivas o realizar ensayos de transferencia en Western que permite detectar proteínas fosforiladas mediante anticuerpos fosfo-específicos (**Hartford Svoboda & Reenstra, 2002**).

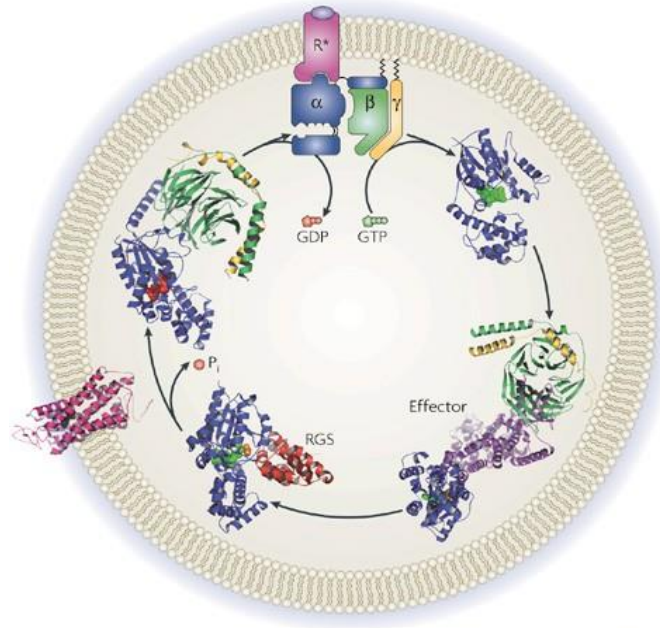
Los componentes básicos de una vía de señalización celular incluyen a las moléculas señalizadoras y los receptores de la señal. Las moléculas señalizadoras pueden encontrarse en el espacio extracelular o embebidas en la matriz extracelular, los receptores pueden ser canales iónicos, receptores asociados a proteínas G o asociados con enzimas con actividad cinasa, de hecho, las

moléculas señalizadoras pueden interactuar con más de un tipo de receptor. El tercer componente de las vías de señalización son los transductores, que principalmente son proteínas que transitan por una o pocas vías y moléculas como AMP cíclico, GMP cíclico y Ca^{2+} y que generan una amplificación masiva de la señal, sirviendo como estímulo para la activación de otras vías. Como cuarto componente de las vías se encuentran los sensores, que pueden ser intermediarios o finales en la vía y los efectores que pueden actuar sobre blancos moleculares únicos. El último componente de la vía es la propia respuesta que se ejerce (**Valdespino-Gómez et al., 2015**).

2.6 Proteínas heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas juegan un papel importante en la señalización celular, ya que funcionan como interruptores moleculares que activan cascadas de señalización celular como consecuencia de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) por un estímulo extracelular. La función de las proteínas G heterotriméricas depende de la capacidad de la subunidad $G\alpha$ para pasar de un estado inactivo unida a GDP a uno activo, unida a GTP, lo cual puede modular la actividad de proteínas efectoras corriente abajo (**Oldham & Hamm, 2008**).

Las proteínas G heterotriméricas se componen de tres subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. En estado estacionario (inactivo) la subunidad $G\alpha$ se encuentra unida a GDP. Tras la estimulación de un GPCR se promueve la disociación de GDP de la subunidad $G\alpha$, lo que permite su interacción con GTP. La unión de GTP a $G\alpha$ provoca un cambio conformacional a su forma activa, desestabilizando el complejo heterotrimérico y provocando la disociación de las subunidades en $G\alpha(\text{GTP})$ y $G\beta\gamma$, lo que permite que interactúen con proteínas efectoras. La señal finaliza cuando se hidroliza el GTP a GDP de la subunidad $G\alpha$, una reacción catalizada por el regulador de proteínas de señalización de proteína G (RGS) u otras proteínas aceleradoras de GTPasa (GAP) (**Urano et al., 2013**).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 6. Ciclo de las proteínas G heterotriméricas.
Tomada de (Oldham & Hamm, 2008).

2.7 Proteín cinasas activadas por mitógenos

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional primordial, que permite la comunicación entre señales externas a la membrana celular y el núcleo. Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) han evolucionado de tal manera que son capaces de transducir señales ambientales y de desarrollo en repuestas adaptativas y programadas. Una de las características que las vuelve interesantes para su estudio es que presentan una expresión ubicua, además, su activación depende del tipo de célula y del momento en el ciclo celular en el que ésta se encuentre (**Peti & Page, 2013**).

Las MAP cinasas han sido investigadas en levaduras y mamíferos, debido a que su activación está relacionada con respuestas a condiciones de hipoosmolaridad, hiperosmolaridad, luz ultravioleta, agentes genotóxicos, choque térmico, estiramiento mecánico y mediadores inflamatorios (**Saucedo & Gavilanes, 2005**).

También, por su participación dentro de las vías de transducción de señales promoviendo procesos tales como diferenciación, desarrollo, respuesta a estrés y biosíntesis de metabolitos secundarios **(Zhao et al., 2007)(Yuan et al., 2018)**. Se ha demostrado que una desregulación de las vías de señalización de las MAP cinasas contribuye al desarrollo de enfermedades humanas tales como artritis reumatoide, cáncer y Alzheimer, entre otras **(Sun & Nan, 2016)**.

Las MAPK son proteínas cinasas que pueden autofosforilarse en algunos de sus aminoácidos serina y treonina, o los que se ubican en sus sustratos, para activar o desactivar su objetivo **(Soares-Silva et al., 2016)**. Las vías de señalización de las MAPK funcionan en módulos conformados por tres proteínas cinasa activadas de manera secuencial (Figura 7), dicha secuencia comienza con la fosforilación de una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), cuya fosforilación es catalizada por proteína cinasa corriente abajo de los receptores de membrana celular, proteínas G e inclusive por la GTPasa. Posteriormente la MAPKKK fosforila y activa a una MAP cinasa cinasa (MAPKK) en residuos catalíticos de Ser/Thr conservados en los subdominios VII y VIII de su estructura primaria. Finalmente, la MAPKK activa a la MAP cinasa (MAPK) a través de la fosforilación de los residuos Thr/Tyr de un motivo tripéptido conservado TxY ubicado dentro del bucle de activación del subdominio VIII. De esta manera la MAPK puede fosforilar sustratos en el citosol y en el núcleo, para causar cambios en la expresión génica y poder responder de manera adecuada al estímulo **(Cargnello & Roux, 2011; Morrison, 2012; Saucedo & Gavilanes, 2005)**.

En este trabajo se estudiaron algunas respuestas fenotípicas de *P. chrysogenum* tras el silenciamiento mediante RNA de interferencia (RNAi) de la MAPK codificada por el gen Pc13g11680 (que aquí llamamos PcHog), ortóloga de la MAPK Hog1 de *Saccharomyces cerevisiae*, Sty1 de *Schizosaccharomyces pombe* y p38 de *Homo sapiens*.

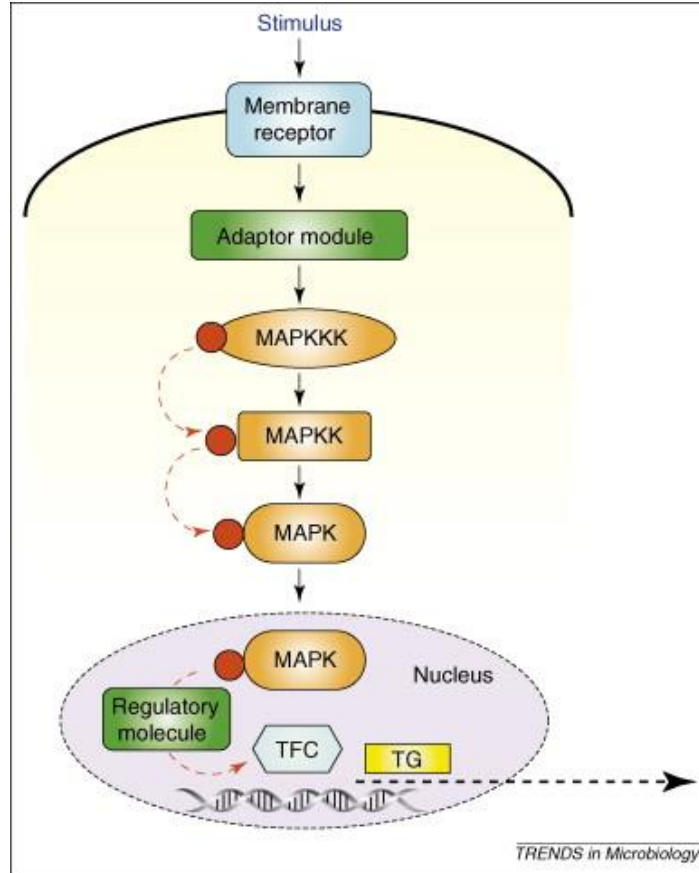


Figura 7. Esquema general de una vía MAPK.
Tomada de Román et al. (2007).

2.8 Silenciamiento mediante RNAi

El RNAi es un mecanismo caracterizado por utilizar RNA de pequeña longitud como guía para el silenciamiento específico de una secuencia homóloga (Svoboda, 2020). Se observó por primera vez en *Caenorhabditis elegans* donde, tras un suministro de ARN bicatenario largo (dsRNA) exógeno, la expresión de mRNA homólogo se vio disminuida (Fire et al., 1998). Se ha informado que el silenciamiento por RNAi ocurre en los cuatro reinos eucariotas, pero no en

Monera, posiblemente la maquinaria de RNAi surgió antes de la divergencia de los linajes eucariotas (**Nakayashiki et al., 2006**). Se ha planteado la hipótesis de que el RNAi evolucionó para la regulación negativa de los genes transmitidos por el RNA de doble cadena (dsRNA) transmitido por virus mientras que en los eucariotas el sistema es utilizado para regular procesos celulares (**Matveyev et al., 2017**).

En mamíferos, el dsRNA es escindido por la enzima DICER, los fragmentos resultantes (de entre 21 y 23 nucleótidos) poseen extremos salientes fosforilados de dos nucleótidos en 3' y 5' y son llamados RNA cortos de interferencia (siRNA). Los siRNA se incorporan a continuación al complejo multiproteico de silenciamiento inducido por ARN (RISC); RISC cuenta con actividad endonucleolítica y además posee un dominio PAZ que se ha sugerido permite la transferencia de siRNA. El complejo RISC pasa a un estado activo mediante el desenrollamiento del dúplex de siRNA y la pérdida de la hebra sentido. Finalmente, la hebra antisentido es la que le brinda especificidad a la RISC activa para que pueda localizar y silenciar los genes objetivo (**Baulcombe, 2009; Gust & Bonin, 2008; Kim & Rossi, 2009**).

El RNAi como técnica es una herramienta poderosa, debido a que es posible la evaluación funcional de miles de genes gracias a su eficacia en la disminución de la expresión de los mismos y permite evaluar cambios en las vías de señalización y cambios fenotípicos (**Younis et al., 2014**). Se han descrito varios métodos para la inducción del mecanismo RNAi a través de siRNA's sintetizados químicamente, que resultan transitorios y costosos. Otros métodos reportan el uso de plásmidos que se integran a la célula y, por lo tanto, se replican con cada división (**Agrawal et al., 2003; Wolters & MacKeigan, 2008**).

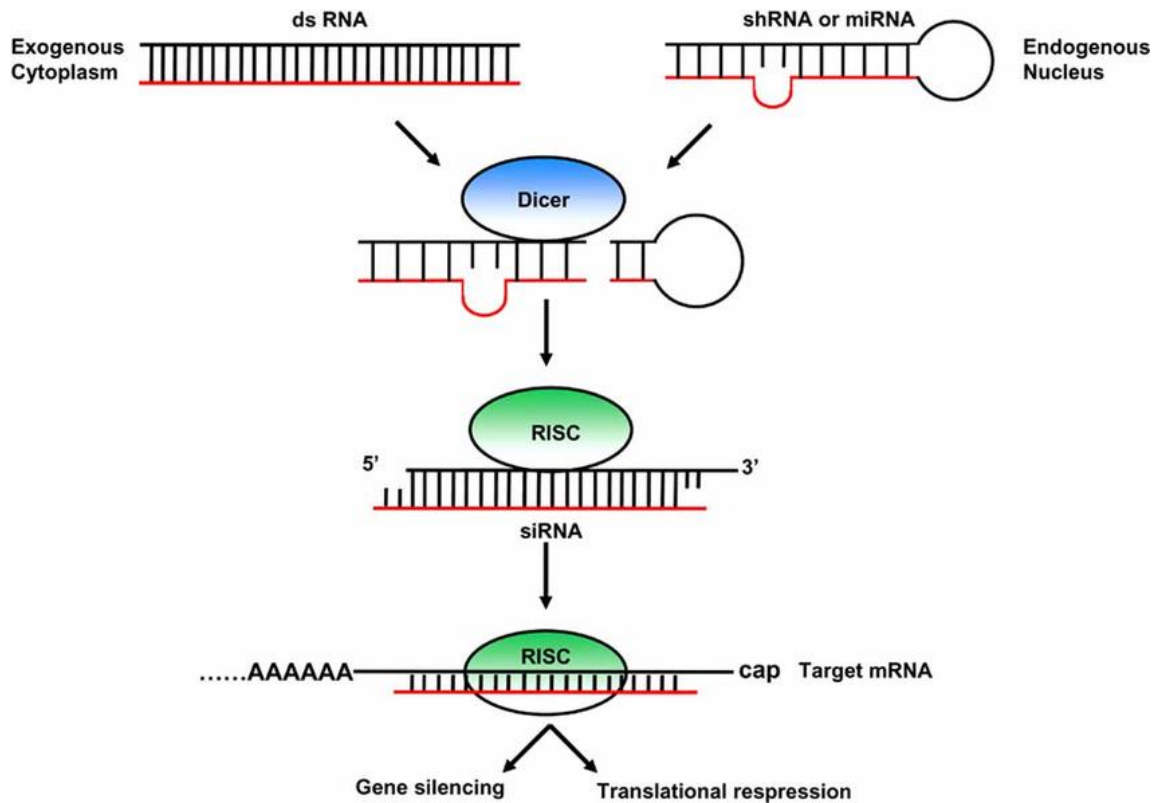


Figura 8. Vía de silenciamiento mediante RNAi.
Tomada de Gust & Bonin (2008).

2.9 Estrés oxidante

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es parte de la actividad celular normal. Son producidas en diversos compartimentos celulares y su aumento tiene efectos perjudiciales sobre la homeostasis, estructura y función de las células, pero además desempeñan un papel importante en las vías de señalización celular (**Snezhkina et al., 2020**). La mayoría de los ROS son generados a nivel mitocondrial, el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es el principal ROS producido y su presencia da origen al resto de ROS de importancia biológica, tales como peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, radical peroxilo y oxígeno singulete. Bajo condiciones basales, el superóxido y el peróxido de hidrógeno representan la mayoría de los ROS producidos dentro de la célula (**Carvajal Carvajal, 2019**).

Aunque los organismos presentan un sistema complejo de sistemas antioxidantes destinados a eliminar las ROS, algunas de estas moléculas no se eliminan y modifican el estado redox celular, lo que conduce al estrés oxidante. En la célula, las ROS dañan biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (**Aung-Htut et al., 2012; Breitenbach et al., 2015**). Sin embargo, en microorganismos eucariotas como los hongos filamentosos, las ROS y las enzimas productoras de ROS como las NADPH-oxidasa (NOX) tienen una participación crucial en los procesos de diferenciación celular (**Aguirre et al., 2005**). Estudios previos han relacionado la biosíntesis de metabolitos secundarios y la respuesta al estrés oxidante en *Aspergillus flavus*: las ROS están asociadas con la biosíntesis de metabolitos secundarios como micotoxinas, particularmente estimulando la producción de aflatoxinas (**Fountain et al., 2016**).

S. pombe posee una MAPK, llamada Sty1 (ortólogo de Pc13g11680), activada mediante la fosforilación de los sitios Thr-171 and Tyr-173, los cuales se encuentran en un motivo de activación. La activación de Sty1 provoca cambios en la expresión génica que promueven la resistencia al estrés oxidante en *S. pombe* (**Papadakis & Workman, 2015**). Un sustrato de Sty1 es el factor transcripcional Atf1: la fosforilación de Atf1 por Sty1 regula la función y estabilidad de este factor de transcripción. La activación de Atf1, por su parte, conduce a la expresión de genes involucrados en la resistencia al estrés oxidante (**Salat-Canela et al., 2017**). En el resto de la vía existe la transferencia secuencial corriente abajo de un grupo fosfato, que pasa por Mak2, Mak3, Mpr1 y Mcs4 hasta llegar a la MAPKKK Win1/Wak1. Finalmente la MAPKK Wis4 fosforila a Sty1 (**Sansó et al., 2011**).

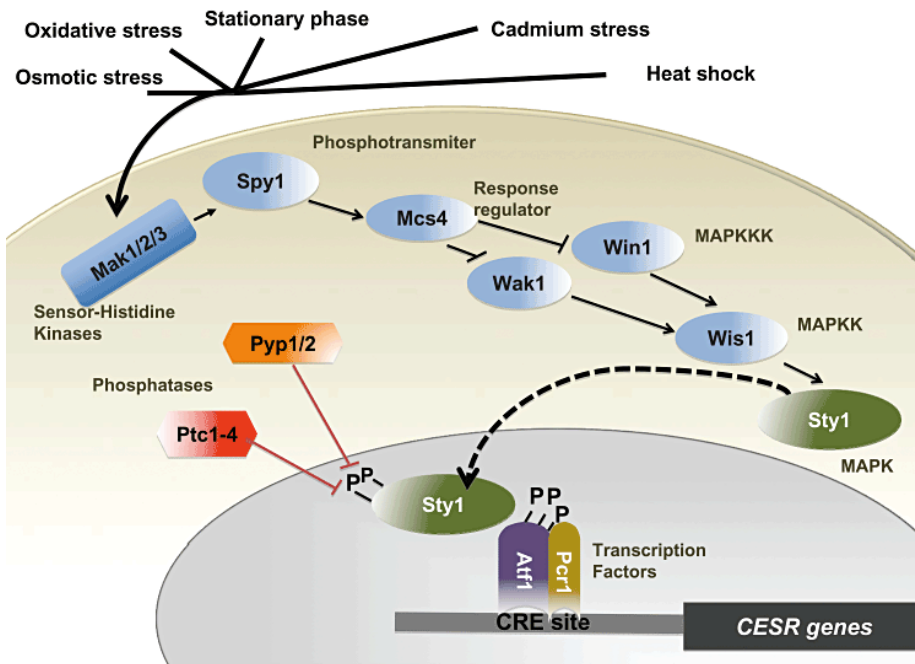


Figura 9. Activación de la ruta MAPK Sty1 por estrés oxidante.
Tomada de Sansó et al. (2011).

2.10 Estrés osmótico

Las plantas y frutos son parte del ambiente natural de *S. cerevisiae*, por lo que esta levadura ha desarrollado mecanismos que le permiten combatir el estrés hiperosmótico provocado por los azúcares y solutos presentes en su microambiente. Un ambiente de hiperosmolaridad provoca en *S. cerevisiae* una disminución en su volumen celular, debido a la pérdida de agua del citosol. Para sobrevivir y continuar con la proliferación celular debe transcurrir un periodo de adaptación, en el cual ocurren cambios en el citoesqueleto y una reprogramación del metabolismo, que aumenta la concentración intracelular del glicerol (Folch et al., 2004).

La síntesis y acumulación de glicerol ocurre tras la activación de genes como el de la GDP1 que codifican para glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Con esto, *S. cerevisiae* responde de manera apropiada a condiciones de hiperosmolaridad, ya

que la presencia de glicerol en el citosol permite reducir la diferencia de presión osmótica transmembrana y evita la pérdida de agua. Este fenómeno ocurre por medio de la vía MAP cinasa glicerol de alta osmolaridad (HOG) (**Dihazi et al., 2004**).

En *S. cerevisiae*, la fosforilación y actividad de la MAPK Hog1 se encuentra controlada por dos ramas que actúan en la parte superior de la vía Hog, conocidas como Sln1 y Sho1. Las dos ramas activan a diferentes MAPKKK, que convergen en la MAPKK Pbs2 que funciona como proteína de andamio y permite la fosforilación de la MAPK Hog1, la cual ingresa al núcleo y fosforila varios factores de transcripción osmorreactivos como Msn2/Msn4, Sko1 y Hot1, que median la regulación positiva de casi 600 genes (**Hoffmeister, 2016**).

En condiciones normales la rama Sln1 es constitutivamente activa y se inactiva en caso de choque hiperosmótico: Sln1 se autofosforila en un residuo de histidina, posteriormente transfiere el grupo fosfato a Ypd1 y finalmente a Ssk1. Fosfo-Ssk1 es una forma inactiva que no permite la activación de la cascada corriente abajo. Sin embargo, tras un choque hiperosmótico la Ssk1 no fosforilada aumenta y la Ssk1 se une y activa a Ssk2 / Ssk22, permitiendo fosforilar y activar a Pbs2, que a su vez fosforila a Hog1 en Thr-174 y Thr-176 (**Hoffmeister, 2016**).

La rama Sho1 involucra a dos sensores transmembrana, Msb2 y Hkr1. Se cree que Sho1 es una proteína transmembranal adicional en la rama, pero parece desempeñarse como proteína de andamio en la membrana. Aún no se conocen los detalles del mecanismo, pero está claro que una estimulación hiperosmótica de los sensores provoca el reclutamiento a la membrana plasmática de Pbs2. Es posible que lleve consigo a la MAPKK Ste11 y, de ese modo, aproxima a las cinasas Ste20 y Cla4 que se encuentran asociadas a la proteína G Cdc42. Ste11 puede ser fosforilada por Ste20 y/o Cla4 y, una vez activa, fosforila a Pbs2 y activa Hog1 (**Hohmann, 2009**).

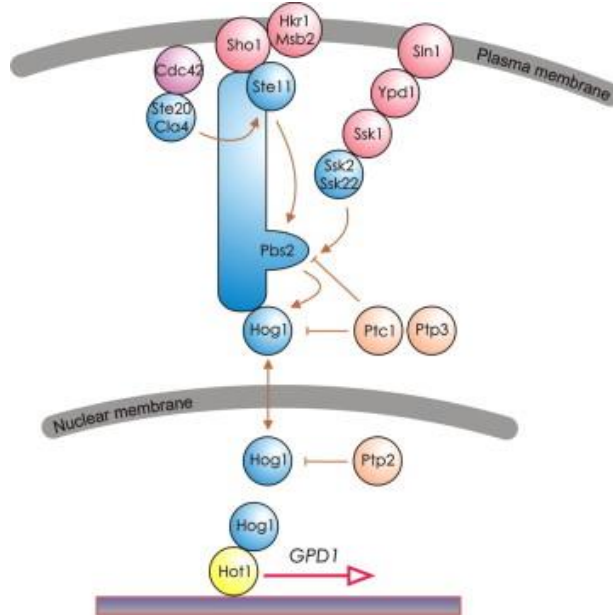


Figura 10. Vía de activación de la MAPK HOG1 de levadura.
Tomada de (Hohmann, 2009).

Otra serie de estímulos provocan la activación de la vía HOG: el estrés provocado por calor activa la vía mediante la rama Sho, mientras que el estrés oxidante activa la vía por ambas ramas. Sin embargo, en esta última no se detecta un aumento en la fosforilación de Hog1. La vía Sty1 de *S pombe* también se activa mediante otra serie de estímulos además del estrés oxidante, como estrés hiperosmótico, térmico, UV y bajas temperaturas (Hayashi & Maeda, 2006).

2.11 Vía HOG - MAPK y hongos filamentosos

En hongos filamentosos, la vía HOG – MAPK es la responsable de la tolerancia al estrés y se activa en conidios en respuesta al estrés. En la Figura 11 se encuentra la vía basada en el conocimiento de *A. nidulans* y *A. fumigatus*, se observa que SskA es el receptor final del sistema de señalización de dos componentes

osmosensible (TcsB-YpdA), es SskA quien comienza la activación de la cascada de señalización MAPK activando a SskB (MAPKKK) y esta a su vez activa a Pbs2 (MAPKK), la cascada MAPK finaliza en dos MAPK denominadas sakA y mpkC (Baltussen et al., 2020). En mutantes $\Delta sakA$ y $\Delta mpkC$ de *A. fumigatus* se ha observado daño en la pared celular y mayor sensibilidad al estrés osmótico y oxidativo (Bruder Nascimento et al., 2016).

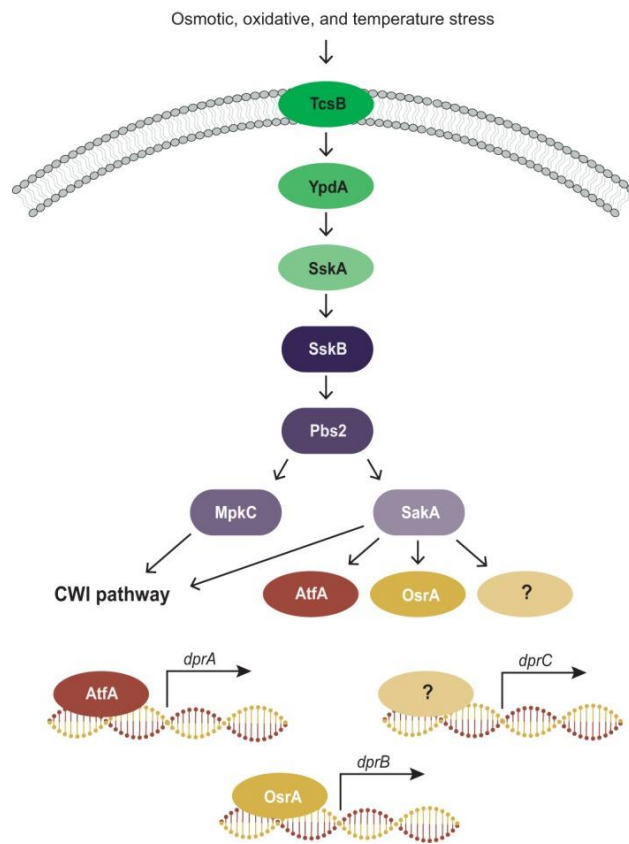


Figura 11. Vía de activación de SakA y MpkC (ambas ortólogos de Hog1) de *Aspergillus*.
Tomada de (Baltussen et al., 2020).

2.12 Bioinformática

De acuerdo al NHGRI, la bioinformática se define como “*una subdisciplina de la biología y las ciencias computacionales que se encarga de adquirir, almacenar, analizar y diseminar la información biológica, en gran parte correspondiente a las secuencias de ADN y aminoácidos*” (NHGRI, 2011). La bioinformática tiene diversas raíces que datan de mediados del siglo pasado, desde la primera secuenciación proteica realizada por Frederick Sanger, el descubrimiento de la doble hélice por Watson y Crick y el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación de DNA y proteínas. Esto no provocó más que un aumento en el volumen de secuencias almacenadas, y fue la pionera Margaret Oakley Dayoff quien hizo el primer intento por recopilar esta información en un libro que contenía la secuencia de 65 proteínas, pero no fue hasta 1980 cuando creó la primera base de datos computarizada, lo que impulsó que a finales de esa misma década se crearan las primeras bases de datos primarias (Franco et al., 2008).

La generación de bases de datos primarias, como Genbank, permitió catalogar y almacenar secuencias de DNA y proteínas. Con las bases de datos creciendo rápidamente, fue necesario desarrollar herramientas como BLAST, para que los usuarios pudieran identificar secuencias similares a las que se encontraban estudiando. A partir de este fenómeno se crearon bases de datos secundarias de conocimiento acumulado de dominios funcionales de proteínas, estructuras tridimensionales, vías de señalización y familias de proteínas, así como un vocabulario para cada componente del genoma de acuerdo con sus propiedades. En la actualidad, la bioinformática se mantiene vigente y apunta a la integración del conocimiento biológico a nivel de genoma, transcriptoma, metaboloma, interactoma y proteoma (Barnette, 2007).

2.13 Interactóma

Un interactoma se puede definir como una serie de puntos unidos por líneas y cuyo significado puede variar dependiendo del tipo de interactoma: puede ser de señalización, metabólico y transcripcional (**Petrey & Honig, 2014**). También se puede referir a redes que contienen interacciones físicas, que son aquellas que implican un contacto real, como el de las proteínas ensamblándose en un complejo, y las interacciones funcionales que se refieren a alguna relación biológicamente relevante (**Caldera et al., 2017**).

Las interacciones proteína-proteína (PPI) son útiles para comprender las vías de señalización celular (**Kotlyar et al., 2014**). Existen bases de datos públicas que proporcionan listas de PPI cuya información deriva de literatura científica, experimentos a pequeña escala, mapeo a escala de proteoma y predicciones computacionales basadas en la estructura proteica (aunque esto se apega a la cantidad de datos disponibles en la actualidad, por lo que es posible un sesgo) (**Caldera et al., 2017**). String es una base de datos pública que, al menos hasta 2019, contaba con 26,6 millones de proteínas, de 5090 organismos (**Szklarczyk et al., 2019**).

2.14 Ontología genética

La ontología genética (GO) es un vocabulario controlado y estructurado de términos que permite describir y relacionar productos génicos de acuerdo con sus propiedades biológicas (**Withworth, 2010**). La terminología unificada proporcionada por GO ha permitido la interoperabilidad entre bases de datos, mejor comunicación entre investigadores de la misma disciplina, crear softwares dirigidos a la minería de textos y facilitar el análisis de datos en la función de los productos génicos. Además, es posible actualizar las ontologías tras añadir o editar conceptos, sin afectar la consistencia lógica de la misma (**Viera et al., 2010**).

2.15 Western blot

La técnica Western blot se basa en el uso de anticuerpos para la detección y cuantificación de proteínas, que generalmente se encuentran en una mezcla compleja extraída de tejidos o células (**Tie et al., 2021**). La técnica se basa en la separación de una mezcla de proteínas conforme a su carga eléctrica y peso molecular haciendo uso de geles de poliacrilamida; posteriormente, las proteínas son transferidas a una membrana sintética y ésta es expuesta a un anticuerpo llamado anticuerpo primario. Este anticuerpo primario es reconocido por un segundo anticuerpo, conocido como anticuerpo secundario, el cual tiene acoplado algún tipo de molécula reveladora que permite visualizar la proteína (**Martínez et al., 2017**).

3. Justificación

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso de gran importancia biotecnológica. Se usa a nivel industrial en la producción del antibiótico penicilina. Además, se están desarrollando cepas que permiten la producción de otros metabolitos mediante técnicas de biología sintética para la expresión de *clusters* de genes heterólogos. Por otro lado, este hongo es un modelo para el estudio de la regulación del metabolismo secundario y otros procesos celulares importantes en los hongos filamentosos.

La vía de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas mediada por la subunidad Ga Pga1 regula varios procesos celulares en *P. chrysogenum*, entre ellos el metabolismo secundario y la producción de penicilina. Nuestro grupo ha caracterizado en profundidad dicha vía mediante técnicas como el análisis proteómico. En un estudio previo se identificó a la proteína codificada por el gen Pc13g11680 como una MAP cinasa y posible efector de la vía de las proteínas G. El interés de este proyecto radica en identificar a esta MAPK como un efector de dicha vía de transducción de señal y caracterizar su función en la célula, especialmente en aspectos relacionados con el metabolismo secundario y la respuesta al estrés.

4. Hipótesis

La proteína codificada por el gen Pc13g11680 de *P. chrysogenum* es una MAPK efectora de la vía de las proteínas G heterotriméricas y está involucrada en la regulación de procesos celulares tales como la respuesta al estrés.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Determinar la función de la MAPK codificada por el gen Pc13g11680 en *P. chrysogenum* y su relación con la vía de las proteínas G heterotriméricas.

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar fenotípicamente las mutantes silenciadas en el gen Pc13g11680 en aspectos como la resistencia a estrés osmótico, estrés oxidante, así como la producción de penicilina
- Analizar mediante Western blot la fosforilación de la MAP cinasa en diferentes fondos genéticos del gen codificante de la subunidad Ga Pga1
- Análisis *in-silico* del interactóma de la MAPK y su posible participación en la vía de las proteínas G heterotriméricas y procesos celulares como resistencia al estrés.

6. Materiales y métodos

6.1 Microorganismos

Para la validación de los experimentos se empleó la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 como cepa control (*wild type*), la cepa que contiene el plásmido de silenciamiento vacío como control positivo (pGdpki-RNAi), además se utilizaron cepas de silenciamiento del gen Pc13g11680. En el análisis de fosforilación se sumaron algunas mutantes de *P. chrysogenum* con diferentes fondos génicos del gen codificante de la subunidad G α Pga1. También se utilizó una cepa bacteriana de valoración contra penicilina G. La Tabla 1 muestra las cepas empleadas.

Tabla 1. Cepas empleadas durante los ensayos

Cepa	Característica
<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Cepa control (<i>wild type</i>)
<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi	Cepa control del silenciamiento
<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/PcHog	Cepa transformada con plásmido de silenciamiento para el gen Pc13g11680 en diferentes grados de silenciamiento.
<i>P. chrysogenum</i> Q204L	<i>pga1</i> ^{Q204L} , Subunidad G α Pga1 constitutivamente activa
<i>P. chrysogenum</i> Δ <i>pga1</i>	Gen <i>pga1</i> deletado, ausencia de G α Pga1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC-9341	Cepa de valoración contra penicilina

6.2 Interactoma *in silico*

Con la base de datos STRING (v 11.5) se reunieron de manera integral todas las fuentes de información para predecir computacionalmente la interacción proteína-proteína. Dichas interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales).

Se realizó una búsqueda con el identificador de la proteína PcHog (Pc13g11680) utilizando los parámetros “*Network type = full string network*”, “*meaning of network*”

edges = evidence”, “*minimun required interaction score = medium confidence*” y “*max number of interaction to show = no more tan 50 interactions*” para obtener la red de asociación proteína-proteína vinculada a esta proteína. Se analizó el listado de proteínas que interactúan con sus características y dominios principales, basando este análisis en bases de datos de apoyo como PDB (Protein Data Bank) y en reportes científicos subidos al NCBI. Las proteínas obtenidas en el interactoma fueron asociadas directamente a algún proceso biológico, función molecular y componente celular mediante un análisis funcional por GO Slim.

6.3 Obtención de esporas

Las cepas de *P. chrysogenum* (Tabla 1) fueron propagadas en medio sólido Power e incubadas a 27°C en una incubadora orbital INO 650V-9 (Prendo). Los conidios se colectaron mediante agitación mecánica con perlas de vidrio estériles y solución salina al 0.9%. La composición del medio Power se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio Power

Sacarosa	25 g
Lactosa	5 g
Peptona de caseína	2.5 g
Solidos de maceración de maíz	0.5 g
KCl	26.1 g
NaCl	2 g
NaNO ₃	1.5 g
K ₂ HPO ₄	0.25 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.25 g
Sales Power	1000 µL
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	1 000 L
Composición de sales Power	
KH ₂ PO ₄	6 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	1 g
FeCl ₃ *6H ₂ O	0.4 g
CuSO ₄ *7H ₂ O	0.2 g
agua destilada	200 mL

6.4 Obtención de biomasa

Para la obtención de biomasa de todas las cepas de *P. chrysogenum* (Tabla 1) se utilizó el medio líquido PMMY (Tabla 3). Se empleó un volumen de 50 mL de medio inoculado con una concentración de 10^7 esporas/mL, los cultivos se incubaron durante 72 h a 180 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL. La biomasa obtenida fue separada del medio mediante filtración y se sometió a lavados con solución salina al 0.9 %, posteriormente fue congelada con nitrógeno líquido y macerado para su almacenamiento a -20°C .

Tabla 3. Composición del medio PMMY

Glucosa	40 g
NaNO ₃	3 g
Extracto de levadura	2 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01 g
Agua destilada	1 000
	g

6.5 Extracción de proteína

El polvo resultante de la maceración del micelio se mezcló con buffer de extracción de proteína (Urea 6 M, Tris HCl 50 mM, DTT 5 mM, pH 7.4) y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Esta mezcla se trató con vortex y homogeneizador durante 5 minutos a 4°C . Las mezclas homogeneizadas se clarificaron mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4°C . Posteriormente las proteínas fueron precipitadas durante toda la noche en una solución al 20% de ácido tricloroacético (TCA) en acetona y 0.14 % de DTT. El precipitado fue lavado dos veces con acetona fría (100%) seguido de un lavado con una solución de acetona al 80%. Finalmente, las proteínas fueron solubilizadas en solución de rehidratación/solubilización (urea 6 M, tiourea 2 M, SDS 2%, DTT 100 mM).

Se cuantificó la proteína por método de Bradford y se verificó la calidad de las muestras en un SDS-PAGE.

6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

El SDS – PAGE se realizó de acuerdo con la metodología descrita por **Laemmli, (1970)**. El gel de concentración se preparó al 5% de acrilamida y el gel de separación al 12%. Las muestras se corrieron a 120 V durante 1.5 h. El gel fue sometido a lavados sucesivos con agua miliQ y tratado con 50 mL de solución fijadora (40% de etanol y 10% de ácido acético) durante una hora. Posteriormente, se dio otra ronda de lavados con agua miliQ y se dejó tiñendo con azul de Coomassie en agitación durante 12 h. El gel fue lavado con agua miliQ y etanol y se observó en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

6.7 Cuantificación de proteína

La cuantificación de la proteína se realizó empleando la técnica de microensayo (Bio-Rad, Protein Assay, Bulletin 9004). En una placa de 96 pozos se adicionaron 160 µL de proteína de cada una de las cepas (Tabla 1) y 40 µL de reactivo de Bradford. La mezcla se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm con un fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific™). En el caso del blanco, se adicionaron 160 µL de solución de rehidratación/solubilización y 40 µL de reactivo de Bradford. La concentración de proteína se determinó mediante una curva patrón de albúmina bovina sérica (BSA).

6.8 Western blot

Los geles para SDS-PAGE fueron cargados con 150 µg de la proteína correspondiente y se corrieron a 120 V durante 1.5 h, los geles fueron tratados con un protocolo de transferencia húmeda con buffer de transferencia a 120 V durante 1.25 h y una membrana de PVDF previamente activada en metanol durante 30 s y humedecida 20 minutos en buffer de transferencia. Las membranas fueron sometidas a tres lavados de 10 minutos con una solución TBST; posteriormente, se llevó a cabo el bloqueo con TBST adicionada con 3% BSA durante 40 minutos.

Tabla 4. Composición de buffer de transferencia y solución TBST

Buffer de transferencia	Tris	25 mM
	Glicina	190 mM
	Metanol	20 %
TBST	Tris pH 7.5	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0.1 %

Las membranas fueron incubadas en agitación suave durante 24 h a 4°C, dos de ellas con el anticuerpo primario p38 MAPK 49lpha Monoclonal Antibody (Thermo) para la detección total de p38 MAPK (1:400) y una más con el anticuerpo primario Phospho-p38 MAPK 49lpha (Thr180, Tyr182) Monoclonal Antibody (Thermo) (1:400) para identificar la fosforilación. En las mismas condiciones, las tres membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a HRP (1:5 000). Las membranas fueron embebidas en una solución con luminol y H₂O₂ en la oscuridad durante dos minutos, las bandas se visualizaron en un equipo de quimioluminiscencia con un tiempo de exposición de dos minutos. El análisis densitométrico se realizó mediante el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov>).

6.9 Producción de penicilina

Se realizó una colecta de 5×10^8 conidios de las cepas *P. chrysogenum* Wis 54-1255, *P. chrysogenum* pGdpki-RNAi y del lote de silenciados con el plásmido pGdpki-RNAi/*PcHog*, a partir de cultivo sólido en medio Power. Los conidios se inocularon en 100 mL de medio MCIP (Tabla 5), incubando a 28°C y 250 rpm durante 24 h.

Tabla 5. Composición del medio MCIP

Sacarosa	20 g
Sólidos de maceración de maíz	20 g
Extracto de levadura	10 g
CaCO ₃	5 g
Agua destilada	1 000 mL
pH	5.7

Posteriormente se tomaron 8 mL del medio preinóculo con biomasa desarrollada y se inocularon en 50 mL de medio MCFP (Tabla 6) por triplicado biológico, incubándose a 28°C a 250 rpm durante 120 h, para la toma de muestras de 2 mL (por duplicado) cada 24 h.

Tabla 6. Composición del medio MCFP

Lactosa	55 g
Sólidos de maceración de maíz	35 g
CaCO ₃	10 g
KH ₂ PO ₄	7 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	3 g
Ácido fenoxiacético al 40% (p/v)	10 mL
Agua destilada	1 000 mL
pH	5.7

Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min, el sobrenadante se conservó a 4°C para la medición de pH y bioensayos, la biomasa se lavó por centrifugación con solución salina al 0.9% y HCl 0.1 M y se secó en una estufa a 80°C durante 72 h para el registro del peso seco.

Como cepa de valoración se utilizó *Micrococcus luteus* ATCC-9341 a una $DO_{inicial} = 1$ a 600 nm en TSB (Tabla 7) que se llevó a una $DO_{final} = 0.01$ en 220 mL de medio TSB con 1% de agar bacteriológico para verter en placas de bioensayo.

Tabla 7. Composición del medio TSB

Digerido pancreático de caseína	17 g
Digerido péptico de harina de soja	3 g
Glucosa	2.5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Agar	10 g
Agua destilada	1 000 mL
pH	7.3

Se perforaron pocillos en las placas de bioensayo ya solidificadas y de cada muestra de medio de cultivo se agregaron 60 µL, además de 60 µL de la curva de penicilina G (0.1, 0.5, 2.5, y 5 µg/mL), las placas se refrigeraron a 4°C durante 2 h, posteriormente se incubaron a 30°C durante 12-15 h y finalmente se midieron los halos de inhibición para los cálculos de producción específica de penicilinas.

6.10 Estrés osmótico

6.10.1 Micelio

Para evaluar la resistencia al estrés osmótico sobre micelio se trabajó con una cuenta controlada de conidios recién colectados de medio solido Power de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 esporas/mL de las cepas *P. chrysogenum* Wis 54-1255, *P.*

chrysogenum pGdpki-RNAi y del lote de silenciados con el plásmido pGdpki-RNAi/*PcHog*. En placas de bioensayo con medio PDA adicionadas con 0.0, 0.4, 0.8 y 1.2 M de sorbitol se inocularon 10 µL de cada una de las cepas, manteniendo una distancia de 5 cm entre inóculos, una vez secas las muestras se incubaron a 27°C durante 120 h monitoreando cada 24 h para determinar su resistencia al estrés osmótico.

6.10.2 Conidios

Para evaluar la resistencia al estrés osmótico sobre conidios se trabajó con una cuenta controlada de conidios recién colectados de medio solido Power de 1×10^3 esporas/mL de las cepas *P. chrysogenum* Wis 54-1255, *P. chrysogenum* pGdpki-RNAi y del lote de silenciados con el plásmido pGdpki-RNAi/*PcHog* con concentraciones de 0.0, 0.4, 0.8 y 1.2 M de sorbitol añadidas al medio PDA. Se emplearon 50 µL de todas las cepas y se sembraron en cajas de Petri con 25 mL de medio. Tras una incubación de 48 h a 27°C se realizó el conteo de colonias y se documentó en fotografía a las 72 h para una mejor apreciación.

6.11 Estrés oxidante

6.11.1 Micelio

Para evaluar la resistencia al estrés oxidante se trabajó con cuentas controladas de conidios recién colectados de medio solido Power de 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 esporas/mL de las cepas *P. chrysogenum* Wis 54-1255, *P. chrysogenum* pGdpki-RNAi y del lote de silenciados con el plásmido pGdpki-RNAi/*PcHog*. En una placa de bioensayo con medio PDA se inocularon 5 µL de cada una de las cepas, por duplicado, manteniendo una distancia de 5 cm entre inóculos. Las cuentas fueron previamente tratadas durante 10 min con una concentración de 100, 150 y 200 mM de H₂O₂; una vez secas, las muestras se incubaron a 27°C durante 120 h, monitoreando cada 24 h para determinar su resistencia al estrés oxidante. Los controles de las cepas se trataron con solución salina al 0.9%.

6.11.2 Conidios

Se evaluó la resistencia sobre conidios de las transformantes y de las cepas *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y *P. chrysogenum* pGdpki-RNAi al estrés oxidante, con una concentración de 100 mM de H₂O₂. Se emplearon 50 µL de una cuenta 1×10³ esporas/mL de todas las cepas, sembradas en cajas de Petri con 25 mL de medio PDA. Previo a la siembra los conidios fueron tratados con 100 mM de H₂O₂ durante 10 min. Los controles de las cepas se trataron con solución salina al 0.9%. Tras una incubación de 48 h a 27°C se realizó el conteo de colonias y se documentó en fotografía a las 72 h para una mejor apreciación.

6.12 Silenciamiento del gen Pc13g11680

6.12.1. Plásmido empleado para el silenciamiento

En la Figura 12 se puede apreciar el plásmido pGdpPki-RNAi empleado para el silenciamiento, contiene el promotor de la glutamato deshidrogenasa (Pgdh) de *Aspergillus awamori* acoplado al gen de resistencia a fleomicina (*ble*) y el terminador de la citocromo oxidasa (Tcyc) de *S. cerevisiae*. También contiene los promotores de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Pgpd*) y *pki* (piruvato cinasa) enfrentados en dirección opuesta y separados por un sitio de restricción *NcoI*.

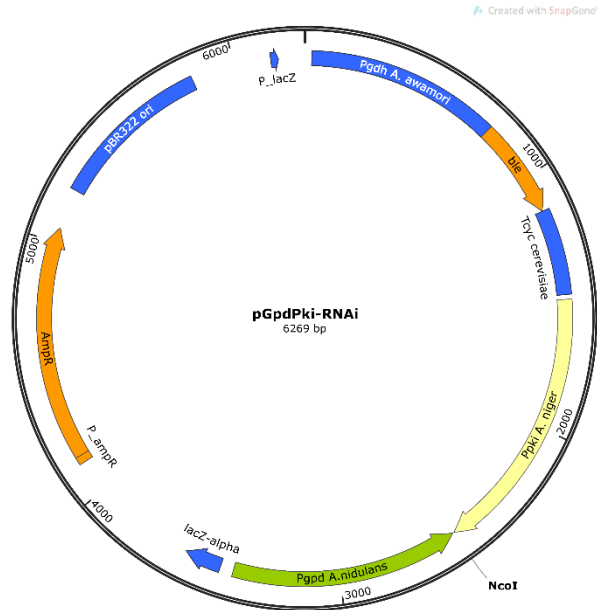


Figura 12. Plásmido pGpdPki-RNAi.

6.13.2. Extracción de ADN de *P. chrysogenum*

Para la extracción de ADN de la cepa *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y de las transformantes se recurrió a un equipo Mini-Beadbeater-16 cell disrupter (Biospec) para la rotura celular. Posteriormente se empleó el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) para la purificación del ADN.

6.13.3. PCR para la obtención del fragmento del gen *Pc13g11680 (PcHog)*

Para la obtención de los fragmentos de los genes a clonar en el plásmido pGpdPki-RNAi se utilizó la enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Los oligos empleados para la PCR se pueden apreciar en la Tabla 8. Se obtuvieron fragmentos con una longitud de 569 pb, la purificación de estos se realizó con el kit Illustrat™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences).

Tabla 8. Oligos diseñados para amplificar el fragmento del gen clonado en el plásmido pGpdPki-RNAi

Gen	Oligonucleótido	Tamaño de amplicón (pb)
Pc13g11680	ACACCATGGCTGACCTCCACCGACTTCTTACTT ACTCCATGGGAAGCTTGAATGCGTTGCTTTG	569

6.13.4. Digestión con *NcoI*

El plásmido pGpdPki-RNAi cuenta con un sitio de corte para la enzima *NcoI*. Los oligos obtenidos en la Tabla 8 fueron diseñados de tal manera que presentan un sitio de corte para la enzima *NcoI*. Tanto el plásmido como el producto de PCR fueron digeridos con la enzima *NcoI* (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el producto de PCR y plásmido digeridos fueron purificados mediante el kit illustra™ GFX™ PCR-DNA and Gel Band Purificación Kit (GE Healthcare Life Sciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.13.5. Ligación del plásmido con el fragmento del gen Pc13g11680

El vector y los insertos se ligaron utilizando la enzima ligasa T4 DNA Ligase (Roche Life Science) en un volumen de 10 µL con una incubación a 4°C durante toda la noche.

6.13.6. Transformación en *E. coli*

Para la transformación y amplificación del ADN plasmídico se empleó la cepa de *Escherichia coli* DH5α. En un primer paso, las células competentes fueron descongeladas en hielo, seguido de esto se añadió al tubo la reacción de ligación y se incubó en hielo durante 30 minutos, posteriormente se aplicó choque térmico a 42°C durante 45s, después se añadieron 400 mL de medio LB (Tabla 9) y se incubó 1 h a 37°C en agitación (250 rpm). Finalmente, las células fueron sembradas en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina e incubadas durante 16 h a 37°C.

Tabla 9. Composición del medio Luria-Bertani (LB)

Bactotripton	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada	1 000 mL

6.13.7. Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de plásmidos en bajas cantidades se tomó una colonia y se inoculó en un tubo de 1.5 mL que contenía 1mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), se incubó por 12 h a 37°C en agitación (250 rpm). Los tubos fueron centrifugados a 13 000 rpm durante 1 min, el sobrenadante fue retirado y el pellet fue resuspendido tras la adición de 200 µL de STET (Tabla 10) y 3 µL de lisozima (50 mg/mL). Los tubos fueron colocados 40 s en agua hirviendo y posteriormente centrifugados durante 15 min a 13 000 rpm, los restos celulares precipitados fueron eliminados con un palillo. 200 µL de isopropanol fueron adicionados a los tubos y se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente durante 5 min, después se centrifugaron a 13 000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 µL de agua miliQ.

Tabla 10. Composición de STET

Sacarosa	8 %
Triton X-100	0.5 %
EDTA	50 mM
Tris HCL, pH 8	10 mM

6.13.8. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de plásmidos a mediana escala se realizó utilizando el kit QIAGEN® Plasmid Midi Kit, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.13.9. Obtención de protoplastos de *P. chrysogenum*

Para la obtención de protoplastos se inocularon esporas en 100 mL de medio PMMY durante 18 h a 25°C en agitación (250 rpm). El micelio obtenido se filtró (Nytal) y se lavó con solución salina al 0.9%. Dos gramos de micelio fueron colocados en un matraz de 250 mL con 10 mL de TPP y 10 mL de una solución de enzimas líticas (Sigma-Aldrich), en una concentración de 10 mg/mL, la mezcla se incubó 2 h a 28°C en agitación (75 rpm). La mezcla anterior se filtró (Nytal) y el efluente se colectó para una centrifugación a 2 000 rpm durante 5 min, el pellet se resuspendió dos veces en 5 mL de amortiguador KCM para dos lavados con centrifugación a 2 000 rpm durante 5 min. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en una mezcla de 200 µL de amortiguador KCM con 20 µL de amortiguador PCM.

Tabla 11. Composición de amortiguadores

Amortiguador TPP	K ₂ HPO ₄	50 mM
	KCl	0.7 M
Amortiguador KCM	KCl	0.7 M
	CaCl ₂	50 mM
	MES	10 mM
	pH	5.8
Amortiguador PCM	CaCl ₂	50 mM
	Polietilenglicol 6 000	50%
	MES	10 mM
	pH	5.8

6.13.10. Transformación de *P. chrysogenum*

En un tubo de 1.5 mL se adicionaron 100 µL de suspensión de protoplastos y 5-10 µg de vector de silenciamiento. En otro tubo se preparó una mezcla idéntica sin ADN control. Las suspensiones se incubaron 20 min en hielo. Posteriormente, se agregaron a cada uno de los tubos 500 µL de amortiguador PCM y se incubó a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 600 µL de amortiguador KCM y se mezcló suavemente. Finalmente, se mezcló la reacción de transformación

con 10 mL de medio Czapek suplementado con sorbitol 1 M y fleomicina (30 µg/mL), la mezcla se vertió en placas base de Czapek/Sorbitol 1 M y se dejó en incubación a 27°C hasta la aparición de colonias.

6.13.11. Confirmación de transformantes de *P. chrysogenum*

Para la comprobación del silenciamiento mediante PCR se realizó una extracción de ADN genómico de las cepas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, *P. chrysogenum* pGdpki-RNAi y del lote de silenciados con el plásmido pGdpki-RNAi/*PcHog*.

Se verificó la calidad del ADN genómico en una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se prepararon las mezclas de PCR con 50 ng de ADN genómico de la cepa control negativo *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, ADN cepa control positivo transformante *P. chrysogenum* con pGdpki-RNAi, el control positivo plásmido purificado y vacío pGdpki-RNAi y el ADN de las cepas silenciadas con plásmido pGdpki-RNAi/*PcHog*, usando los oligonucleótidos de la Tabla 12.

Tabla 12. Oligos empleados para la confirmación de transformantes

Pki1(gpd1)F: TCTCTCTTCTCTCGCTCAC
Gpd1(pki1)R: TACTCCATCCTTCCCATCC

Se empleó la enzima *Taq* DNA polimerasa para la amplificación con una temperatura de hibridación de 60°C y 1 minuto de extensión. Las reacciones de PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7. Resultados y discusión

7.1 Confirmación de transformantes

Para la selección de cepas a trabajar, se realizó una PCR de punto final buscando tamaños de bandas específicos: para el caso del plásmido purificado y vacío se buscó una banda de alrededor de 251 pb y en el caso de las transformantes se examinó a las seis candidatas buscando la presencia de una banda de alrededor de 820 pb, debido a que es el tamaño del plásmido con el inserto. La Figura 13 corresponde a la PCR realizada, se pueden observar bandas cercanas a los 251 pb en los carriles correspondientes a la cepa pGdpki-RNAi y al plásmido. El resto de los carriles corresponden a las transformantes de las cuales solo PcHog1, PcHog2 y PcHog5 presentan bandas de alrededor de 820 pb, por lo que se decidió utilizar estas cepas para los experimentos posteriores.

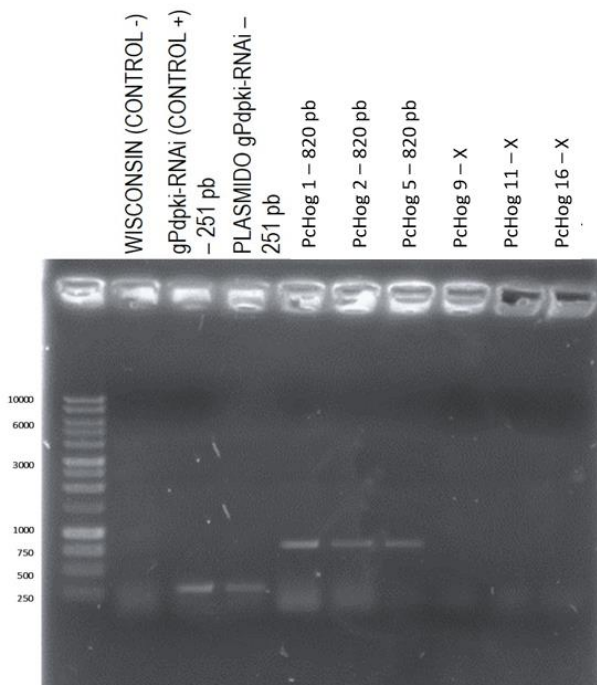


Figura 13. Comprobación de transformantes.

7.2 Interactoma *in silico*

Con la finalidad de identificar posibles interacciones con PcHog, se realizó un análisis *in silico* utilizando el programa STRING (11.5). El diagrama de interacción se muestra en la Figura 14, se puede observar un alto grado de conectividad, lo que demuestra su participación en múltiples procesos. Para conocer qué tipo de función celular llevan a cabo las proteínas que se encuentran relacionadas con PcHog, se elaboró un análisis funcional por GO Slim de las 50 proteínas relacionadas con PcHog.

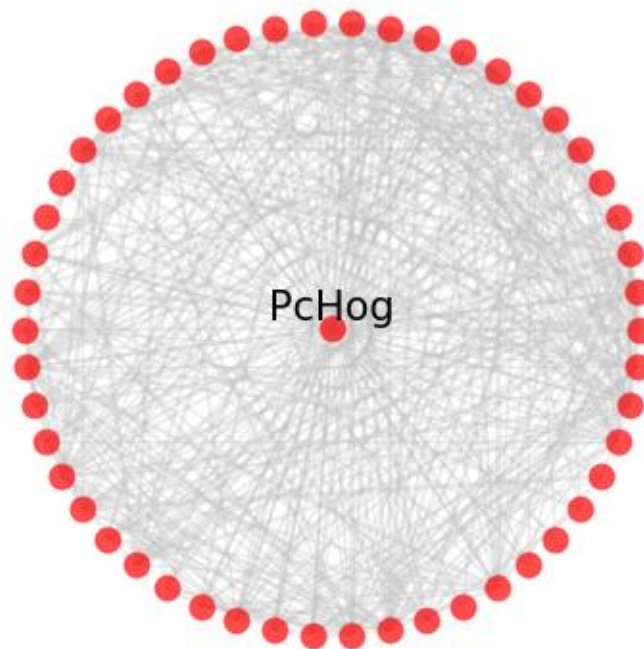


Figura 14. Interactoma *in silico* utilizando la base de datos STRING.

Uno de los términos más representados dentro de los procesos biológicos es “**cellular protein modification process**” (GO:0006464), el cual es definido por “QuickGo” como modificaciones cotraduccionales o postraduccionales covalentes de uno o más aminoácidos que se producen a nivel celular individual. El segundo

término más sobrerrepresentado fue **“regulation on biological process” (GO:0050789)**, que está definido como cualquier proceso que modula la frecuencia, velocidad o extensión de un proceso biológico. Dentro de estos procesos se encuentran el control de la expresión génica, las modificaciones que pueden sufrir algunas proteínas o las interacciones que pueden tener las mismas con sus sustratos. El tercer término más sobrerrepresentado es **“signal transduction” (GO:0007165)**, y es definido como el proceso celular en el que se transmite una señal para desencadenar un cambio en la actividad o el estado de una célula. La transducción de señales es una definición amplia que incluye un ligando que interactúa con un receptor, pasos de señalización corriente abajo y una respuesta desencadenada. En muchos casos, el final de este proceso es la regulación del inicio de la transcripción. Otros términos con menor sobrerrepresentación fueron *“reponse to chemical”*, *“response to stress”*, *“transport”*, *“cell cycle”*, *“RNA metabolic process”* y *“protein folding”* (Figura 15).

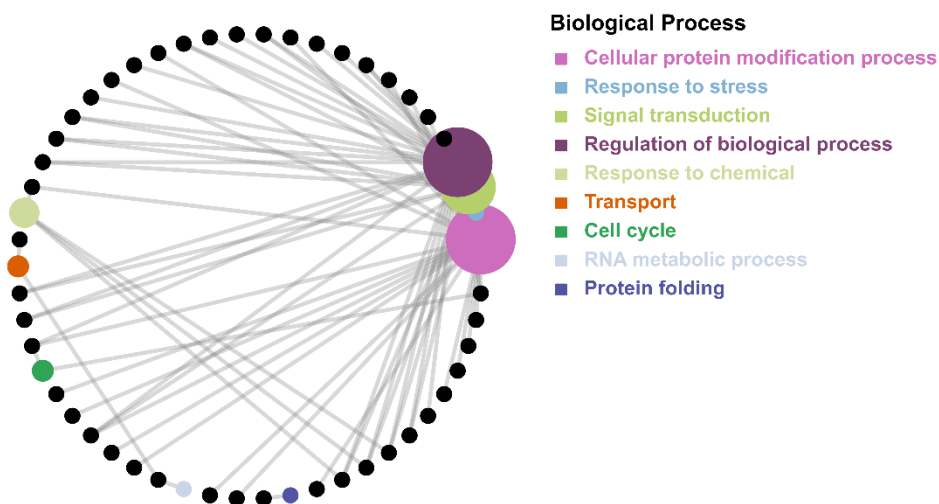


Figura 15. Proceso biológico en el que participan proteínas que interactúan con PcHog.

Se encontraron múltiples funciones moleculares dentro del mismo grupo de proteínas, uno de los términos más representados fue **“hydrolase activity” (GO:0016787)**, que se define como la catálisis de la hidrólisis de enlaces del tipo CO, CN, CC y enlaces anhídrido fosfórico, entre otros. La actividad hidrolasa incluye cualquier enzima de clase 3. El segundo término más sobrerrepresentado fue **“transferase activity” (GO:0016740)**, cuya definición señala la catálisis de la transferencia de grupos (acilo, metilo, etcétera) de un compuesto considerado como donante a otro compuesto considerado como aceptor. La actividad de transferasa engloba a cualquier enzima de la clase 2. El tercer término más sobrerrepresentado es **“protein kinase activity” (GO:0004672)**, que se encuentra definido como la catálisis de la fosforilación de un residuo de aminoácido en una proteína, en un proceso que involucra la participación de ATP. Otras funciones moleculares menos representadas se aprecian en la Figura 16.

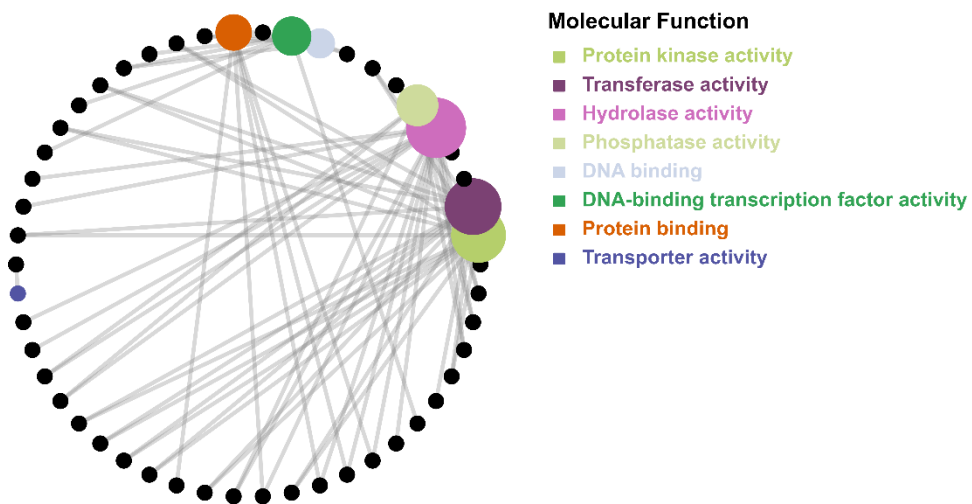


Figura 16. Función molecular de las proteínas que interactúan con PcHog.

Se puede obtener un mejor panorama espacial de un proceso si se conoce la localización de las proteínas y su participación en complejos moleculares. Se identificaron un total de cuatro compartimentos celulares (“*nucleus*”, “*membrane*”, “*membrane plasma*” y “*chromosome*”), de los cuales “*nucleus*”, y “*membrane*” fueron los más sobrerrepresentados (Figura 17).

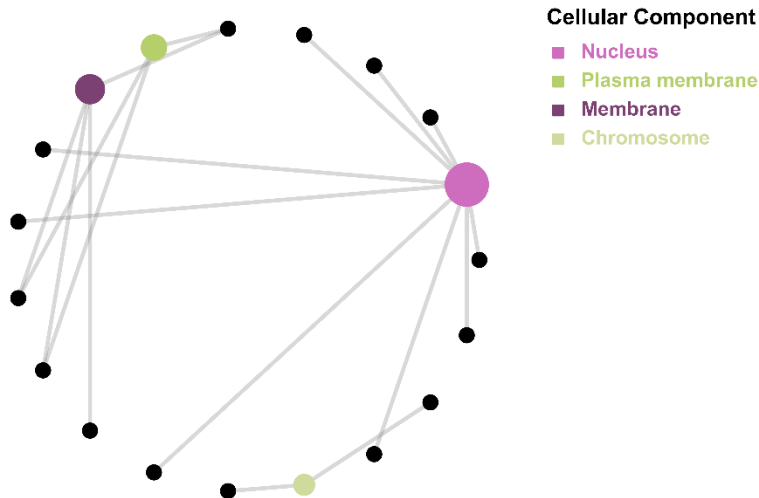


Figura 17. Componente celular donde se localizan las proteínas que interactúan con PcHog.

7.3 Estrés osmótico

Se llevó a cabo un ensayo de estrés osmótico, de acuerdo con la metodología descrita en el punto 6.10.1. A continuación se pueden observar un total de cuatro placas de bioensayo con diferentes concentraciones de sorbitol monitoreadas cada 24 h. A lo largo de los días se puede apreciar la susceptibilidad del micelio al estrés provocado por la creciente concentración de sorbitol en el medio, se puede percibir un aumento en el diámetro y la conidiación (a partir de las 72 h) de las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi conforme aumentó la concentración de sorbitol. Este efecto se presentó de manera casi imperceptible en las

transformantes PcHog1 y PcHog2. Como características distintivas PcHog1 y PcHog2 presentaron un color blanco que perduró durante las 120 h de duración del ensayo, mientras que las cepas control comenzaron a presentar su pigmentación verde característica a partir de las 72 h, además, en el control positivo se observó un pigmento amarillo a las 120 h. Un caso particular se presentó en la cepa PcHog5, ya que todas sus características resultaron ser idénticas a los controles, por lo que se decidió descartar dicha cepa en los ensayos posteriores.

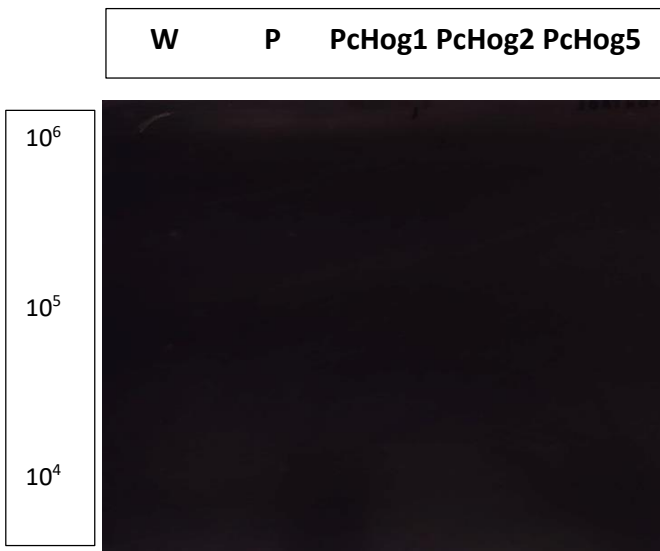


Figura 18. 0 M sorbitol (24 h)

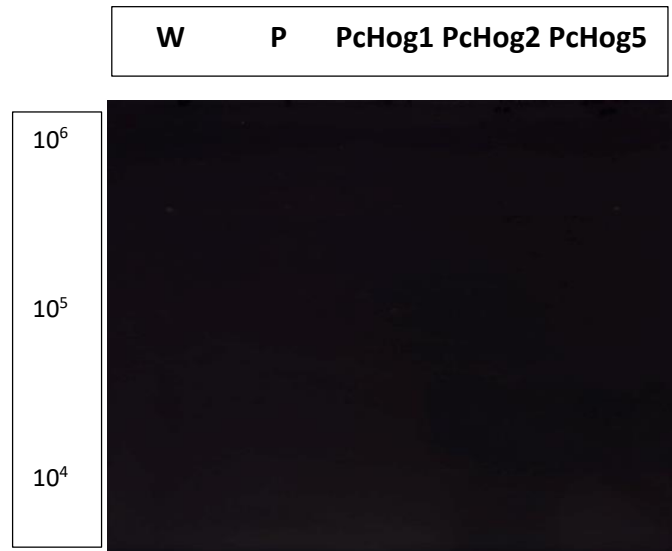


Figura 19. 0.4M sorbitol (24 h)

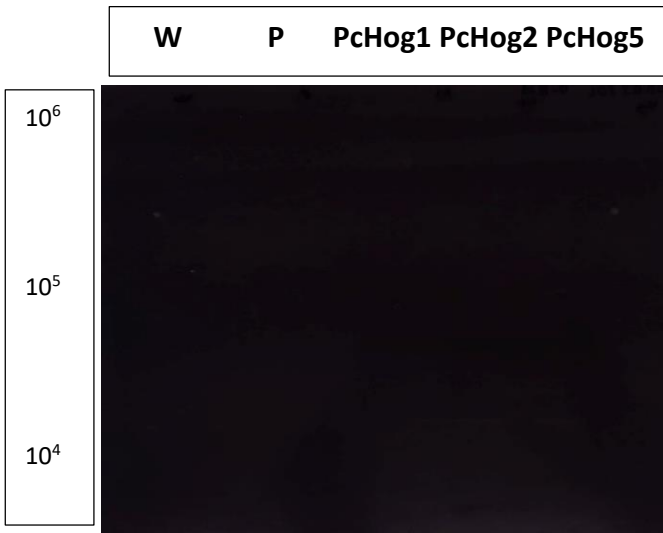


Figura 20. 0.8M sorbitol (24 h)

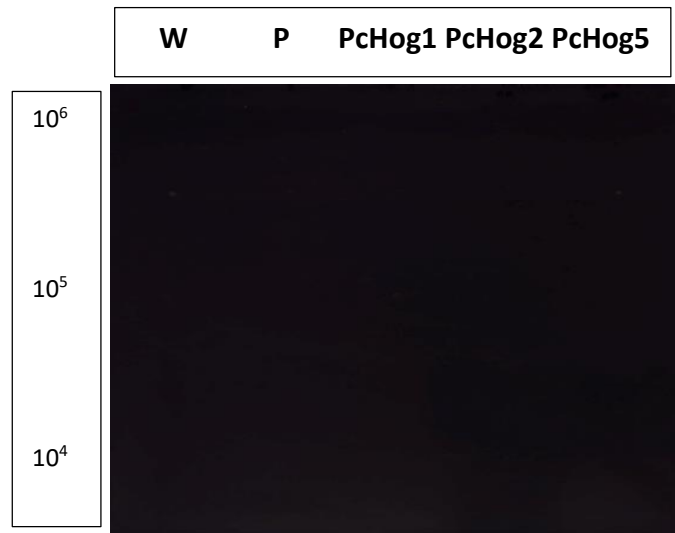


Figura 21. 2M sorbitol (24h)

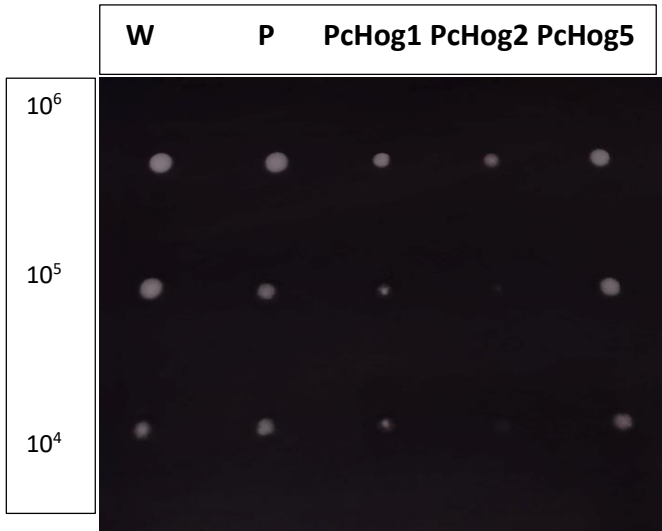


Figura 20. 0 M sorbitol (48 h)

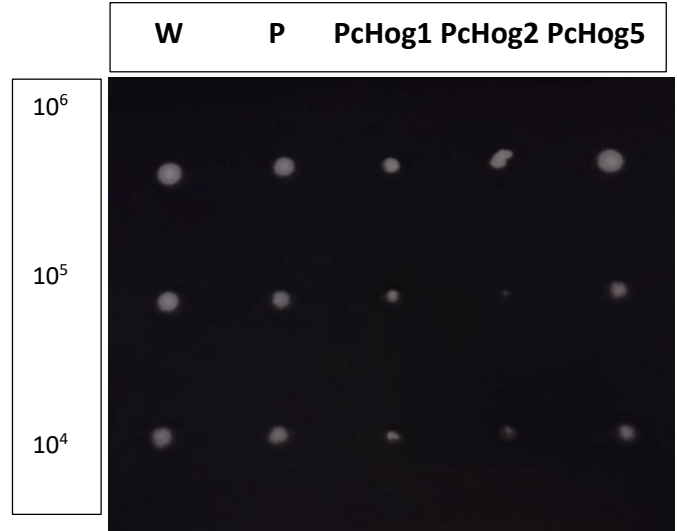


Figura 21. 0.4 M sorbitol (48 h)

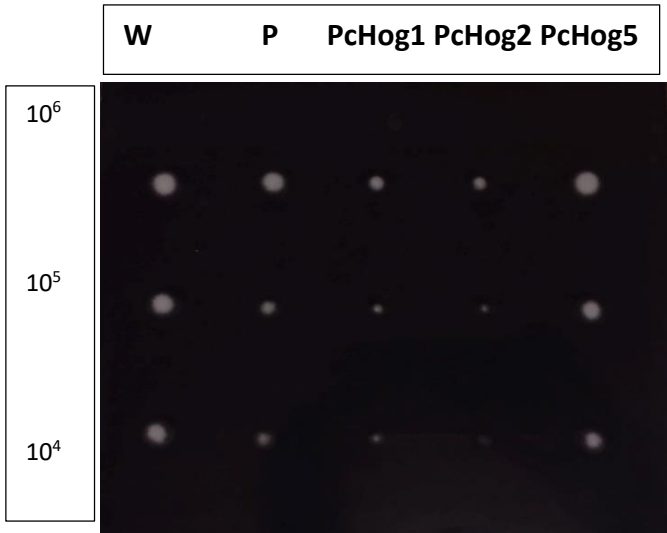


Figura 24. 0.8 M sorbitol (48 h)

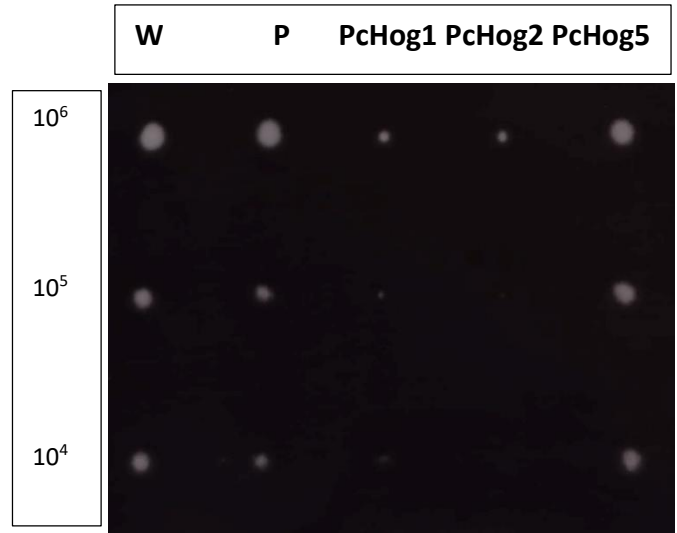


Figura 25. 2 M sorbitol (48 h)

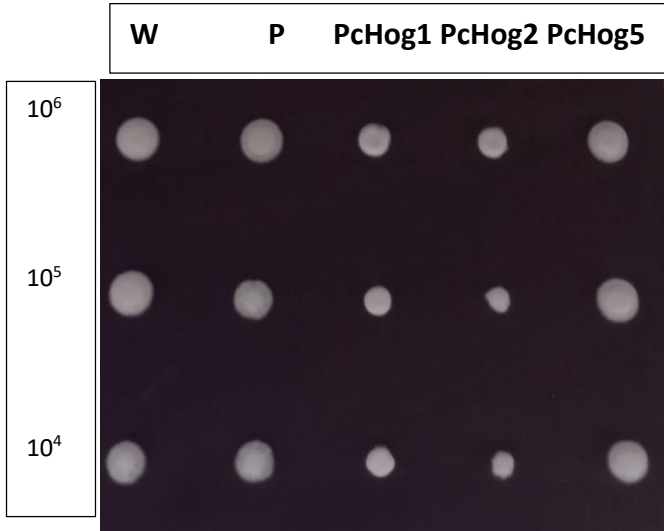


Figura 22. 0 M sorbitol (72 h)

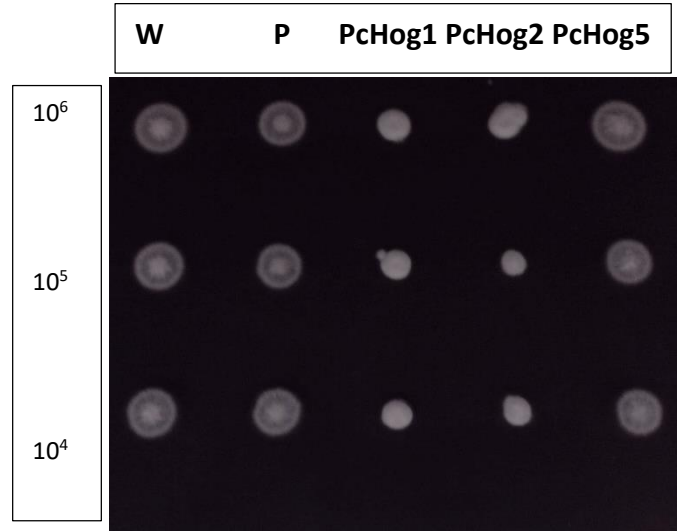


Figura 23. 0.4 M sorbitol (72 h)

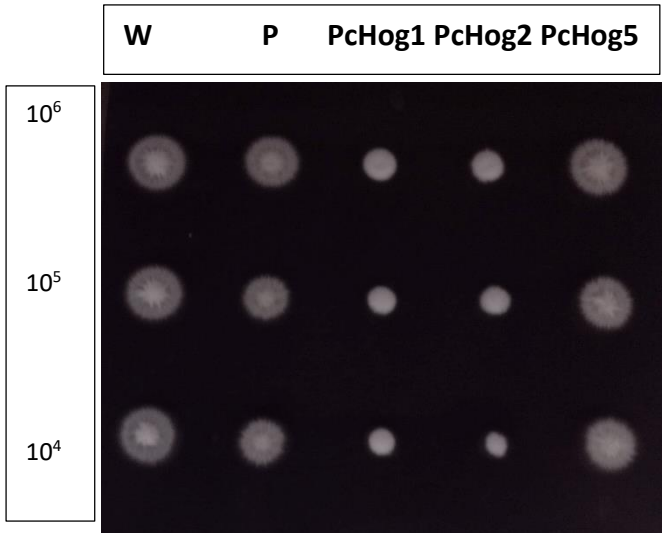


Figura 28. 0.8 M sorbitol (72 h)

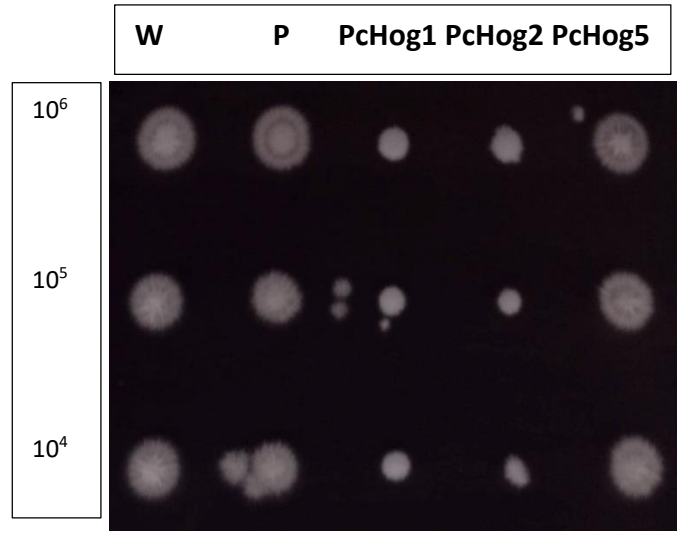


Figura 29. 2 M sorbitol (72 h)

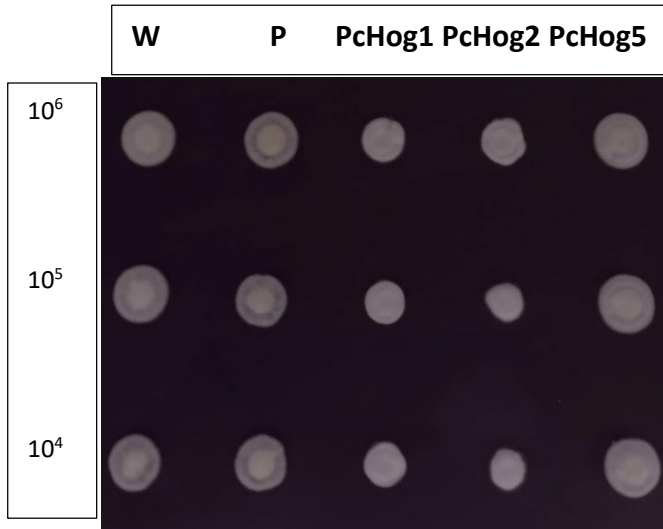


Figura 24. 0 M sorbitol (96 h)

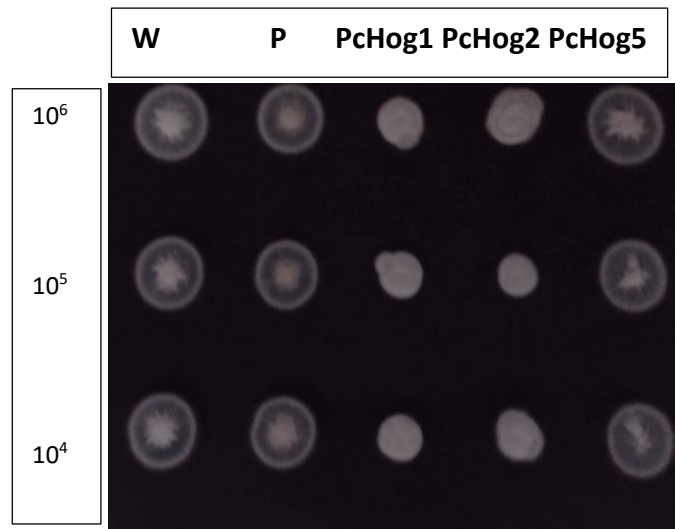


Figura 25. 0.4 M sorbitol (96 h)

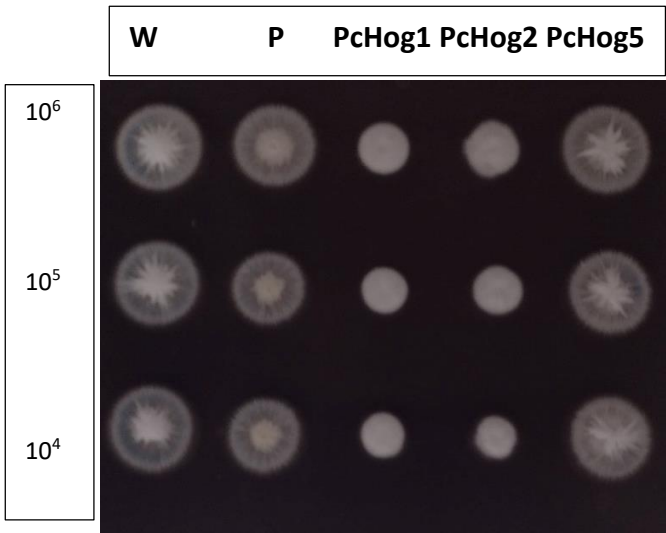


Figura 32. 0.8 M sorbitol (96 h)

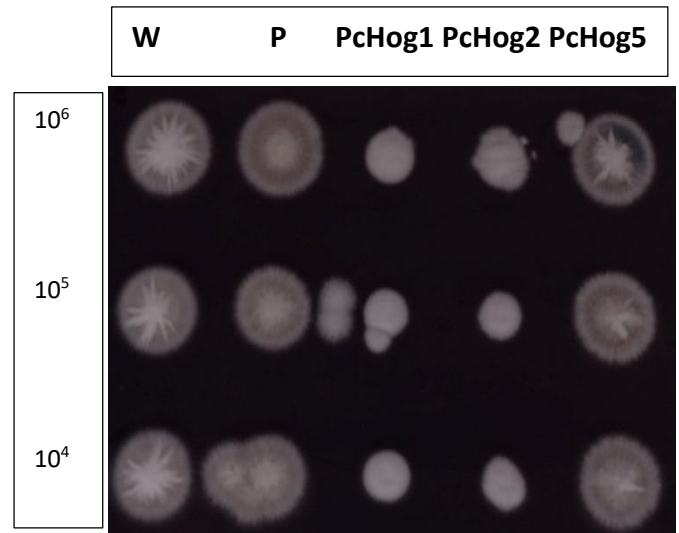


Figura 33. 2 M sorbitol (96 h)

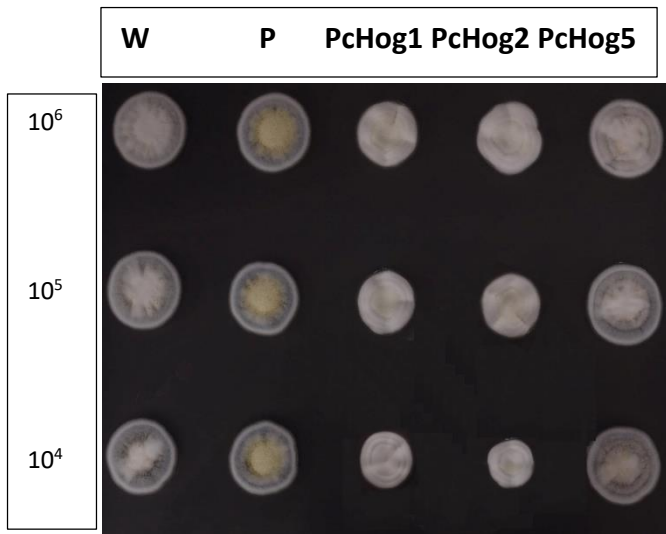


Figura 26. 0 M sorbitol (120 h)

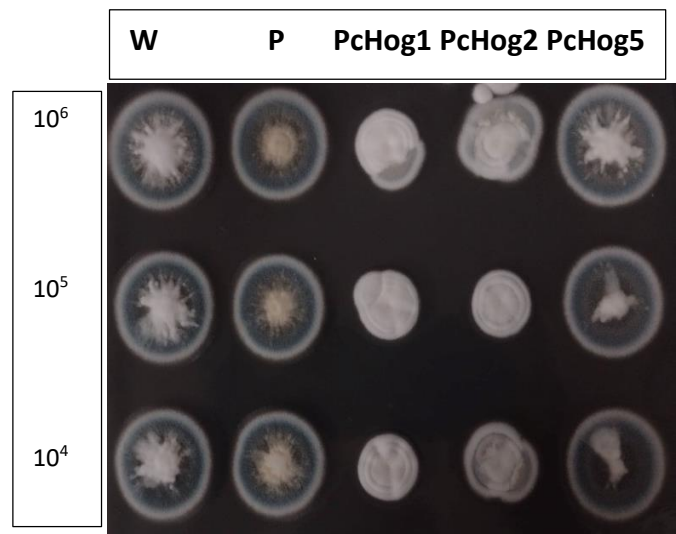


Figura 27. 0.4 M sorbitol (120 h)

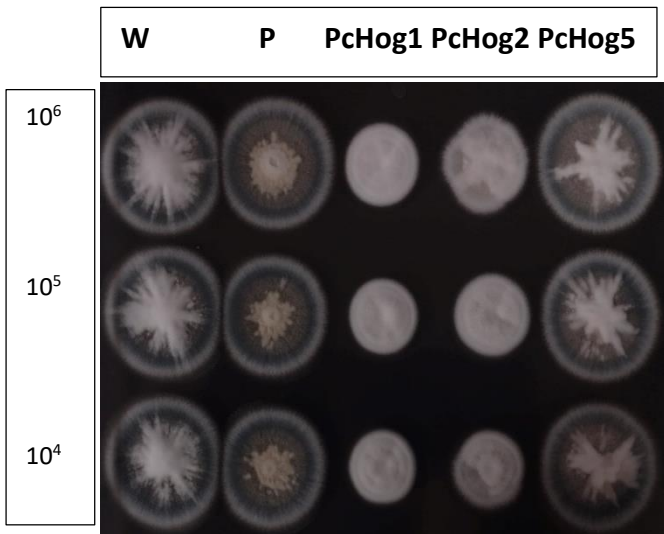


Figura 36. 0.8 M sorbitol (120 h)

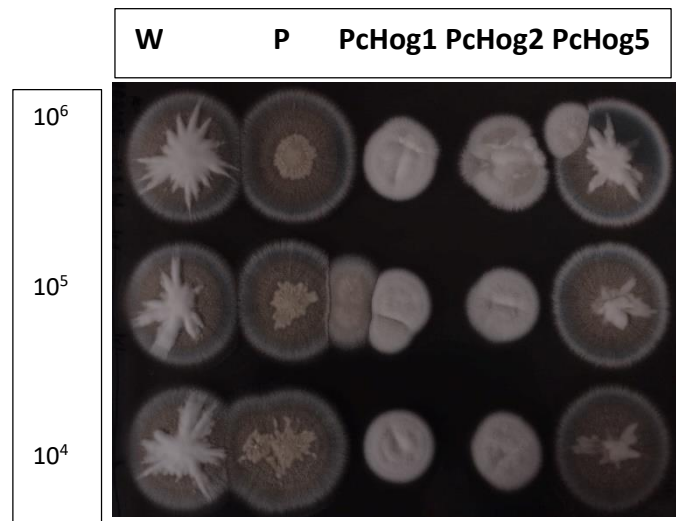


Figura 37. 2 M sorbitol (120 h)

La prueba de estrés osmótico con sorbitol sobre conidios reveló que no existen diferencias significativas de las transformantes con respecto a las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi (Figura 38). La Figura 39 es una fotografía de los ensayos de estrés osmótico y oxidante a las 72 h y aunque no existen diferencias significativas, se observa que las colonias de las transformantes son ligeramente más grandes a su control sin tratamiento, pero más pequeñas respecto al control positivo y negativo. Los resultados a nivel de micelio y conidios muestran que tras el silenciamiento del gen Pc13g11680, las transformantes no son capaces de reaccionar al estrés osmótico como lo harían en condiciones nativas.

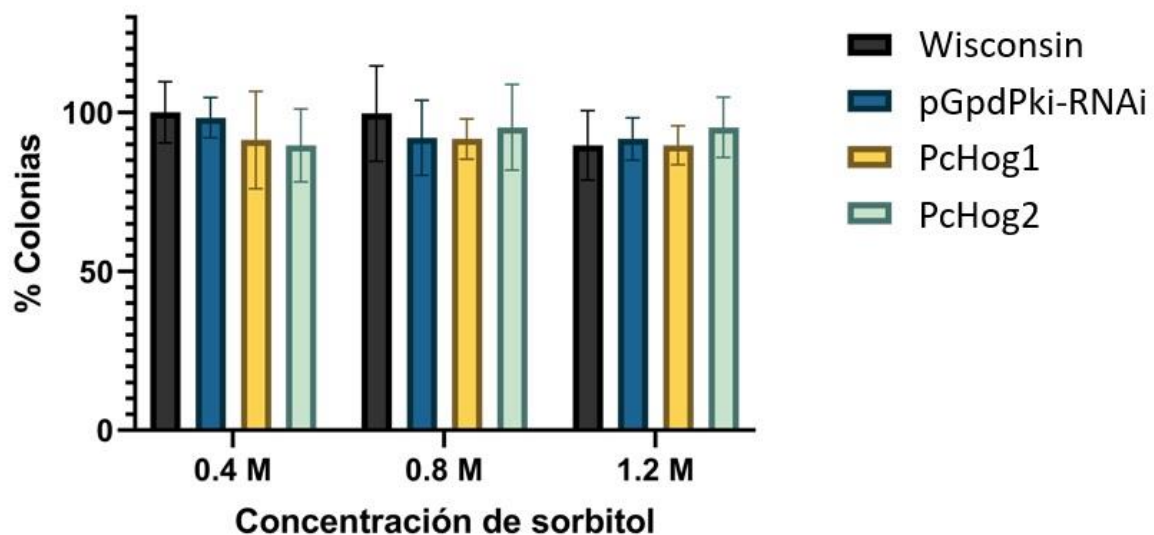


Figura 28. Prueba de estrés osmótico sobre conidios empleando tres diferentes concentraciones de sorbitol

Sin diferencias significativas con respecto a la cepa Wisconsin. Two way ANOVA asumiendo distribución normal e igualdad de varianzas con $p < 0.05$

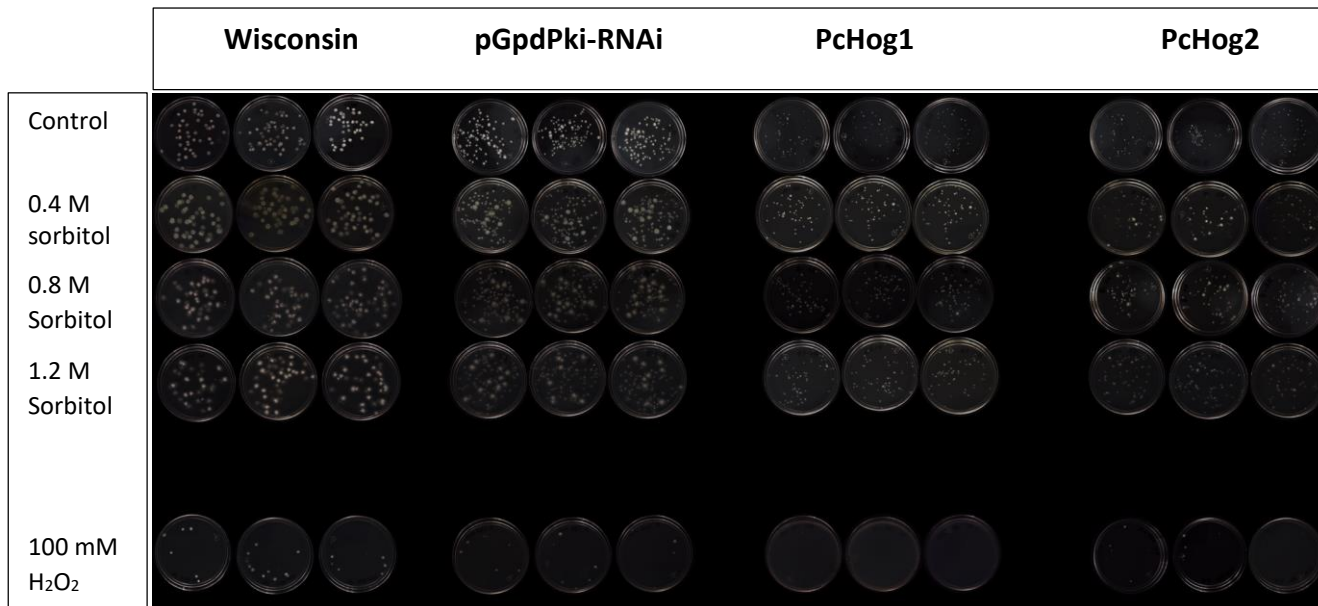


Figura 29. prueba de estrés osmótico y oxidante sobre conidios (72 h).

7.4 Estrés oxidante

Se llevó a cabo el ensayo de estrés oxidante, de acuerdo con la metodología descrita en el punto 6.11.1. A continuación se pueden observar un total de cuatro placas de bioensayo monitoreadas cada 24 h. A las 120 h se puede apreciar una mayor extensión del micelio en las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi, en comparación con las silenciadas PcHog1 y PcHog2. En esas dos mutantes se puede apreciar un color blanco que perduró durante las 120 h de duración del ensayo, mientras que las cepas control comenzaron a presentar su pigmentación verde característica desde las 72 h. Las transformantes resultaron afectadas por el estrés provocado por el incremento de la concentración de H₂O₂ con respecto a los controles Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi. Este efecto se puede observar con mayor claridad al comparar las cuatro placas en un tiempo de 48 y 72 h, ya que se observa el desarrollo del micelio producto de los conidios que sobrevivieron

al tratamiento. De manera general se puede observar que las orillas del micelio en todas las cepas parecen tener dificultades para crecer de manera uniforme.

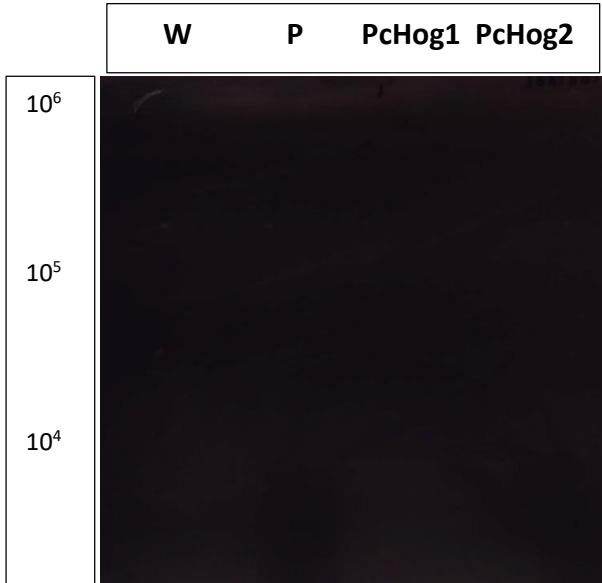


Figura 30. 0 mM H₂O₂ (24 h)

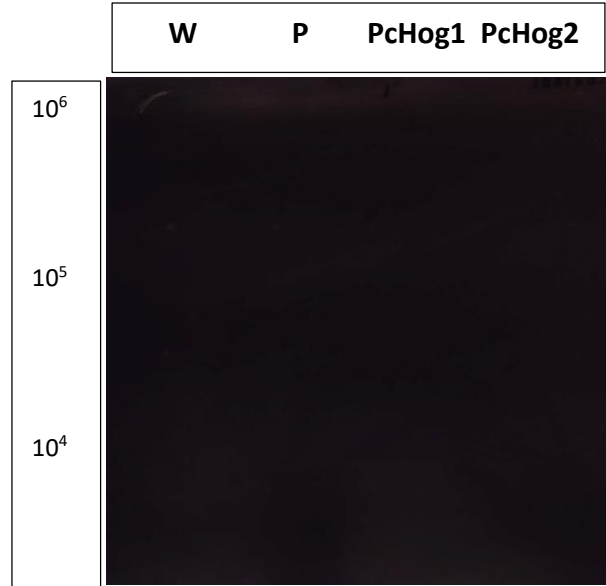


Figura 31. 100 mM H₂O₂ (24 h)

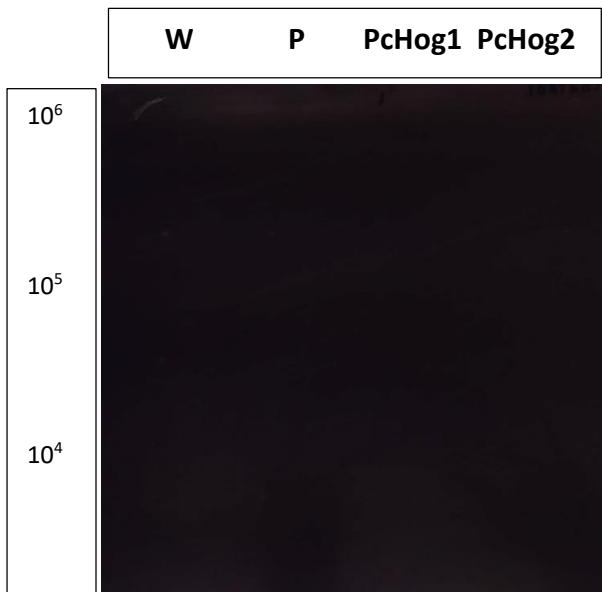


Figura 42. 150 mM H₂O₂ (24 h)

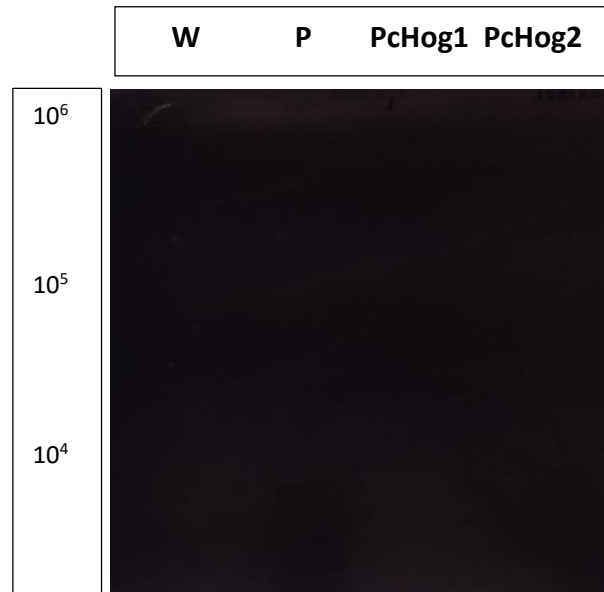


Figura 43. 200 mM H₂O₂ (24h)

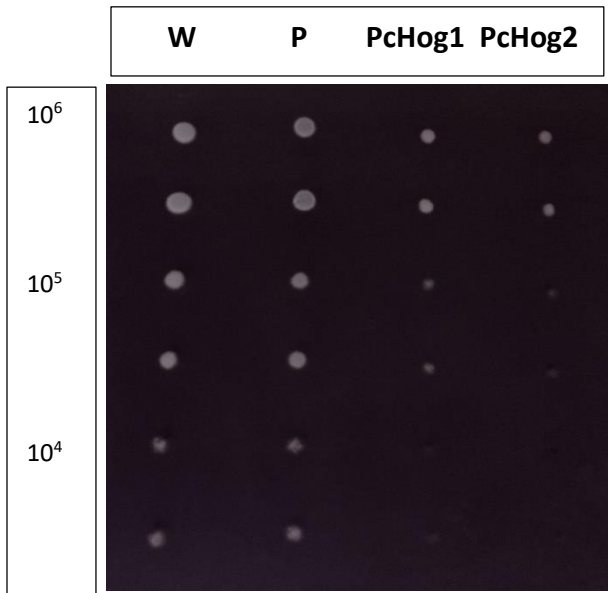


Figura 32. 0 mM H₂O₂ (48 h)

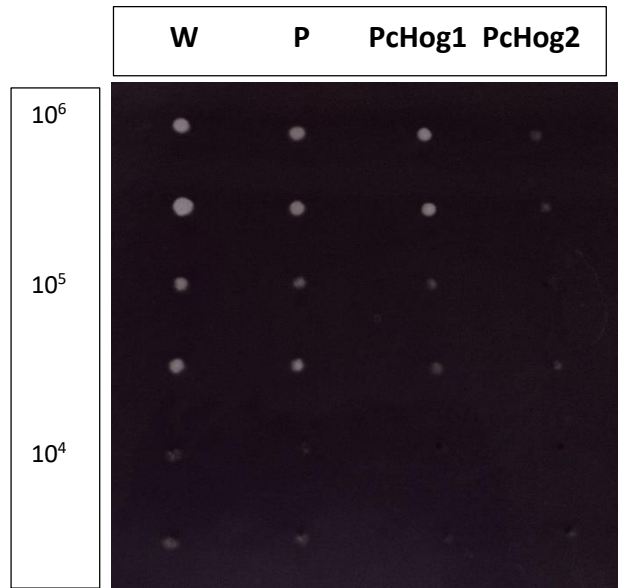


Figura 33. 100 mM H₂O₂ (48 h)

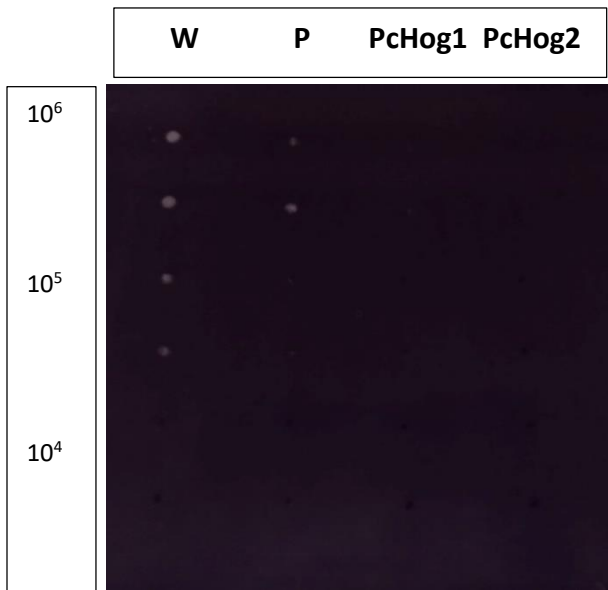


Figura 34. 150 mM H₂O₂ (48 h)

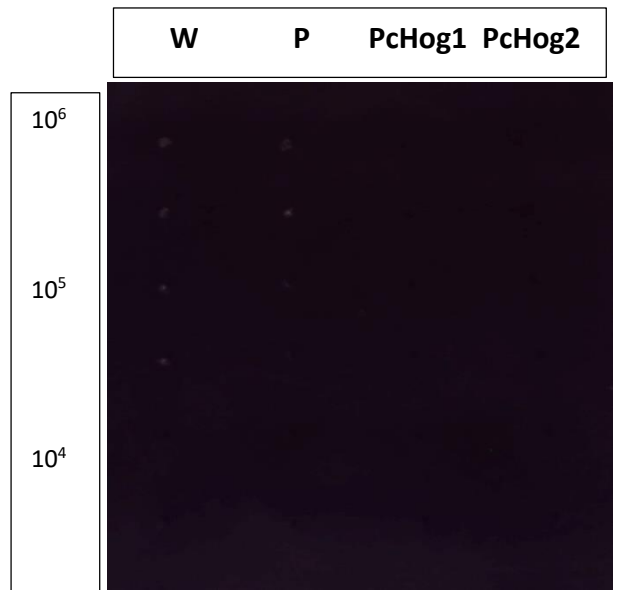


Figura 35. 200 mM H₂O₂ (48 h)

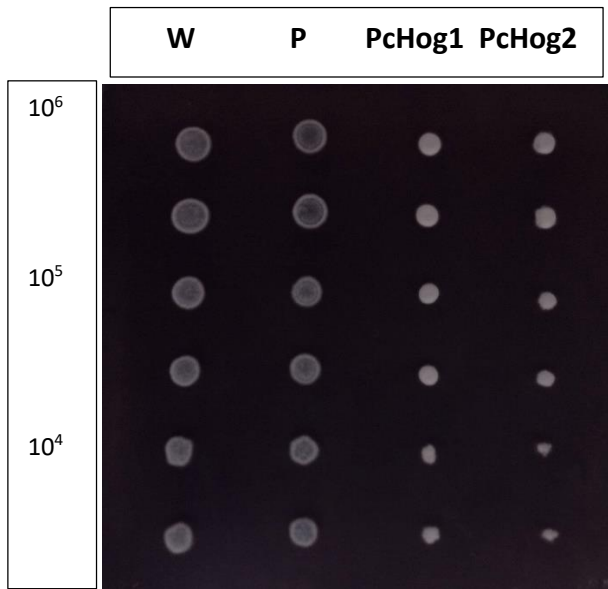


Figura 36. 0 mM H₂O₂ (72 h)

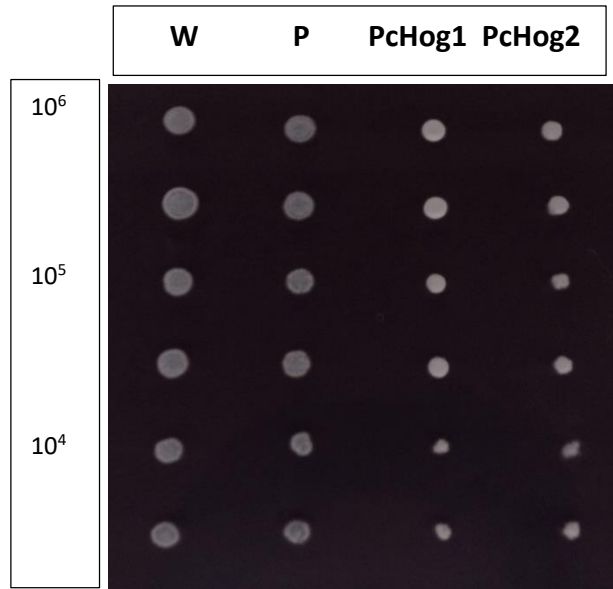


Figura 37. 100 mM H₂O₂ (72 h)

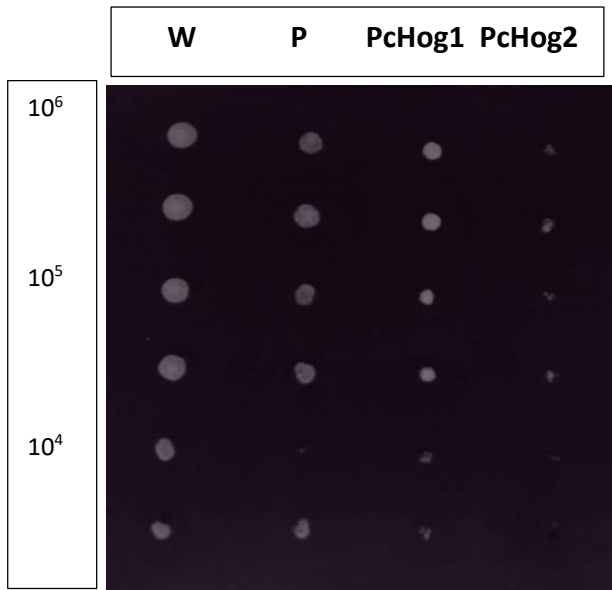


Figura 38. 150 mM H₂O₂ (72 h)

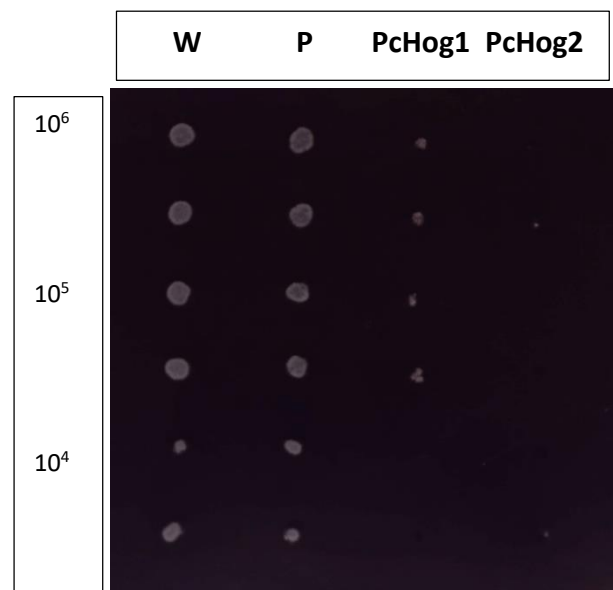


Figura 39. 200 mM H₂O₂ (72 h)

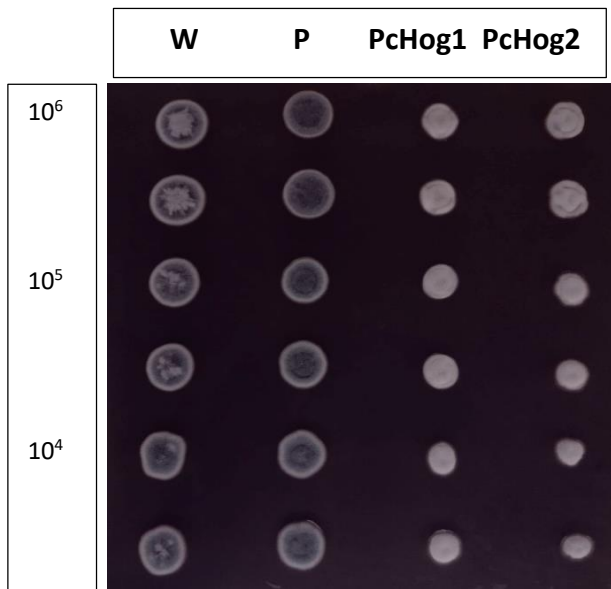


Figura 40. 0 mM H₂O₂ (96 h)

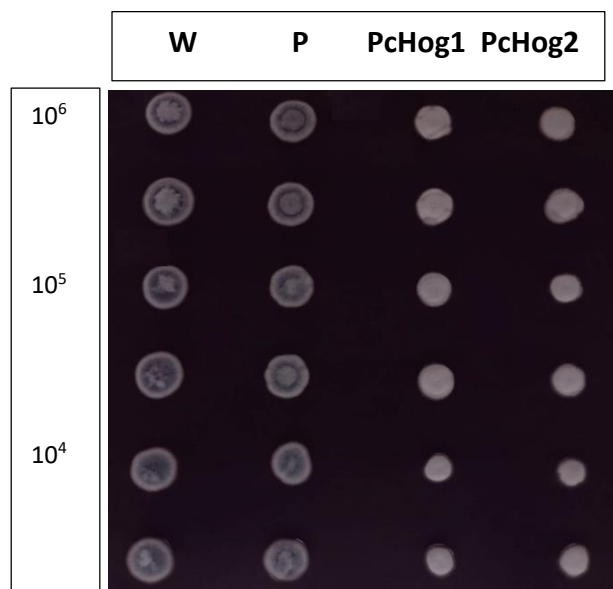


Figura 41. 100 mM H₂O₂ (96 h)

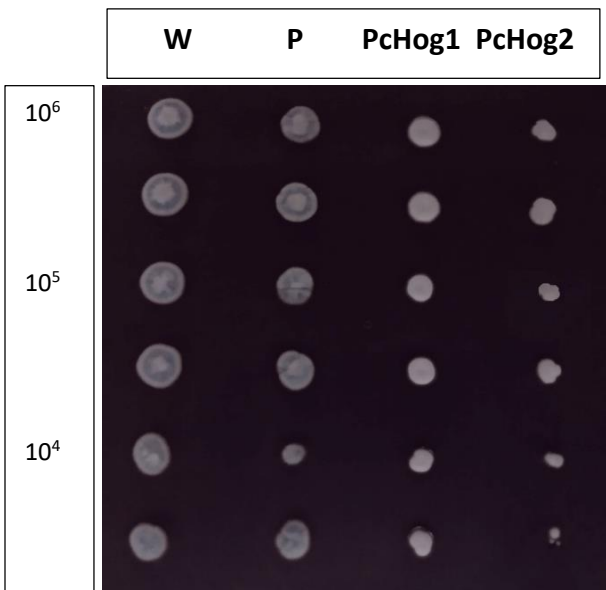


Figura 42. 150 mM H₂O₂ (96 h)

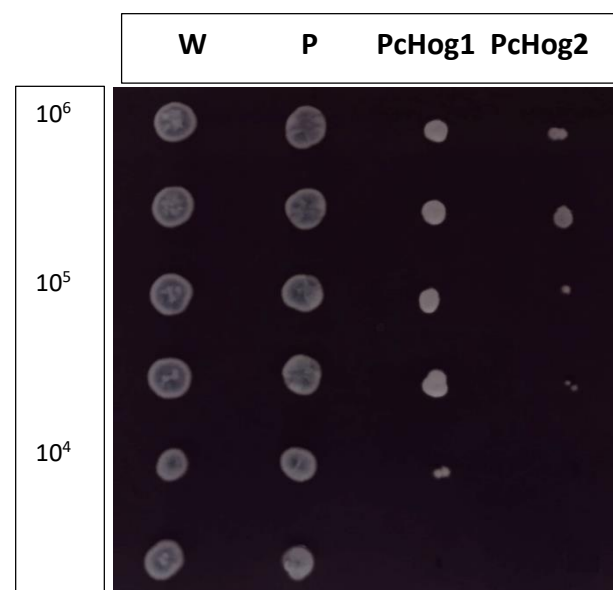


Figura 43. 200 mM H₂O₂ (96 h)

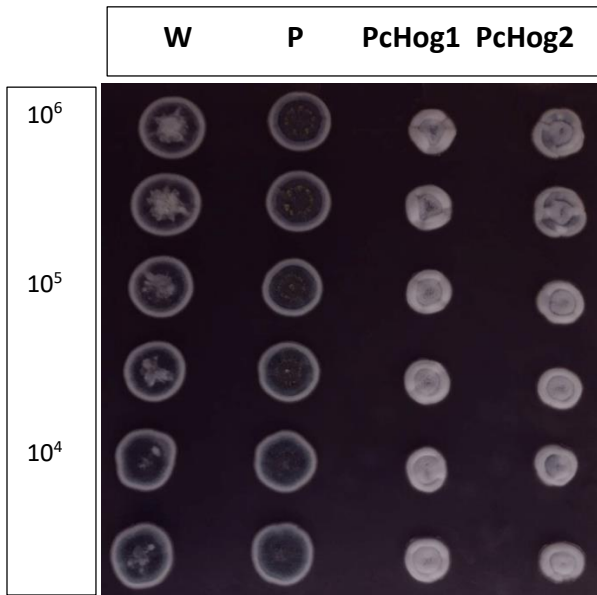


Figura 44. 0 mM H₂O₂ (120 h)

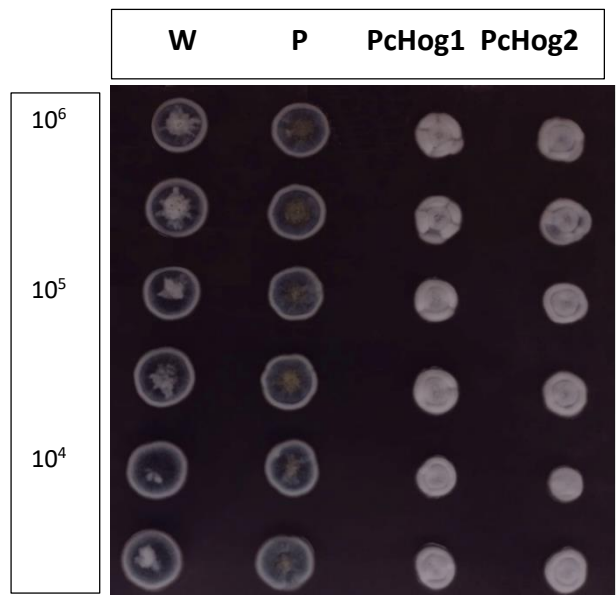


Figura 45. 100 mM H₂O₂ (120 h)

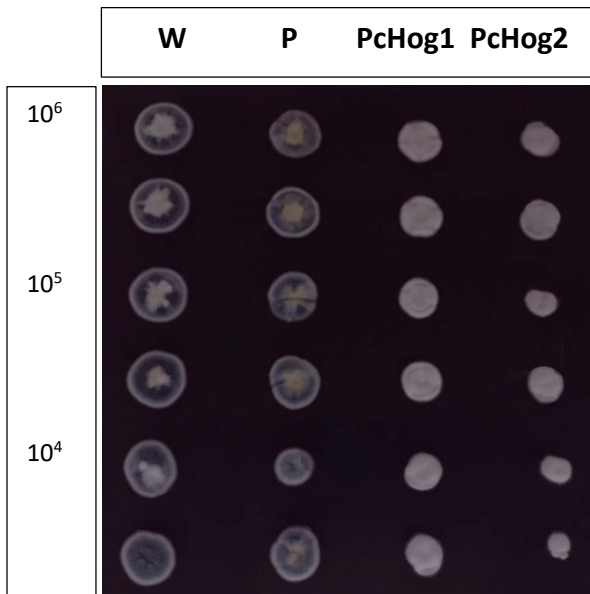


Figura 46. 150 mM H₂O₂ (120 h)

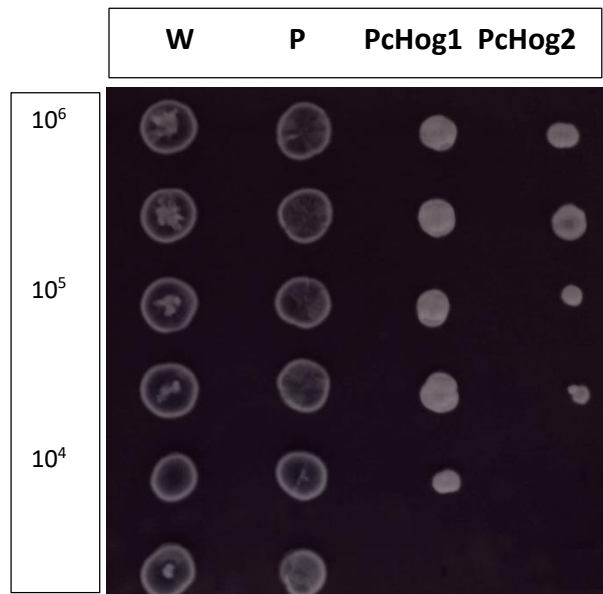


Figura 47. 200 mM H₂O₂ (120 h)

El tratamiento de los conidios con 100 mM de H₂O₂ mostró una drástica disminución en el número de colonias de todas las cepas, aunque el análisis estadístico no mostró efectos significativos respecto a los controles Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi (Figura 60). La Figura 39 muestra la fotografía del ensayo a las 72 h, en la que se puede apreciar que las colonias de las transformantes son más pequeñas que su control en ausencia de H₂O₂ y que los controles positivo y negativo con tratamiento. Además, algunas de las colonias de las transformantes parecen haber tenido problemas al momento de germinar, ya que su morfología no es completamente circular, en especial PcHog1.

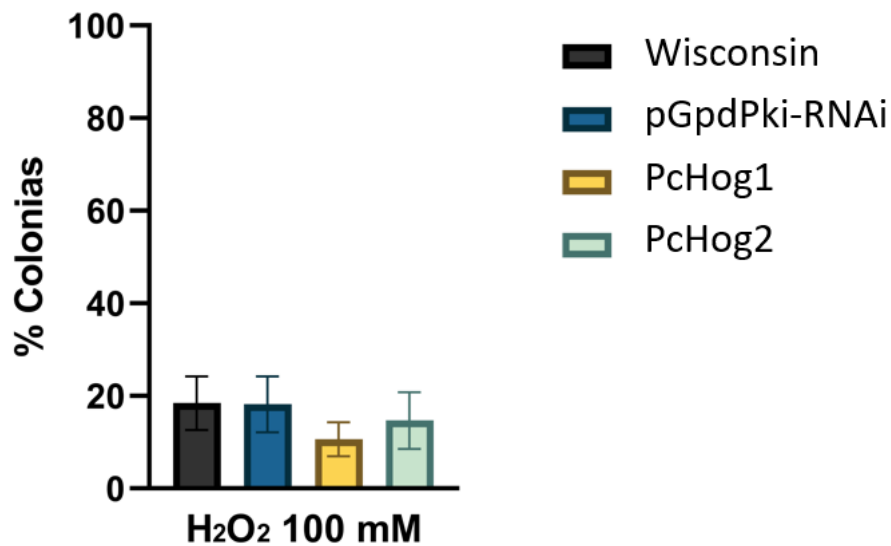


Figura 48. Prueba de estrés oxidante sobre conidios.

Sin diferencias significativas con respecto a la cepa Wisconsin. One way ANOVA asumiendo distribución normal e igualdad de varianzas con $p < 0.05$

Para conocer si la proteína SakA de *A. nidulans* (ortóloga de Hog1 y p38) es requerida para la resistencia a estrés, conidios de las cepas wild type de *A. nidulans* y su mutante por delección de *sakA* ($\Delta sakA$) fueron sometidos a

tratamientos de hiperosmolaridad (KCl 1 M, NaCl 1 M o sorbitol 1 M) y oxidantes (50 mM H₂O₂). No se detectaron diferencias morfológicas o de crecimiento en ambas cepas al ser tratadas con los diferentes osmolitos, pero sí se detectó una mayor sensibilidad al tratamiento oxidante en los conidios de la cepa *ΔsakA* (**Kawasaki et al., 2002**). Por otra parte, un estudio con *A. fumigatus* reveló la importancia de SakA para hacer frente a condiciones de estrés osmótico y oxidante: las mutantes *ΔsakA* mostraron una disminución en el crecimiento radial en medios mínimos con concentraciones crecientes de sorbitol (0.6, 0.9 y 1.2 M), así como sensibilidad al estrés oxidante inducido por H₂O₂ y agentes que dañan la pared celular (**Bruder Nascimento et al., 2016**). Para dar respuesta a condiciones de estrés, las vías Hog1 de *S. cerevisiae*, Sty1 de *S. pombe* y HOG-MAPK de hongos filamentosos se activan bajo condiciones de hiperosmolaridad y oxidativas. Las diferentes respuestas de las transformantes PcHog ante las dos condiciones de estrés evaluadas muestran la estrecha relación que guarda MAPK con sus ortólogos.

7.5 Producción de penicilina

Los ensayos de penicilina se realizaron de acuerdo con la metodología descrita en el punto 6.9. Se prepararon un total de 12 placas de bioensayo, dos para cada día y en cada una de ellas se incluyó la curva patrón y el sobrenadante de dos cepas. Fue necesario diluir el sobrenadante en diferentes tiempos, debido a que el aumento en la producción de penicilina provocó el empalme de los halos y, por lo tanto, la medición de estos fue imposible. Las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi se diluyeron con agua destilada, filtrada y estéril en una relación 1:3 (24 h), 1:5 (48 h) y 1:9 (72-120 h) mientras que la transformante PcHog1 se diluyó en una relación 1:5 (48 h), 1:9 (72 h) y 1:20 (96-120 h) y la transformante PcHog2 se diluyó en una relación 1:4 (48 h), 1:9 (72 h) y 1:20 (96-120 h).

Durante las primeras etapas del ensayo es natural encontrar valores de pH cercanos a 6, debido a que es el valor al que se ajustó el medio de cultivo. Las mediciones posteriores mostraron un incremento del pH en las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi, que se mantuvo entre las 72 y 96 h y finalmente disminuyó a las 120 h. Las transformantes mostraron un pico máximo a las 72 h y un descenso consecutivo en las siguientes dos mediciones (Figura 61). El análisis estadístico indica diferencias significativas más marcadas de las transformantes con respecto a las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi a partir de las 96 h.

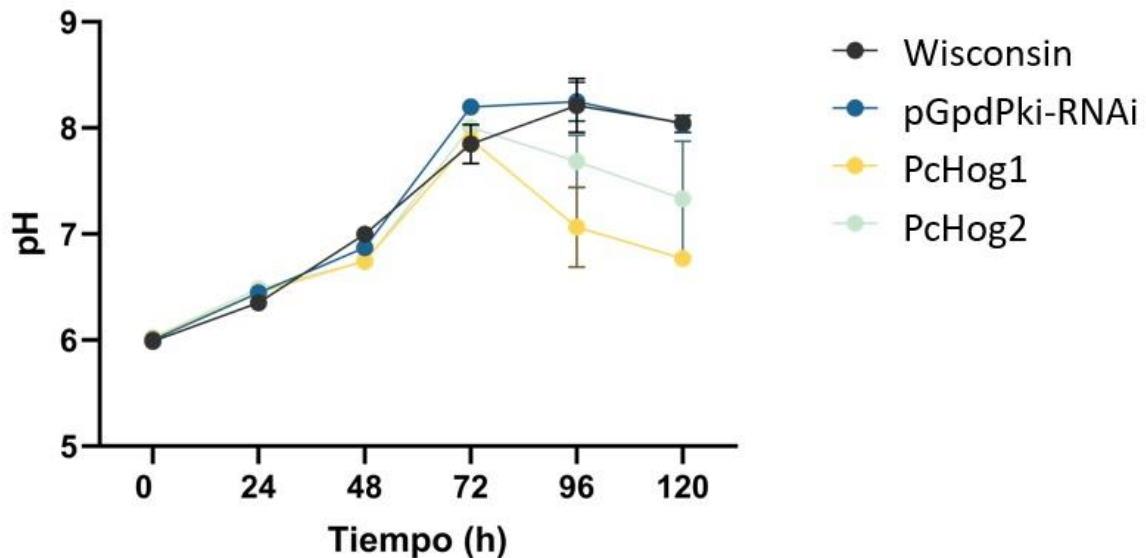


Figura 49. Variación de pH de las diferentes cepas.

Diferencias significativas con respecto a la cepa Wisconsin a partir de las 96 horas. One way ANOVA asumiendo distribución normal e igualdad de varianzas con $p < 0.05$

Para evitar variaciones en los cálculos de producción de penicilina, se determinó la cantidad de biomasa producida por día (Figura 62), representando el día cero una medida realizada directamente desde el preinóculo. El análisis estadístico indica

diferencias significativas de las transformantes con respecto a las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi a partir de las 96 h.

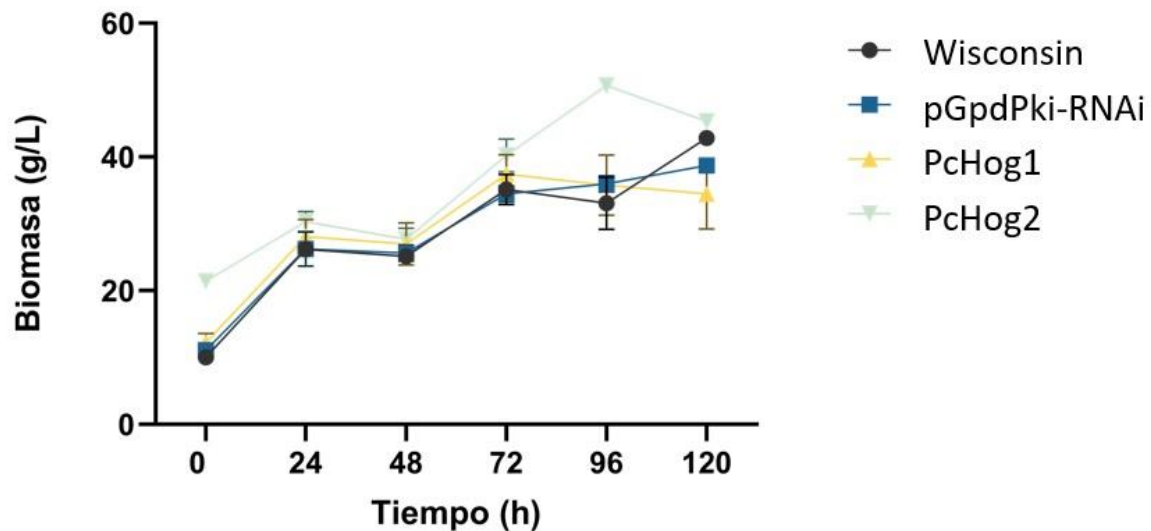


Figura 50. Producción de biomasa (peso seco) de las diferentes cepas.

Diferencias significativas con respecto a la cepa Wisconsin a partir de las 96 horas. One way ANOVA asumiendo distribución normal e igualdad de varianzas con $p < 0.05$

La Figura 63 permite observar que las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi aumentaron su producción de penicilina, con un máximo entre las 72 y 96 h. esto resulta interesante, ya que coincide con los valores de pH de mayor alcalinidad y se ha reportado que un pH alcalino extracelular estimula ligeramente la transcripción de los genes de biosíntesis de penicilina (Martín, 2000). Las transformantes experimentaron una producción muy pobre las primeras 24 h, con respecto a las cepas control. Sin embargo, la transformante PcHog1 alcanzó la producción de los controles entre las 48 y 72 h mientras que la PcHog2 lo hizo hasta las 96 h, aunque siguió muy de cerca a PcHog1. Finalmente, se presentó un fenómeno interesante ya que las transformantes continuaron aumentando su producción de penicilina, siendo la PcHog1 significativamente diferente a los controles a partir de las 96 h, mientras que PcHog2 lo fue a partir de las 120 h.

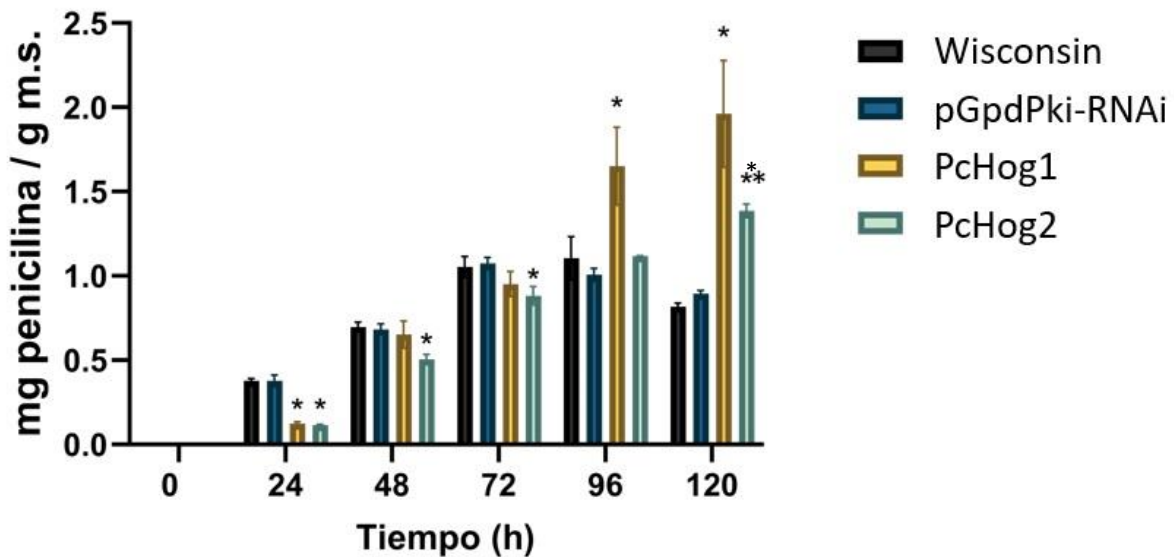


Figura 51. Producción de penicilina en peso seco.

* Diferencias significativas con respecto a la cepa Wisconsin. One way ANOVA asumiendo distribución normal e igualdad de varianzas en una prueba POST – HOC de Tukey con $p < 0.05$

Estudios recientes han demostrado que un aumento en las ROS en cultivos de *P. chrysogenum* mediante la adición de H_2O_2 , provocaron un aumento en la biosíntesis de penicilina (Bibián et al., 2020). El silenciamiento de PcHog trajo como consecuencia la eliminación de la defensa ante el estrés oxidante en las transformantes, por lo que posiblemente se estén acumulando ROS dentro de la célula y esto haya desencadenado la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre ellos penicilina.

7.6 Western blot

La Figura 64 muestra un gel SDS-PAGE cargado con 150 μg de proteína previamente cuantificada en un ensayo de Bradford. Es posible observar similitudes en el perfil proteico de las cepas Wisconsin 54-1255 y pGpdPKI-RNAi

así como las transformantes PcHog1 y PcHog2 al igual que Δ pga1 y Δ pga1 + AMPc.

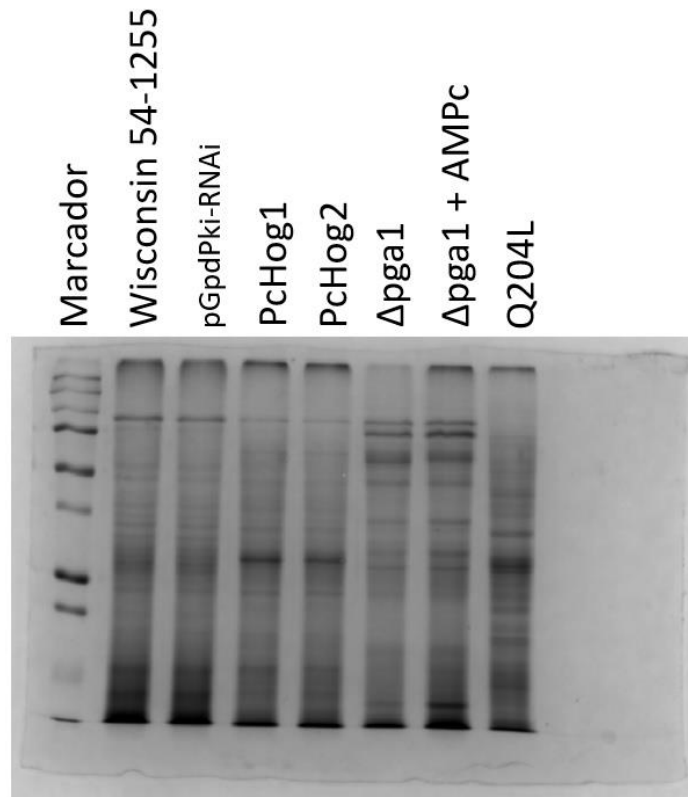


Figura 52. SDS – PAGE 150 μ g.

El análisis mediante Western blot permitió distinguir bandas pertenecientes a la expresión de P38 total en la cepa Wisconsin 54-1255 en una región de entre 50 y 37 kDa y bandas apenas perceptibles en las transformantes (Figura 65A). El análisis densitométrico permitió normalizar las señales detectadas a valores de proteína total (Figura 65D) y esto permitió corroborar el silenciamiento de una forma más confiable.

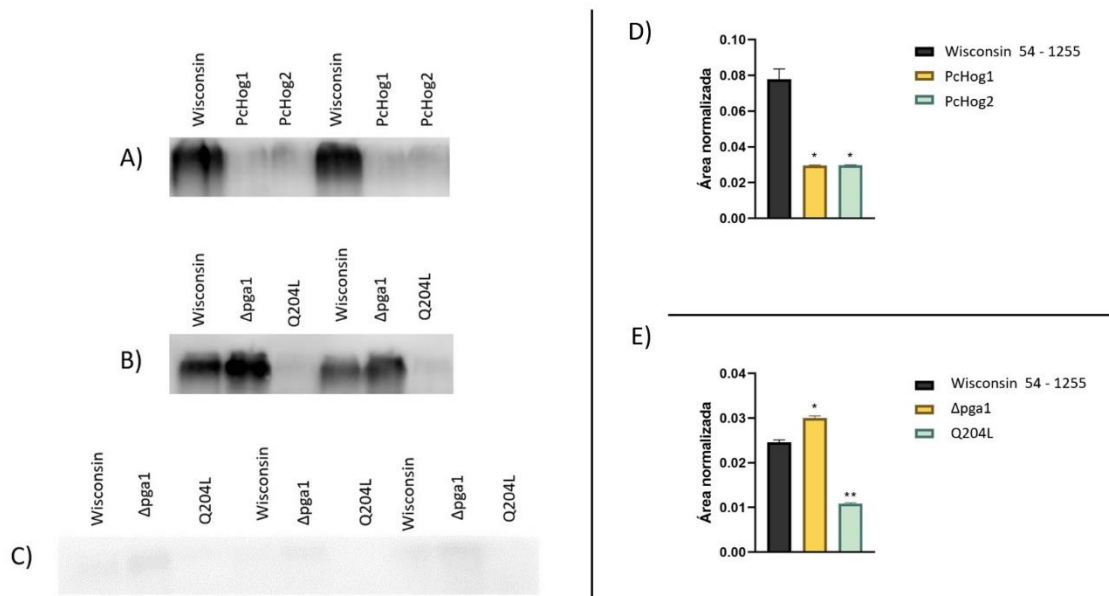


Figura 53. Análisis de Western Blot.

A) señal de p38 total B) señal de p38 total en diferentes fondos genéticos C) señal de p38 fosforilada D) análisis densitométrico de p38 total E) análisis densitométrico de p38 total en diferentes genotipos *pga1*

Diferentes fondos genéticos del gen codificante de la subunidad Ga Pga1 dan indicios de una relación entre la vía de las proteínas G heterotriméricas y PcHog, puesto que en el caso de la cepa Δ pga1 (delección de *pga1*) se detectó un aumento en la señal de PcHog con respecto a la cepa wild type. En el caso de una subunidad G α Pga1 constitutivamente activa se detectó PcHog en niveles muy bajos (Figura 65B y 65E). Una serie de estudios de la subunidad G α Pga1 y su papel en procesos de crecimiento y diferenciación ha permitido establecer una relación más cercana, junto con los resultados de Western blot. La cepa GpdG42R-T (García-Rico et al., 2007) es equivalente a la cepa Q204L, en el sentido de mantener la subunidad Ga Pga1 constitutivamente activa. En este trabajo se encontró una menor expresión de PcHog en la cepa Q204L (Figura 65B

y 65E), por lo que teóricamente se espera lo mismo para la cepa GpdG42R-T, es decir, es posible tomar los resultados publicados para la cepa GpdG42R-T y compararlos con los resultados de las cepas transformantes PcHog: por ejemplo, se encontró que la cepa GpdG42R-T presentó un aumento en la producción de penicilina (**García-Rico et al., 2008**). Más tarde se probó la resistencia a condiciones estresantes y los resultados señalaron una menor extensión apical en medio Czapek suplementado con diversos osmolitos (Sorbitol, KCl o NaCl 1.5 M), en cuanto a estrés oxidante sobre conidios no se encontraron diferencias significativas en las tasas de supervivencia con respecto a la cepa parental (**García-Rico et al., 2011**), estos resultados resultan ser los mismos para las transformantes PcHog y fortalecen más la relación entre la vía de las proteínas G heterotriméricas y PcHog.

En análisis preliminares de fosfoproteómica (trabajo aún no publicado) se apreció un cambio en el patrón de fosforilación de PcHog en la cepa Wisconsin 54-1255 (T172-Y174) y $\Delta pga1$ (Y174), el análisis de fosforilación mediante Western blot (Figura 65C) mostró señales casi imperceptibles en los carriles pertenecientes a la cepa Wisconsin y $\Delta pga1$.

Un estudio de proteómica comparativa con diferentes grados de actividad de la vía de señalización mediada por Pga1 reportó un aumento en la expresión de enzimas que participan en la respuesta a estrés oxidante (catalasa R y benzoquinona reductasa) en la cepa $\Delta pga1$ (**Carrasco-Navarro et al., 2016**). Se ha demostrado que la MAPK (SakA) de *A. nidulans* interactúa con el factor de transcripción AtfA para regular la expresión del gen de catalasa (CatA), que a su vez permite dar respuesta a condiciones de estrés (Lara-rojas et al., 2011). Resulta interesante proponer que la proteína PcHog (ortóloga de SakA) es la responsable del aumento en las enzimas de respuesta a estrés oxidante reportadas por **Carrasco-Navarro et al. (2016)**.

8. Conclusiones

El silenciamiento del gen Pc13g11680 provocó diferentes respuestas fenotípicas en las transformantes, dependiendo del tipo de estrés al que fue sometido: el estrés osmótico no resultó letal, pero se observó dificultad para la extensión del micelio, ausencia de pigmentación verdosa y colonias más pequeñas. En el caso del estrés oxidante la respuesta fue más agresiva, ya que se observó un retardo en la aparición del micelio, posiblemente algunos conidios sobrevivieron al tratamiento y fueron los que hicieron posible el desarrollo del micelio, mientras que las colonias presentaron daños y germinaron de forma irregular. Estas son evidencias de la importancia de PcHog1 para hacer frente a condiciones de estrés.

Aunque son necesarios más estudios que respalden la siguiente propuesta, es posible teorizar que el silenciamiento del gen Pc13g11680 provocó la eliminación de la defensa ante el estrés oxidante en las transformantes, por lo que posiblemente se estén acumulando ROS dentro de la célula y esto haya desencadenado la biosíntesis de penicilina observada en los tiempos más tardíos.

El análisis mediante Western blot de la expresión de PcHog permitió comprobar su silenciamiento, además, los diferentes fondos genéticos empleados permitieron encontrar una relación entre $G\alpha$ Pga1 y PcHog, aunque el análisis de fosforilación mostro señales casi imperceptibles. Quizás sea necesario inducir condiciones de estrés para encontrar una señal más fuerte.

La variedad de repuestas presentadas por la ausencia del gen Pc13g11680 no es de extrañar, debido a que el análisis *in silico* mostró un alto grado de conectividad de PcHog con múltiples procesos.

9. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo arrojan evidencia suficiente para afirmar que la PcHog participa en la cascada de señalización de respuesta a estrés osmótico y oxidante, posiblemente su ausencia provocó la acumulación de ROS y por lo tanto el alza en la producción de penicilina. Se propone la cuantificación de las ROS para confirmar este punto. El análisis de Western blot mostró la relación de PcHog con las proteínas G heterotriméricas sin embargo, en la cepa Q204L (que cuenta con la subunidad constitutivamente activa) no se detectó la presencia de PcHog total, por lo que se propone realizar una cuantificación a nivel de transcrito con una qPCR, también sería interesante saber qué factores de transcripción regulan la transcripción del gen de *PcHog*, ya que posiblemente las proteínas G heterotriméricas estén regulando a este factor. La señal obtenida en el análisis de fosforilación resultó ser muy débil, por lo que se propone realizar este ensayo induciendo condiciones estresantes. Tal vez con estas sugerencias será posible establecer una conexión más fuerte entre PcHog y las proteínas G heterotriméricas.

Bibliografía

- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/mnbr.67.4.657-685.2003>
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>
- Aung-Htut, M. T., Ayer, A., Breitenbach, M., & Dawes, I. W. (2012). Oxidative stresses and ageing. In *Sub-Cellular Biochemistry* (Vol. 57). https://doi.org/10.1007/978-94-007-2561-4_2
- Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00049-19>
- Barnetche, J. M. (2007). La bioinformática como herramienta para la investigación en salud humana. *Salud Publica de Mexico*, 49(SPECIAL EDITION 1).
- Barreiro, C., Martín, J. F., & García-Estrada, C. (2012). Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/105109>
- Bibián, M. E., Pérez-Sánchez, A., Mejía, A., & Barrios-González, J. (2020). Penicillin and cephalosporin biosyntheses are also regulated by reactive oxygen species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1773–1783. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10330-2>
- Bioinformática | NHGRI*. (2011, October 13). <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica>
- Brakhage, A. A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H., & Tüncher, A. (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Advances*

in Biochemical Engineering/Biotechnology, 88, 45–90.

<https://doi.org/10.1007/b99257>

- Breitenbach, M., Weber, M., Rinnerthaler, M., Karl, T., & Breitenbach-Koller, L. (2015). Oxidative stress in fungi: Its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. *Biomolecules*, 5(2), 318–342. <https://doi.org/10.3390/biom5020318>
- Bruder Nascimento, A. C. M. de O., dos Reis, T. F., de Castro, P. A., Hori, J. I., Bom, V. L. P., de Assis, L. J., Ramalho, L. N. Z., Rocha, M. C., Malavazi, I., Brown, N. A., Valiante, V., Brakhage, A. A., Hagiwara, D., & Goldman, G. H. (2016). Mitogen activated protein kinases SakA/HOG1 and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Molecular Microbiology*, 100(5), 841–859. <https://doi.org/10.1111/mmi.13354>
- Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2021). Turning inside out: Filamentous fungal secretion and its applications in biotechnology, agriculture, and the clinic. *Journal of Fungi*, 7(7), 1–36. <https://doi.org/10.3390/jof7070535>
- Caldera, M., Buphamalai, P., Müller, F., & Menche, J. (2017). Interactome-based approaches to human disease. *Current Opinion in Systems Biology*, 3, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.04.015>
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00031-10>
- Carrasco-Navarro, U., Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Zúñiga-León, E., Reyes-Vivas, H., Fernández, F. J., & Fierro, F. (2016). Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric Gα protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0564-x>
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y

- estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.
- Catozzi, S., Di-Bella, J. P., Ventura, A. C., & Sepulchre, J. A. (2016). Signaling cascades transmit information downstream and upstream but unlikely simultaneously. *BMC Systems Biology*, 10(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1186/s12918-016-0303-2>
- Cepeda-García, C., Domínguez-Santos, R., García-Rico, R. O., García-Estrada, C., Cajiao, A., Fierro, F., & Martín, J. F. (2014). Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the pcbAB gene in *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7113–7124. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5760-1>
- Clarissa Gust, T., & Bonin, A. (2008). Kinases as Drug Targets in Inflammation: In Vitro and In Vivo Target Validation and Expression Profiling. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 6(1), 19–27.
<https://doi.org/10.2174/187152307779939723>
- De Rosa, M., Verdino, A., Soriente, A., & Marabotti, A. (2021). The odd couple(S): An overview of beta-lactam antibiotics bearing more than one pharmacophoric group. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–21.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020617>
- Dihazi, H., Kessler, R., & Eschrich, K. (2004). High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23961–23968.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312974200>
- El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 225–261. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50010-4>
- Feng, B., Friedlin, E., & Marzluf, G. A. (1994). A reporter gene analysis of penicillin

- biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4432–4439. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4432-4439.1994>
- Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7–17. <https://doi.org/10.1097/MRM.0b013e3283587727>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). 35888. *Nature*, 391(February), 806–811. <https://www.nature.com/articles/35888.pdf>
- Fountain, J. C., Bajaj, P., Nayak, S. N., Yang, L., Pandey, M. K., Kumar, V., Jayale, A. S., Chitikineni, A., Lee, R. D., Kemerait, R. C., Varshney, R. K., & Guo, B. (2016). Responses of *Aspergillus flavus* to oxidative stress are related to fungal development regulator, antioxidant enzyme, and secondary metabolite biosynthetic gene expression. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02048>
- Franco, M. L., Cediél, J. F., & Payán, C. (2008). Breve historia de la bioinformática. *Colombia Medica*, 39(1), 117–120.
- Füting, P., Barthel, L., Cairns, T. C., Briesen, H., & Schmieder, S. (2021). Filamentous fungal applications in biotechnology: a combined bibliometric and patentometric assessment. *Fungal Biology and Biotechnology*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40694-021-00131-6>
- García-Rico, Ramón O., & Fierro, F. (2017). Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.06.005>
- García-Rico, Ramón O., Fierro, F., Mauriz, E., Gómez, A., Fernández-Bodega, M. A., & Martín, J. F. (2008). The heterotrimeric G α protein Pga 1 regulates

- biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology*, 154(11), 3567–3578.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019091-0>
- García-Rico, Ramón O., Martín, J. F., & Fierro, F. (2007). The *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Research in Microbiology*, 158(5), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.03.001>
- García-Rico, Ramón Ovidio, Martín, J. F., & Fierro, F. (2011). Heterotrimeric G α protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genetics and Biology*, 48(6), 641–649.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.013>
- Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R. D., Bovenberg, R. A. L., & Driessen, A. J. M. (2018). Engineering of the filamentous fungus *penicillium chrysogenum* as cell factory for natural products. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–25.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02768>
- Hartford Svoboda, K. K., & Reenstra, W. R. (2002). Approaches to studying cellular signaling: A primer for morphologists. *The Anatomical Record*, 269(2), 123–139. <https://doi.org/10.1002/ar.10074.abs>
- Hayashi, M., & Maeda, T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*, 139(4), 797–803.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvj089>
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 583(24), 4025–4029.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.069>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(Figure 1), 72–80.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

- Issa, A. T., & Tahergorabi, R. (2019). Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. Microbial Composition of Milk. In *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814468-8.00022-3>
- Kawasaki, L., Sánchez, O., Shiozaki, K., & Aguirre, J. (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, *45*(4), 1153–1163. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03087.x>
- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R. V., Godio, R. P., Feltrer, R., Teixeira, F., Mauriz, E., & Martín, J. F. (2009). The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, *91*(2), 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.09.004>
- Kotlyar, M., Pastrello, C., Pivetta, F., Lo Sardo, A., Cumbaa, C., Li, H., Naranian, T., Niu, Y., Ding, Z., Vafaei, F., Broackes-Carter, F., Petschnigg, J., Mills, G. B., Jurisicova, A., Stagljar, I., Maestro, R., & Jurisica, I. (2014). In silico prediction of physical protein interactions and characterization of interactome orphans. *Nature Methods*, *12*(1), 79–84. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3178>
- Laemmli, U. K. (1970). 227680a0. *Nature*, *227*, 680–685.
- Lara-rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., & Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *80*(March), 436–454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x>
- Martín, J. F. (2000). Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: Regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *Journal of Bacteriology*, *182*(9), 2355–2362. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2355-2362.2000>

- Martínez, K., Salazar, Á., Fernández, J., Pineda, C., Aguilar, C., & López, A. (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigacion En Discapacidad*, 6(3), 128–137.
www.medigraphic.org.mx<http://www.medigraphic.com/rid>
- Matveyev, A. V., Alves, J. M. P., Serrano, M. G., Lee, V., Lara, A. M., Barton, W. A., Costa-Martins, A. G., Beverley, S. M., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Buck, G. A. (2017). The Evolutionary Loss of RNAi Key Determinants in Kinetoplastids as a Multiple Sporadic Phenomenon. *Journal of Molecular Evolution*, 84(2–3), 104–115. <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9780-1>
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), 1–6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Nakayashiki, H., Kadotani, N., & Mayama, S. (2006). Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *Journal of Molecular Evolution*, 63(1), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0257-2>
- Novohradská, S., Ferling, I., & Hillmann, F. (2017). Exploring virulence determinants of filamentous fungal pathogens through interactions with soil amoebae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(DEC).
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00497>
- Nützmann, H. W., Schroeckh, V., & Brakhage, A. A. (2012). Regulatory cross talk and microbial induction of fungal secondary metabolite gene clusters. *Methods in Enzymology*, 517, 325–341. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404634-4.00016-4>
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71. <https://doi.org/10.1038/nrm2299>
- Papadakis, M. A., & Workman, C. T. (2015). Oxidative stress response pathways: Fission yeast as archetype. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(4), 520–535. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.870968>

- Peti, W., & Page, R. (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Science*, 22(12), 1698–1710. <https://doi.org/10.1002/pro.2374>
- Román, E., Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., & Pla, J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends in Microbiology*, 15(4), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.001>
- Salat-Canela, C., Paulo, E., Sánchez-Mir, L., Carmona, M., Ayté, J., Oliva, B., & Hidalgo, E. (2017). Deciphering the role of the signal- and Sty1 kinase-dependent phosphorylation of the stress-responsive transcription factor Atf1 on gene activation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(33), 13635–13644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.794339>
- Salo, O. V., Ries, M., Medema, M. H., Lankhorst, P. P., Vreeken, R. J., Bovenberg, R. A. L., & Driessen, A. J. M. (2015). Genomic mutational analysis of the impact of the classical strain improvement program on β -lactam producing *Penicillium chrysogenum*. *BMC Genomics*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2154-4>
- Sansó, M., Vargas-Pérez, I., García, P., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2011). Nuclear roles and regulation of chromatin structure by the stress-dependent MAP kinase Sty1 of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Microbiology*, 82(3), 542–554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07851.x>
- Saucedo, M., & Gavilanes, M. (2005). Las Map Cinasas : Elementos De Señalización En La Defensa De Las Plantas Contra Patógenos. *Reb*, 24(1), 4–11.
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2020). ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
- Soares-Silva, M., Diniz, F. F., Gomes, G. N., & Bahia, D. (2016). The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by

- trypanosomatids. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Suárez, T., & Peñalva, M. A. (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB-pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Molecular Microbiology*, 20(3), 529–540. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5421065.x>
- Sun, J., & Nan, G. (2016). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway as a Discovery Target in Stroke. *Journal of Molecular Neuroscience*, 59(1), 90–98. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0717-8>
- Svoboda, P. (2020). Key Mechanistic Principles and Considerations Concerning RNA Interference. *Frontiers in Plant Science*, 11(August), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01237>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tie, L., Xiao, H., Wu, D. lei, Yang, Y., & Wang, P. (2021). A brief guide to good practices in pharmacological experiments: Western blotting. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(7), 1015–1017. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00539-7>
- Unoarumhi, Y., Blumenthal, R. M., & Matson, J. S. (2016). Evolution of a global regulator: Lrp in four orders of γ -Proteobacteria. *BMC Evolutionary Biology*,

- 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0685-1>
- Urano, D., Chen, J. G., Botella, J. R., & Jones, A. M. (2013). Heterotrimeric G protein signalling in the plant kingdom. *Open Biology*, 3(MAR).
<https://doi.org/10.1098/rsob.120186>
- Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, P. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2015). Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)*, 83(2), 165–174.
<https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.04.015>
- Van Den Berg, M. A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J. H., Daran, J. M., M Driessen, A. J., Garcia-Estrada, C., Fedorova, N. D., Harris, D. M., Heijne, W. H. M., Joardar, V., W Kiel, J. A. K., Kovalchuk, A., Martín, J. F., Nierman, W. C., Nijland, J. G., Pronk, J. T., Roubos, J. A., Van Der Klei, I. J., ... Bovenberg, R. A. L. (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1161–1168.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1498>
- Viera, I., Castellanos, M., & Zardón, M. (2010). Un Acercamiento a La Ontología De Genes Y Sus Aplicaciones. *Rcim.Sld.Cu*.
http://www.rcim.sld.cu/revista_21/articulo_pdf/ontologiadegenes.pdf
- Weber, S. S., Bovenberg, R. A. L., & Driessen, A. J. M. (2012). Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Journal*, 7(2), 225–236. <https://doi.org/10.1002/biot.201100065>
- Weber, S. S., Polli, F., Boer, R., Bovenberg, R. A. L., & Driessen, A. J. M. (2012). Increased penicillin production in *penicillium chrysogenum* production strains via balanced overexpression of isopenicillin n acyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 7107–7113.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01529-12>
- Wolters, N. M., & MacKeigan, J. P. (2008). From sequence to function: Using RNAi

- to elucidate mechanisms of human disease. *Cell Death and Differentiation*, 15(5), 809–819. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402311>
- Wu, M., Crismaru, C. G., Salo, O., Bovenberg, R. A. L., & Driessen, J. M. (2020). *crossm Impact of Classical Strain Improvement of Penicillium rubens*. 86(3), 1–14.
- Younis, A., Siddique, M. I., Kim, C. K., & Lim, K. B. (2014). RNA interference (RNAi) induced gene silencing: A promising approach of hi-tech plant breeding. *International Journal of Biological Sciences*, 10(10), 1150–1158. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10452>
- Yuan, J., Chen, Z., Guo, Z., Li, D., Zhang, F., Shen, J., Zhang, Y., Wang, S., & Zhuang, Z. (2018). PbsB regulates morphogenesis, aflatoxin B1 biosynthesis, and pathogenicity of *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00162>
- Zhao, X., Mehrabi, R., & Xu, J. R. (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1701–1714. <https://doi.org/10.1128/EC.00216-07>
- Ziemons, S., Koutsantas, K., Becker, K., Dahlmann, T., & Kück, U. (2017). Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes. *BMC Biotechnology*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0335-8>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00300

Matrícula: 2202800531

Estudio de la función de la MAPK codificada por el gen Pcl3gl1680 de *Penicillium Chrysogenum* y su relación con la vía de transducción de señal de las proteínas G heterotríméricas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 28 del mes de octubre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DRA. DULCE MARIA ANDRADE PAVON
DR. JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON



HECTOR CHAVEZ VELAZCO
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
DE: HECTOR CHAVEZ VELAZCO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

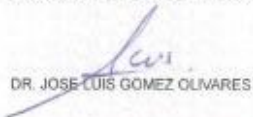
Aprobar



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL



DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL



DRA. DULCE MARIA ANDRADE PAVON

SECRETARIO



DR. JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON