



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado Doctorado en Biotecnología

TESIS

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDANTE, EL METABOLISMO  
SECUNDARIO Y LA DIFERENCIACIÓN MEDIANTE FACTORES  
TRANSCRIPCIONALES DEL TIPO AP-1 EN *Penicillium chrysogenum*

Para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

PRESENTA

MATRICULA: 2133805868

M. en Biotec. Wylma Dolores Pérez Pérez

DIRECTOR: Dr. Francisco Fierro Fierro

ASESORES: Dr. Javier Barrios González

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

JURADO: Presidente: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Secretario: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vocal: Dr. Javier Barrios González

Vocal: Dr. Ulises Carrasco Navarro

Iztapalapa, Ciudad de México, 18 de agosto de 2022

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONACyT, con la referencia 001466.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco Fierro Fierro.

El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de CONACyT, proyecto CB-2013-01 222207 y con la beca para estudios de posgrado, nivel Doctorado (265789).

La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, **tener confianza en uno mismo**. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.

**Marie Curie**

**A mi familia, los amo, los extraño, siempre los pienso**

## AGRADECIMIENTOS

Cuando quieres algo, todo el universo conspira para que realices tu deseo.

Tengo una enorme oportunidad de agradecer a todas las personas que de alguna manera u otra han sido parte importante para que yo pueda concluir esta tesis y espero mis palabras les hagan justicia y sean un verdadero reflejo de lo que cada uno representa para mí.

Al Dr. Francisco Fierro, eres de las personas más brillantes que he conocido en mi vida con un gran sentido del humor y te agradezco enormemente el apoyo, el aprendizaje y la dedicación, me enamoré de este proyecto a través de tus ojos hace muchos años y no lo cambiaría por nada, gracias de verdad por ser el mejor guía, te admiro profundamente, tienes en mí a una amiga por siempre y para siempre.

A los Doctores Javier Barrios, Concepción Gutiérrez y Sergio Sánchez por su asesoría en este proyecto y el tiempo dedicado para la revisión del documento de tesis.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por el apoyo y no dudar un minuto en ofrecerte voluntario para la revisión de esta tesis, como siempre me salvas, tus alumnos somos afortunados en tenerte.

Al Dr. Ulises Carrasco, no imagino este proyecto sin ti, eres el mejor compañero de laboratorio que podría pedir, eres tan inteligente como generoso, no lo hubiera logrado sin tu apoyo y tu conocimiento, muchas de estas páginas son un reflejo de lo que me enseñaste a lo largo de estos años y espero seguir teniendo esa oportunidad porque todavía tengo mucho que aprender de ti.

A Fernanda Cerón, mi alumna/amiga favorita, aprendo mucho de ti y te agradezco por escucharme, por ayudarme, por dejarte guiar a través de mis experiencias, aquí estoy para ti siempre, lo mismo para resolver un experimento que para tomar café y hablar de perritos, serás una gran doctora de eso estoy segura.

A todos los chicos del laboratorio que a lo largo de los años han compartido conmigo, los he visto reír, frustrarse, sumirse en busca de soluciones, aprender y defender sus proyectos con tenacidad, y de todos he aprendido y me he visto reflejada en este camino como científicos que es tan duro como satisfactorio de maneras que solo ustedes pueden entender.

A mi Familia: a mi Papá que lo amo con todo el corazón, te extraño y te pienso siempre, por ti respiro, por ti sonríó. A mi Mamá que es la mujer más fuerte y decidida que conozco, persisto y

resisto por ti. A mis hermanos que son los mejores compañeros de vida, que sean felices y maravillosos en sus individualidades me llena el corazón de amor.

A Hugo, mi amor bonito, mi persona incondicional, mi medio círculo, eres la mejor compañía y mi refugio favorito, si ti en mi vida jamás hubiera llegado hasta aquí, yo me quede con la silla del laboratorio, pero tú te quedaste con mi corazón.

Al final a pesar de todos los tropiezos, las frustraciones (también hubo muchas alegrías), una huelga, un sismo, una mudanza de laboratorio y una pandemia mundial entre otras cosas, no me arrepiento de nada, me disfruté cada día (y noche) en el laboratorio (S-154 y W-002) aprendí muchísimo, no solo de ciencia, también fue un gran ejercicio para trabajar la paciencia, la perseverancia y el compromiso. No fue perfecto, pero fue mío.

### **ENERO 2023...**

Nunca pensé que acabaría así, es tan injusto y estaré molesta con la vida mucho tiempo, eventualmente llegará la aceptación y vivirás a través de mis recuerdos y en los recuerdos de todas las personas que tuvimos la gran fortuna de conocerte.

Trabajar contigo es de mis mejores experiencias y siempre estaré agradecida de cruzarme en tu camino, me enorgullece mucho que hayas logrado ver como termino este proyecto y el artículo tan bonito que logramos escribir, marcaste mi vida personal y profesional, creo que siempre seguiré escuchando tu voz con todos los consejos que me diste a lo largo de los años.

Descansa Paco, te extrañare siempre.

## RESUMEN

*Penicillium chrysogenum* es un hongo filamentoso del grupo de los ascomicetos productor del metabolito secundario penicilina, es en el metabolismo secundario donde se obtiene diversos compuestos que no son de importancia vital para la célula pero que a nivel científico e industrial son de gran relevancia, por lo general, se regula a diferentes niveles e involucra diversas reacciones enzimáticas que derivan en la biosíntesis de diversos metabolitos. En el caso de la biosíntesis de penicilina, esta se regula por diversos factores de transcripción y estímulos ambientales, como lo son las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se sabe también desencadenan diferentes procesos morfogénicos en hongos filamentosos. Algunos factores de transcripción bZIP, como Yap1, AtfA y AtfB, median la resistencia al estrés oxidante y tienen un papel en la regulación del metabolismo secundario. En este trabajo se plantea caracterizar dos factores de transcripción que median la respuesta al estrés oxidante en el desarrollo y el metabolismo secundario en *P. chrysogenum*.

Establecimos que la biosíntesis de penicilina y la conidiación son estimuladas por la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio de cultivo y este efecto se regula a través de los factores de transcripción del tipo bZIP, PcYap1 y PcRsmA. Al silenciar los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* se observaron fenotipos similares con una mayor acumulación de ROS, retraso y baja conidiación, mayor sensibilidad de los conidios al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disminución en la producción de penicilina. Mientras que la sobreexpresión de estos mismos genes no representa un cambio significativo en la producción de penicilina, la conidiación se ve menos afectada que con el silenciamiento y acumulan menos ROS.

PcYap1 y PcRsmA pueden detectar ROS generadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* y cambiar su conformación en respuesta a este estímulo, además, regulan positivamente la expresión de *brlA*, primer gen de la vía central de regulación de la conidiación. PcYap1 se une *in vitro* a la secuencia reguladora TTAGTAA, previamente identificada en el promotor del gen *pcbAB*, del cluster de biosíntesis de penicilina, y a la secuencia TTAATAA en el promotor del gen *brlA*, mientras que PcRsmA se une a las secuencias TGAGACA y TTACGTAA (motivo CRE) en los promotores de los genes *pcbAB* y *penDE*, respectivamente. PcYap1 y PcRsmA como factores de transcripción del tipo bZIP, parecen trabajar en conjunto para regular positivamente la respuesta al estrés oxidante, la conidiación y la biosíntesis de penicilina.

PcYap1 se identifica como el factor de transcripción PTA1 (Activador transcripcional de penicilina 1) propuesto anteriormente, este es el primer informe de una proteína Yap1 que regula directamente la transcripción de un gen del metabolismo secundario, mientras que PcRsmA regula positivamente la transcripción de los genes *brlA* y *Pc-yap1*. Finalmente, se propone un modelo que describe la red reguladora mediada por PcYap1 y PcRsmA.

## ABSTRACT

*Penicillium chrysogenum* is a filamentous fungus of the ascomycete group that produces the secondary metabolite penicillin, it is in the secondary metabolism where various compounds are obtained that are not of vital importance for the cell but that at a scientific and industrial level are of great relevance, it is usually regulated at different levels and involves various enzymatic reactions that lead to the biosynthesis of various metabolites. In the case of penicillin biosynthesis, it is regulated by various transcription factors and environmental stimulus, such as reactive oxygen species (ROS), which are also known to trigger different morphogenic processes in filamentous fungi. Some bZIP transcription factors, such as Yap1, AtfA, and AtfB, mediate resistance to oxidative stress and have a role in secondary metabolism regulation. In this work, it is proposed to characterize two transcription factors that mediate the oxidative stress response in development and secondary metabolism in *P. chrysogenum*.

We established that penicillin biosynthesis and conidiation are stimulated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the culture medium and this effect is mediated by the bZIP transcription factors, PcYap1 and PcRsmA. Silencing the *Pc-yap1* and *Pc-rsmA* genes showed similar phenotypes with increased ROS accumulation, delayed and low conidiation, higher sensitivity of conidia to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and a decreased in penicillin production. Whereas overexpression of these same genes does not represent a significant change in penicillin production, conidiation is less affected than with silencing and they accumulate less ROS.

PcYap1 and PcRsmA can sense H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generated ROS in vitro and change its conformation in response to this stimulus, in addition, they positively regulate the expression of *brlA*, the first gene of the conidiation central regulatory pathway. PcYap1 binds in vitro to the TTAGTAA regulatory sequence, previously identified in the promoter of the *pcbAB* gene, of the penicillin biosynthesis cluster, and to the TTAATA sequence in the promoter *brlA* gene, whereas PcRsmA binds to the sequences TGAGACA and TTACGTAA (CRE motif) in the promoters of the *pcbAB* and *penDE* genes, respectively. PcYap1 and PcRsmA as bZIP-type transcription factors seem to work together to positively regulate the response to oxidative stress, conidiation and penicillin biosynthesis.

PcYap1 is identified as the previously proposed transcription factor PTA1 (Penicillin Transcriptional Activator 1), this is the first report of a Yap1 protein that directly regulating transcription of a secondary metabolism gene, while PcRsmA positively regulate the transcription of *brlA* and *Pc-yap1*



genes. Finally, a model is proposed that describing the regulatory network mediated by PcYap1 and PcRsmA.

# ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>24</b>
ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS Y BIOSÍNTESIS DE PENICILINA	25
REGULACIÓN GÉNICA DEL METABOLISMO SECUNDARIO Y HERRAMIENTAS PARA SU ESTUDIO	29
TIPOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE REGULAN EL METABOLISMO SECUNDARIO	31
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>34</b>
REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE PENICILINA EN <i>P. chrysogenum</i>	34
REGULACIÓN POR FUENTE DE CARBONO	34
REGULACIÓN POR FUENTE DE NITRÓGENO	35
REGULACIÓN POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	35
REGULACIÓN POR pH	36
REGULACIÓN POR EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL AnCF	36
FACTOR TRANSCRIPCIONAL PTA1	37
REGULACIÓN DE LA CONIDIACIÓN EN <i>P. chrysogenum</i>	38
FAMILIA AP-1 DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES	38
FACTORES TRANSCRIPCIONALES Yap1 DE LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS	39
RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDANTE	41
HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	44
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>46</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>47</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
OBJETIVO GENERAL	47
OBJETIVOS PARTICULARES	47
<b>VI. ANÁLISIS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESION GÉNICA</b>	<b>48</b>

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	48
MICROORGANISMOS	48
CONDICIONES DE CULTIVO	49
OBTENCIÓN DE CÉLULAS <i>E. coli</i> ULTRACOMPETENTES	50
PLÁSMIDOS DE SILENCIAMIENTO MEDIADO POR RNAi PARA <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i>	50
PLÁSMIDOS PARA SOBREENPRESIÓN DE <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i>	51
OBTENCIÓN DE CEPAS SILENCIADAS Y SOBREENPRESADAS DE <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i>	53
CONFIRMACIÓN DE CEPAS SILENCIADAS Y SOBREENPRESADAS DE <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i>	54
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PARA LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDANTE	55
Influencia del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la producción de penicilina de <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255	55
Influencia del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la conidiación de <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255	56
Supervivencia de conidios al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	56
ANÁLISIS DE CEPAS SILENCIADAS Y SOBREENPRESADAS DE <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i>	57
Crecimiento radial	57
Cinética de conidiación y resistencia a estrés oxidante	57
Producción de penicilina y bioensayo de estrés oxidante	57
Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	57
NORTHERN BLOT	58
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
RESULTADOS	60
ORTÓLOGOS DE Yap1, RsmA Y AtfB EN EL GENOMA DE <i>P. chrysogenum</i>	60
CONFIRMACIÓN DE CEPAS CON LOS GENES SILENCIADOS Y SOBREENPRESADOS	61

INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDANTE SOBRE LA CONIDIACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PENICILINA DE <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255	65
<i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i> NO INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL MICELIO	66
<i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i> REGULAN POSITIVAMENTE LA CONIDIACIÓN	67
REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE PENICILINA	72
PAPEL DE <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i> EN LA DEFENSA ANTE EL ESTRÉS OXIDANTE	75
EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i> SOBRE LA CONIDIACIÓN, PRODUCCIÓN DE PENICILINA Y RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE	76
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>brlA</i> Y <i>Pc-yap1</i>	83
<b>VII. ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROTEÍNAS</b>	<b>86</b>
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	86
MICROORGANISMOS	86
CONDICIONES DE CULTIVO	86
TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO	86
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (IMAC) DE LAS PROTEÍNAS PcYap1, PcRsmA y PcAtf21	87
ENSAYO DE RETARDO EN GEL (EMSA)	87
ENSAYO DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS PURIFICADAS	89
RESULTADOS	91
IDENTIFICACIÓN DE SITIOS ESPECÍFICOS DE UNIÓN PARA PcYap1 Y PcRsmA EN LA REGIÓN INTERGÉNICA <i>pcbAB-pcbC</i>	92
CAPACIDAD DE UNIÓN DE UN SITIO CRE DENTRO DEL PROMOTOR DEL GEN <i>penDE</i> A PcRsmA, PERO NO A PcYap1 O PcAtf21	98
REGULACIÓN DE LA CONIDIACIÓN A TRAVÉS DE LA UNIÓN DE PcYap1 A LA SECUENCIA ESPECÍFICA: TTACTAA EN EL PROMOTOR DE <i>brlA</i>	100
ROS GENERADOS <i>IN VITRO</i> POR EXPOSICIÓN A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PROVOCAN CAMBIOS CONFORMACIONALES DE PcYap1 Y PcRsmA	101
<b>VIII. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO</b>	<b>104</b>

PROCEDIMIENTOS	104
CONSERVACIÓN DE CISTEÍNAS	104
NLS (SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR) Y NES (SEÑAL DE EXPORTACIÓN NUCLEAR)	104
RED DE ASOCIACIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA	106
MODELADO DE PROTEÍNAS: PcYap1 Y PcRsmA	106
RESULTADOS	108
SITIOS CONSERVADOS IMPORTANTES PARA FUNCIONALIDAD DE PcYap1 Y PcRsmA	108
PcYap1	108
PcRsmA	111
INTERACCIONES HIPOTÉTICAS DE PcYap1 CON OTRAS PROTEÍNAS	113
CONSTRUCCIÓN DE MODELOS	114
PcYap1	114
PcRsmA	116
IX. DISCUSIÓN	118
X. CONCLUSIONES	128
XI. LITERATURA CONSULTADA	129
XII. MATERIAL SUPLEMENTARIO	139
CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	139
FRAGMENTOS OBTENIDOS POR PCR	139
PLÁSMIDOS BASE	140
PLÁSMIDOS PARA EL SILENCIAMIENTO MEDIADO POR RNAi DE LOS GENES <i>Pc-yap1</i> Y <i>Pc-rsmA</i>	141
PLÁSMIDOS PARA LA SOBREENPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	142
PLÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA HETERÓLOGA	142

TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	143
RED DE ASOCIACIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA DE PcYap1	146
MEDIOS DE CULTIVO	149
SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES	152
ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA	156

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de antibióticos $\beta$ -lactámicos por su estructura química (Modificado de Suarez and Gudiol. 2009).	26
<b>Figura 2.</b> Organización de los genes responsables de la biosíntesis de antibióticos $\beta$ -lactámicos en organismos procariotas y en hongos, los genes indicados en color negro son genes de origen procariótico y los de color azul de origen eucariótico.	27
<b>Figura 3.</b> Ruta biosintética de la penicilina en <i>P. chrysogenum</i> . En los recuadros azules se indican los genes que codifican las enzimas correspondientes en cada paso de la biosíntesis.	28
<b>Figura 4.</b> Niveles de regulación de la expresión génica en eucariontes.	29
<b>Figura 5.</b> Figuras representativas de dominios de unión de factores de transcripción (Thieman y Palladino. 2010).	33
<b>Figura 6.</b> Promotor del gen <i>pcbAB</i> . Indicando: codón de inicio ATG, sitio de inicio de la transcripción ( <i>tsp</i> ), posición de la secuencia de unión de Pta1 (TTAGTAA), regiones A y B (importantes en la regulación del promotor), cajas TATA, cajas CCAAT, e hipotéticas cajas de unión de los factores transcripcionales PacC, CreA y NRE (Kosalková et al. 2000).	37
<b>Figura 7.</b> Representación de la localización de Yap1 entre el núcleo y el citoplasma en condiciones fisiológicas y la activación de Yap por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , dependiente de la proteína Gxp3 e Ybp1, induciendo la formación de un enlace disulfuro entre cys303 y cys598 de Yap1 lo que impide el reconocimiento de la NES por Crm1 (modificado de Rodrigues-Pousada et al. 2019).	44
<b>Figura 8.</b> Confirmación por PCR de cepas silenciadas de los genes <i>Pc-yap1</i> y <i>Pc-rsmA</i> . <b>A</b> Diagrama de la región dentro del plásmido pGpdPki-RNAi donde se encuentran enfrentados los promotores <i>gpd</i> y <i>pki</i> y donde se insertaron los fragmentos de silenciamiento de los genes <i>Pc-yap1</i> y <i>Pc-rsmA</i> , también se indican los tamaños de amplicones esperados con los oligonucleótidos Gpd1(pki1)R y Pki1(gpd1)R si se integraron los plásmidos pGpdPki-RNAi/PcYap1 o pGpdPki-RNAi/PcRsmA en el proceso de transformación por protoplastos en Wis54-1255 y de los controles de PCR. <b>B</b> Gel de agarosa con los productos de PCR donde se usó como DNA molde en C <sup>A</sup> : Plásmido de atenuación pGpdPki-RNAi purificado y sin inserto (251 pb), C <sup>B</sup> : DNA genómico de <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255 transformado con el plásmido de atenuación pGpdPki-RNAi vacío (251 pb), C: DNA genómico de <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255 sin transformar (sin amplicon). <b>C</b> Gel agarosa con los productos de PCR donde se usó como molde DNA genómico de un lote de silenciadas de <i>Pc-yap1</i> . <b>D</b> Gel agarosa con los productos de PCR donde se usó como molde DNA genómico de un lote de silenciadas de <i>Pc-rsmA</i> . Para todos los geles, M: Marcador de peso molecular GeneRuler de 1 kb (Thermo Scientific). En círculos rojos se marcan las cepas silenciadas que se eligieron para posteriores análisis.	62

**Figura 9.** Confirmación por PCR de cepas sobreexpresadas de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*. **A** Diagrama de la fusión del *Ppki* en el codón de inicio ATG de *Pc-yap1* o *Pc-rsmA* para los plásmidos de sobreexpresión, también se indican los tamaños de los amplicones esperados con determinados pares de oligonucleótidos para la confirmación de *OE::PcYap1* y *OE::PcRsmA*. **B** Gel de agarosa con los productos de PCR del fragmento esperado con los oligonucleótidos Pki1(gpd1)F y *OE::Pcyap1*-R para la confirmación de *OE::PcYap1*, carriles A a F: DNA genómico de transformantes *OE::PcYap1*, C: DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* sin transformar. C<sup>A</sup>: DNA genómico de transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío, C<sup>B</sup>: Plásmido pPyrG-*pki::Pc-yap1* purificado. **C** Gel de agarosa con los productos de PCR del fragmento esperado con los oligonucleótidos Pki1(gpd1)F y *OE::RsmA*-R para la confirmación de *OE::PcRsmA*, carriles A a H: DNA genómico de transformantes *OE::PcRsmA*. **D** Gel de agarosa con los productos de PCR del fragmento esperado con los oligonucleótidos Pki1(gpd1)F y si-RSMA-R para la confirmación de *OE::PcRsmA*, carriles C a H: DNA genómico de transformantes *OE::PcRsmA*, C: DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* sin transformar. C<sup>A</sup>: DNA genómico de transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío, C<sup>B</sup>: Plásmido pPyrG-*pki::Pc-rsmA* purificado. Para todos los geles, M: Marcador de peso molecular GeneRuler de 1 kb (Thermo Scientific). En círculos rojos se marcan las cepas silenciadas que se eligieron para posteriores análisis.

63

**Figura 10.** RT-PCR semicuantitativa de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* en cultivos de 36 h (con 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 60 h. Del lado izquierdo se observa la intensidad de las bandas en un gel de agarosa de los productos de las reacciones de la RT-PCR, del lado derecho el análisis densitométrico de las bandas, los resultados se normalizaron con la intensidad de las bandas del gen  $\gamma$ -Actina gen que se expresa constitutivamente. La cepa de referencia que se uso es *P. chrysogenum* Wis54-1155 (Carril W) con un valor de densidad = 100, Y8: cepa si-*PcYap1*-8, Y12: si-*PcYap*-12.

64

**Figura 11.** RT-PCR semicuantitativa de las cepas silenciadas de *Pc-rsmA* en cultivos de 36 h (con 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 60 h. Del lado izquierdo se observa la intensidad de las bandas en un gel de agarosa de los productos de las reacciones de la RT-PCR, del lado derecho el análisis densitométrico de las bandas, los resultados se normalizaron con la intensidad de las bandas del gen  $\gamma$ -Actina gen que se expresa constitutivamente. La cepa de referencia que se uso es *P. chrysogenum* Wis54-1155 (Carril W) con un valor de densidad = 100, R24: cepa si-*PcRsmA*-24, R25: si-*PcRsmA*-25.

64

**Figura 12.** Colonias de cepas de control, cepas silenciadas del gen *Pc-yap1* y cepas silenciadas del gen *Pc-rsmA*. Se inocularon 4  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^4$  conidios/mL en el centro de placas Petri con medio Power y se incubaron a 28 °C para fotografiarlas a las 72 y 120 h. C1: Wis54-1255 transformada con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío.

68

**Figura 13.** Regulación de la expresión del gen *brlA* **A** Northern blot con RNA extraído a las 48 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control Wis54-1255 y Wis541255 Pga1Q204L, como controles se muestra la carga de rRNA y la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1 (ver materiales y métodos). **B** Northern blot con RNA extraído a las 120 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control Wis54-1255 y Wis541255 Pga1Q204L, como controles se muestra la carga de rRNA y

84



la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1. Los duplicados que se muestran en ambos casos son estadísticos, pero no biológicos.

**Figura 14.** Regulación de la expresión del gen *Pc-yap1* **A** Northern blot con RNA extraído a las 48 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a la cepa control Wis54-1255, como controles se muestra la carga de rRNA y la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1 (ver materiales y métodos). **B** Northern blot con RNA extraído a las 120 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a la cepa control Wis54-1255, como controles se muestra la carga de rRNA y la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1. Los duplicados que se muestran en ambos casos son estadísticos, pero no biológicos.

85

**Figura 15.** Purificación de proteínas recombinantes PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 etiquetadas con *c-myc*-6xHis. Carril M: 2  $\mu$ L de marcador Precision Plus Protein 250 kD (BIO-RAD), carril EC: Extracto crudo de proteína, las concentraciones de imidazol utilizadas fueron 100, 250, 300 y 500 mM para PcYap1::*c-myc*-6xHis, y 50, 200, 300 y 500 mM para PcRsmA::*c-myc*-6xHis y PcAtf21::*c-myc*-6xHis. Panel inferior derecho, comparación de tamaño entre PcRsmA::*c-myc*-6xHis y PcAtf21::*c-myc*-6xHis utilizando las fracciones con mayor porcentaje de purificación.

91

**Figura 16.** Esquema general de la región intergénica *pcbAB-pcbC* indicando la posición y la secuencia de las sondas PTA1-WT y PTA1-M1, en color rojo se muestra la secuencia de unión.

92

**Figura 17.** EMSA para determinar la capacidad de unión de PcYap1 y PcRsmA a la secuencia TTAGTAA. **A** Reacción de unión positiva de PcYap1 a la sonda PTA1-WT que contiene la secuencia TTAGTAA y falta de unión a la sonda PTA1-M1 que contiene la secuencia mutada CTAGTCA. **B** Prueba de unión de la proteína PcRsmA con las sondas PTA1-WT y PTA1-M1 usando como reacción de control la proteína PcYap1 contra las mismas sondas. **C** Prueba de especificidad para la unión de PcYap1 a la secuencia TTAGTAA donde PTA1-WT\* se refiere a la sonda etiquetada con biotina y PTA1-WT y PTA1-M1 son las “sondas frías” (sin etiquetado) que se adiciona en altas concentraciones que van de 50X a 200X como se indica en la parte superior del gel.

93

**Figura 18.** Análisis de la región intergénica *pcbAB-pcbC* para identificar posibles sitios de unión de PcYap1. **A** Esquema para representar la ubicación del conjunto de 6 sondas para un primer rastreo, se indica además la posición de la sonda PTA1-WT y PTA1-M1 dentro de la sonda 5. **B** EMSA con las reacciones de unión de PcYap1, los carriles 1 a 6 corresponden a reacciones de unión entre las sondas 1 a 6 con PcYap1 y como control el ultimo carril muestra la sonda 5 libre.

94

**Figura 19.** Análisis de la región intergénica *pcbAB-pcbC* para identificar posibles sitios de unión de PcRsmA. **A** EMSA con las reacciones de unión de PcRsmA, los carriles 1 a 6 corresponden a reacciones de unión entre las sondas 1 a 6 con PcRsmA. **B** EMSA para reconfirmar la unión de PcYap1 y PcRsmA a la sonda 5, como control positivo la sonda AfIR-RsmA que contiene la secuencia de unión TGACACA para RsmA en *A. nidulans*.

95

**Figura 20.** Identificación de posibles sitios de unión para PcRsmA. **A** Diseño de las sondas upPta1 y dwPta1 dentro de la sonda 5 ubicada en la región intergénica *pcbAB-pcbC*. **B** EMSA para PcRsmA contra las sondas dwPta1 y upPta1. 95

**Figura 21.** Diseño de sondas para identificación del sitio de unión para PcRsmA en la región intergénica *pcbAB-pcbC*, se muestra la posición de las primeras 6 sondas, enseguida se indica la secuencia y posición de unión para PcYap1 y PcRsmA (barras de color rojo y verde) las pequeñas barras ubicadas en la parte superior o inferior indican la hebra en la que se ubica la secuencia de unión. Se indica también la posición de las sondas upPta1 y dwPta1 junto con el diseño de las nuevas sondas que incluyen o excluyen la secuencia TGAGACA a partir de la secuencia de la sonda upPta1. 96

**Figura 22.** Identificación de posibles sitios de unión de PcRsmA en la región intergénica *pcbAB-pcbC*. **A** Ubicación de la secuencia de unión de PcRsmA; las sondas que contienen la secuencia TGAGACA (RsmA-2 y RsmA-2C) están unidas a PcRsmA, mientras que las sondas que carecen de esta secuencia (RsmA-2A y RsmA-2B) no lo están. **B** Ensayo de especificidad para la unión de PcRsmA a la secuencia TGAGACA presente en la sonda RsmA-2C-M1, donde RsmA-2C\* y RsmA-2C-M1\* se refiere a sondas etiquetadas con biotina; RsmA-2C y RsmA-2C-M1 son las "sondas frías" (sin etiquetado) que se adiciona en altas concentraciones que van de 50X a 200X como se indica en la parte superior del gel. 97

**Figura 23.** Análisis de una posible interacción entre PcYap1 y PcRsmA al unirse a sus respectivos sitios de unión. Todas las sondas elegidas contienen al menos uno de ambos sitios de unión: PcYap1 (PTA1-WT), PcRsmA (RsmA-2C) o ambos (upPta1), se probaron en reacciones independientes para cada proteína y en conjunto. Se puede observar que no se produce ningún super-retraso como producto de la interacción aparente entre las proteínas cuando una de ellas reconoce y se une a su sitio específico (carriles 3, 5), con la excepción de la reacción que incluye a la sonda upPta1 que contiene ambos sitios de unión (carril 8), sin embargo, esto no demuestra una interacción entre proteínas y se puede justificar por la formación del complejo PcYap1-upPta1-PcRsmA. 98

**Figura 24.** Análisis de la región intergénica *pcbAB-pcbC* para identificar posibles sitios de unión de PcAtf21 por EMSA, en el primer carril como control positivo se muestra la unión de PcYap1 a la sonda 5, los siguientes 6 carriles corresponden a reacciones de unión entre las sondas 1 a 6 con PcAtf21. 99

**Figura 25.** Identificación de posibles sitios de unión para PcAtf21 dentro del promotor de *penDE*. **A** Secuencias de las sondas diseñadas para el EMSA donde: *penDE*-CRE123 contiene un sitio CRE (resaltado en rojo) y dos sitios del tipo CRE (resaltados en verde), *penDE*-CRE123-M1 con la indicación de los cambios de nucleótidos para la mutación del sitio CRE (resaltado en azul), NorR4 como control con un sitio tipo CRE (resaltado en rojo) y un sitio tipo AP-1 (resaltado en morado). **B** EMSA de las reacciones de unión de PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 contra las sondas del inciso **A**, NorR4 se usó como control positivo en el experimento. 100

**Figura 26.** Identificación de posibles sitios de unión para PcYap1 y PcRsmA en el promotor de *brlA*, se muestran las sondas de prueba para el EMSA: AP1-*brlA* y AP1-*brlA*-Mut, con el sitio AP1 resaltado en rojo y el cambio en dos nucleótidos para la sonda mutada resaltado en azul, así como el PAGE nativo de las reacciones de unión. 101

**Figura 27.** Cambios de movilidad en SDS-PAGE de PcYap1 y PcRsmA tratadas con un gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de cargarlos en el gel, con el fin de determinar en 15 minutos de exposición la concentración adecuada para inducir un cambio de movilidad (paneles superiores). Además, se probaron diferentes tiempos de incubación (paneles inferiores), los tres carriles de la derecha se mezclaron con un control (sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para observar diferencia de movilidad. Los geles tenían una concentración de acrilamida del 10%, se usaron 25 µg de proteína en cada reacción bajo condiciones reductoras, carril M: 2 µL de marcador Precision Plus Protein 250 kD (BIO-RAD).

102

**Figura 28.** Cambios de movilidad en SDS-PAGE de PcYap1 y PcRsmA tratadas con 400 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y diferentes tiempos de exposición (0 a 30 minutos) antes de cargarlos en el gel, se compararon condiciones reductoras (paneles del lado izquierdo) y no reductoras (paneles del lado derecho). Los geles tenían una concentración de acrilamida del 8%, se usaron 15 µg de proteína en cada reacción, carril M: 2 µL de marcador Precision Plus Protein 250 kD (BIO-RAD).

103

**Figura 29.** Alineamiento en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) de PcYap1 de *P. chrysogenum* contra Yap1 de *S. cerevisiae* y Pap1 de *S. pombe*. Se muestra la conservación de las siguientes regiones: dominio bZIP (azul), secuencia de importación nuclear NLS (rojo), secuencia de exportación nuclear NES (rosa), dominios ricos en cisteínas N-CRD y C-CRD (naranja y lila) y en verde los residuos de cisteína clave para la formación de enlaces disulfuro descritos en Yap1.

109

**Figura 30.** Secuencia de aminoácidos de PcYap1 resaltando: en rojo las NES con sus respectivos valores de score identificadas por LocNES; en morado NES identificada en el alineamiento contra Yap1 (*S. cerevisiae*) y Pap1 (*S. Pombe*) en clustal Omega; en naranja la NLS identificada *in silico* por cNLS Mapper, en azul la región del dominio bZIP, dentro del dominio en recuadros verde fluorescente se resaltan las lisinas y argininas de la región de unión a DNA y en recuadros amarillos fluorescentes las leucinas que permiten la dimerización (zipper); en celeste los residuos de cisteínas libre conservados, en verde claro y rosa las cisteínas conservadas que forman puentes disulfuro (c394-c529 y c401-c562 respectivamente), entre corchetes grises el dominio Pap1, en amarillo el N-CRD conservado y en fucsia el C-CRD conservado.

110

**Figura 31.** Alineamiento en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) de PcRsmA de *P. chrysogenum* contra RsmA de *A. nidulans*, FCR3 de *C. albicans* y Yap3 de *S. cerevisiae*. Se muestra la conservación de las siguientes regiones: dominio bZIP (azul), secuencia de importación nuclear NLS (verde); en rosa las secuencias de exportación nuclear NES hipotéticas predichas por LocNES en PcRsmA, dominio rico en cisteínas N-CRD de *S. cerevisiae* (naranja) que no se conserva en las demás proteínas del alineamiento y en morado residuos de cisteína libres.

112

**Figura 32.** Secuencia de aminoácidos de PcRsmA resaltando: en rojo las NES con sus respectivos valores de score identificadas por LocNES; en naranja la NLS identificada *in silico* por cNLS Mapper, en azul la región del dominio bZIP, dentro del dominio en recuadros morados se resaltan las lisinas y argininas de la región de unión a DNA y en recuadros amarillos fluorescentes las leucinas que permiten la dimerización (zipper); en celeste los residuos de cisteína conservados y en verde claro la región utilizada para el desarrollo del

113

modelo de la proteína.

- Figura 33.** Red de asociación proteína-proteína de PcYap1 dada por la base de datos STRING (v11.0) con los identificadores de cada una de las proteínas asociadas. 114
- Figura 34.** Modelo tridimensional de la proteína PcYap1 resaltando en color azul el dominio bZIP y en rosa el dominio Pap1 que le confieren funcionalidad. 115
- Figura 35.** Modelo PcYap1 en listones donde se indican en azul aminoácidos básicos (+), en rojo aminoácidos ácidos (-), en gris aminoácidos neutros y en amarillo las cisteínas. 115
- Figura 36.** Alineamiento de Pap1 de *S. pombe* contra PcYap1; en color morado se muestra el cristal cargado en el PDB de Pap1 interactuando con su respectivo surco de ADN y en celeste el dominio bZIP de PcYap1. 116
- Figura 37.** Modelo del monómero de PcRsmA en listones donde se muestra en azul aminoácidos básicos (+), en rojo aminoácidos ácidos (-) y en gris aminoácidos neutros; se resalta además la región rica en leucinas y la zona de unión a DNA. 116
- Figura 38.** Alineamiento: En color naranja el cristal cargado en el PDB de Pap1 de *S. pombe*, en blanco el dímero generado para PcRsmA con Swiss-Model y en color rosa el monómero generado para PcRsmA con Chimera 1.15 rc. 117
- Figura 39.** Modelo tridimensional de PcRsmA, se muestra la interacción de PcRsmA con el surco de ADN del modelo cristalizado de pap1 de *S. pombe*. 117
- Figura 40.** Modelo propuesto para la regulación de la biosíntesis de penicilina y conidiación en respuesta al estrés oxidante mediado por PcYap1 y PcRsmA, este modelo compila todos los resultados obtenidos en este trabajo, complementados con información reportada en la literatura consultada. Creado con BioRender-com. 126

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes para una reacción de PCR con volumen final de 50 $\mu$ L que fusione el promotor de <i>pki</i> a <i>Pc-yap1</i> , los componentes se descongelan sobre una cama de hielo de manera paulatina.	52
<b>Tabla 2.</b> Componentes para una reacción de PCR con volumen final de 50 $\mu$ L que fusione el promotor de <i>pki</i> a <i>Pc-rsmA</i> , los componentes se descongelan sobre una cama de hielo de manera paulatina.	52
<b>Tabla 3.</b> Componentes de una reacción de unión con un volumen final de 20 $\mu$ L, cada componente se descongela paulatinamente en una cama de hielo para evitar la degradación.	88

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Producción de penicilina en *P. chrysogenum* Wis54-1255 bajo diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido al inicio de un cultivo sumergido. El gráfico se basa en un triplicado biológico de cada condición y las barras de error representan la desviación estándar. 66
- Gráfica 2.** Producción de conidios en *P. chrysogenum* Wis54-1255 bajo diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido al medio de cultivo sólido. El gráfico se basa en un triplicado biológico de cada condición y las barras de error representan la desviación estándar. 66
- Gráfica 3.** Crecimiento radial, comparación de cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* contra la cepa control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y la transformante con el plásmido vacío pGpdPki-RNAi (C1). El gráfico se basa en un triplicado biológico y las barras de error representan la desviación estándar. 67
- Gráfica 4.** Efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en la viabilidad de conidios sometidos a estrés oxidante con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diferentes concentraciones, el gráfico muestra el porcentaje de conidios capaces de formar colonias respecto al número inicial de conidios inoculados. El gráfico se basa en un triplicado biológico y las barras de error representan la desviación estándar. 68
- Gráfica 5.** Producción de conidios bajo condiciones de estrés oxidante con un gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que va de 0 mM (control) a 180 mM adicionado al medio de cultivo, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar. 70
- Gráfica 6.** Producción de biomasa en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar. 72
- Gráfica 7.** Producción de penicilina en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar. 73
- Gráfica 8.** Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), expresadas en unidades relativas de fluorescencia (RFU) por gramo de biomasa (como peso seco), en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi 75

vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

**Gráfica 9.** Crecimiento radial, comparación de cepas sobreexpresadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* contra la cepa control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y la transformante con el plásmido vacío PBKSpyrG (C2). El gráfico se basa en un triplicado biológico y las barras de error representan la desviación estándar.

76

**Gráfica 10.** Producción de conidios bajo condiciones de estrés oxidante con un gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que va de 0 mM (control) a 180 mM adicionado al medio de cultivo, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

77

**Gráfica 11.** Producción de biomasa en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

80

**Gráfica 12.** Producción de penicilina en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

81

**Gráfica 13.** Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), expresadas en unidades relativas de fluorescencia (RFU) por gramo de biomasa (como peso seco), en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

82

# I. INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo de microorganismos de gran interés industrial, económico y científico; desde 1940 se han empleado para producir industrialmente antibióticos, enzimas (como proteasas, pectinasas y amilasas) así como hormonas vegetales (como giberelinas); algunas especies son agentes de biocontrol, otras producen micotoxinas y otros compuestos bioactivos (como los alcaloides) que son tóxicos para humanos y otros animales, también algunos hongos y levaduras son responsables de la fermentación de la cerveza, quesos, vinos y pan.

Entender que los hongos son la fuente de compuestos tanto dañinos como beneficiosos se evidenció en dos momentos cruciales: el envenenamiento por aflatoxinas, enfermedad de los Pavos en la década de 1960 (Nesbitt et al. 1962) y el descubrimiento del primer antibiótico de amplio espectro, la penicilina, nombrada “el fármaco maravilloso” de la II Guerra Mundial (Quinn. 2013, Fierro et al. 2022).

Aunque como todos los seres vivos están regidos por el metabolismo primario enfocado a la proliferación y crecimiento mediante las rutas bioquímicas e intermediarios para la obtención de energía, reproducción celular y viabilidad, es en el metabolismo secundario donde se obtienen diversos compuestos que no son de importancia vital para la célula pero que a nivel científico e industrial son de gran relevancia.

El metabolismo secundario se puede describir como aquel que sucede en la idiofase al final de la fase exponencial de crecimiento o trofofase, es decir, una vez que se ha producido el crecimiento, pero el metabolismo sigue activo. Para que se produzca el metabolito secundario primero deben asegurarse condiciones óptimas durante la trofofase, la biosíntesis de metabolitos secundarios en hongos es un proceso complejo que generalmente involucra reacciones enzimáticas de varios pasos, controlada y regulada a diferentes niveles.

Los metabolitos secundarios de hongos son producidos por taxones específicos, mayoritariamente por hongos filamentosos de la clase Pezizomycotina Ascomycete y varias clases de Basidiomycetes, que se derivan de las vías metabólicas centrales y de los grupos de metabolitos primarios (Keller. 2019).

A diferencia de los genes que están involucrados en la síntesis de un metabolito primario que se encuentran por todo el genoma fúngico, los genes que codifican las actividades enzimáticas para



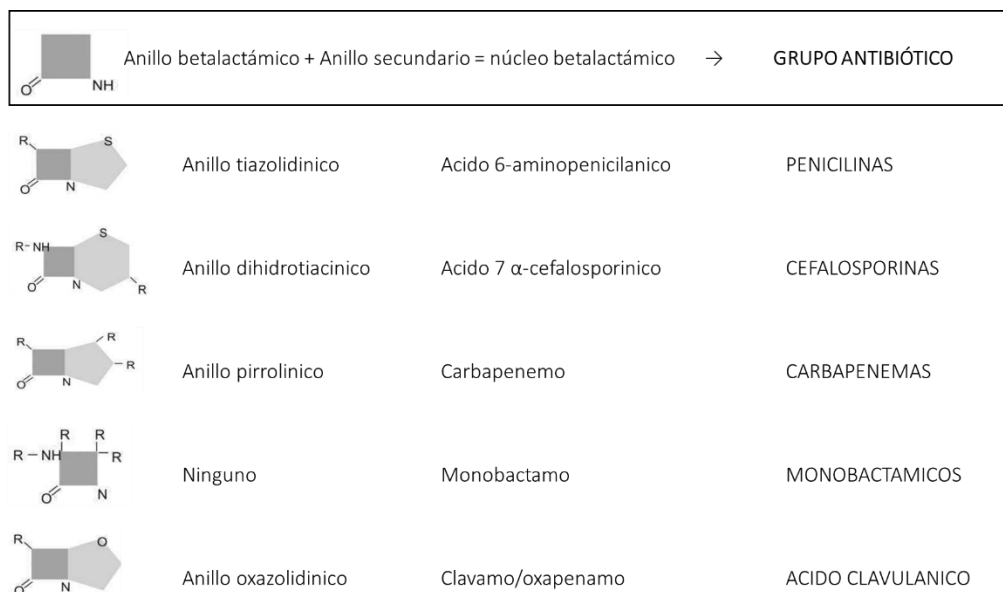
producir cualquier metabolito secundario se organizan en grupos de genes biosintéticos (Brakhage and Schroeckh. 2011).

Entender la regulación molecular del metabolismo secundario en los hongos proporciona una base teórica para mejorar la producción de metabolitos, descubrir nuevos compuestos y desarrollar el conocimiento para manipular los genes involucrados en este proceso; que finalmente, brindaran beneficios a diversas industrias como la farmacéutica, agrícola y alimentaria (Pan and Liu. 2018).

Entre los metabolitos secundarios más aprovechados por la humanidad se encuentran los antibióticos, generalmente sustancias de bajo peso molecular que tienen actividad incluso a bajas concentraciones; el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la penicilina o cefalosporina así como sus versiones sintéticas fueron transformadoras en cuanto al surgimiento de la industria farmacéutica moderna, manteniendo su importancia aun después de más de 80 años de haber sido descubiertos (Karwehl and Stadler. 2016).

### **ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS Y BIOSÍNTESIS DE PENICILINA**

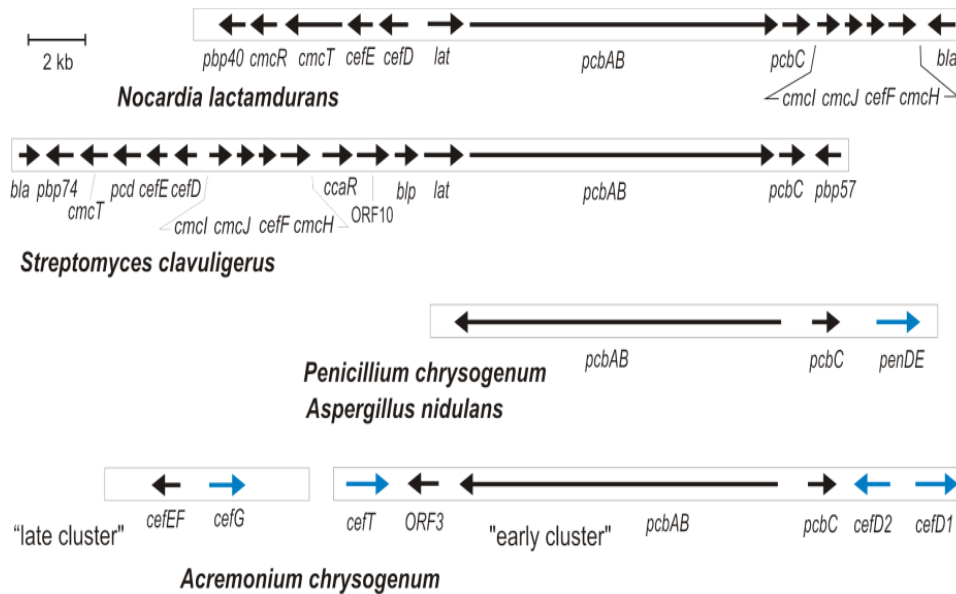
Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se caracterizan por tener en su estructura el anillo  $\beta$ -lactámico (responsable de la actividad antibacteriana) lo que define químicamente a esta familia de antibióticos. Además, este determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad (actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal) y el principal mecanismo de resistencia (las  $\beta$ -lactamasas). Para que el  $\beta$ -lactámico sea activo requiere de estar unido a otros radicales (otros anillos), formando un núcleo bicíclico que modifica las propiedades del compuesto resultante y que se usa para clasificar los  $\beta$ -lactámicos en 5 grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, clavamas y monobactamicos (Suarez and Gudiol. 2009). En la figura 1 se representa de forma esquemática la estructura básica de los diferentes grupos de  $\beta$ -lactámicos.



**Figura 1.** Clasificación de antibióticos β-lactámicos por su estructura química (Modificado de Suarez and Gudiol. 2009).

*Penicillium chrysogenum*, reidentificado como *Penicillium rubens* (Houbraken et al. 2011) es un hongo filamentosos del grupo de los ascomicetos, usado a nivel industrial en la producción del antibiótico β-lactámico penicilina, cuya ruta biosintética fue de las primeras en dilucidarse para un metabolito secundario (Liras and Martín. 2006). Se conocen muchos de los circuitos reguladores de la biosíntesis tanto en *P. chrysogenum* como en *Aspergillus nidulans*, otra especie fúngica productora de penicilina (Brakhage et al. 2004). A lo largo de los años se han usado técnicas clásicas de mutación y selección para mejorar las cepas de manera que sean altas productoras de penicilina (Jami et al. 2010, Fierro et al. 2022).

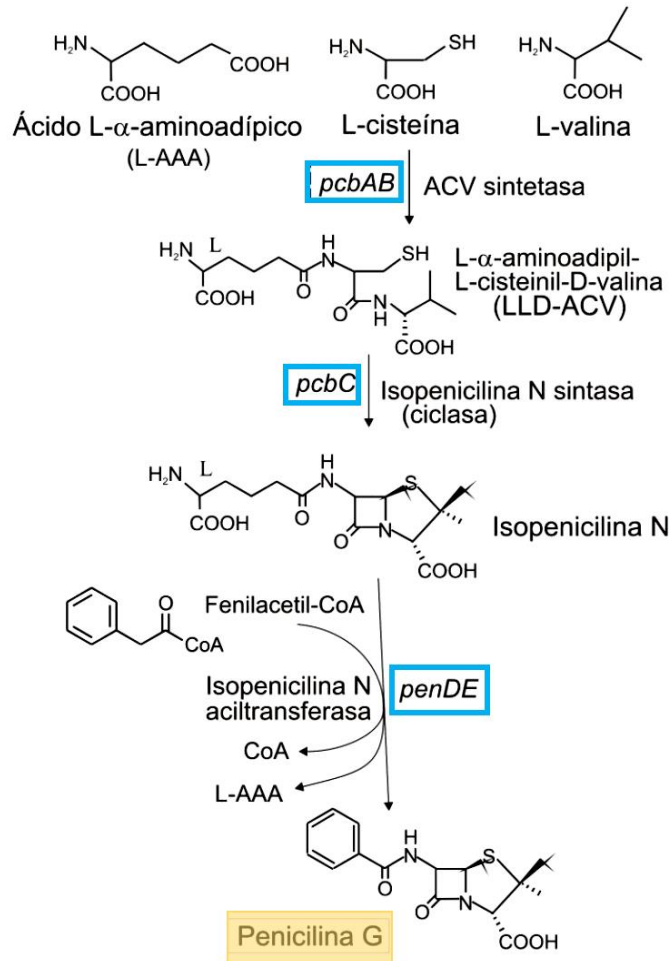
Los tres genes responsables de la biosíntesis de penicilina (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*) se encuentran agrupados en un *cluster* (Díez et al. 1990) (Figura 2) en el cual los genes *pcbAB* y *pcbC* están situados en orientación invertida, estos dos genes se cree que tienen un origen procariótico, y que fueron transferidos a hongos productores de antibióticos β-lactámicos mediante un mecanismo de transferencia horizontal de genes (Peñalva et al. 1990, Fierro et al. 2022).



**Figura 2.** Organización de los genes responsables de la biosíntesis de antibióticos β-lactámicos en organismos procariotas y en hongos, los genes indicados en color negro son genes de origen procariótico y los de color azul de origen eucariótico.

La biosíntesis de penicilina es catalizada por tres enzimas que están codificadas por los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*. La ruta biosintética consta de tres etapas claramente diferenciadas en un proceso compartimentalizado como se muestra en la figura 3 (van der Lende et al. 2002, Wu et al. 2012):

1. En el citosol la unión secuencial de los aminoácidos L-α-aminoadípico, L-cisteína y L-valina para formar el tripéptido lineal δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV), esta reacción se lleva a cabo por la enzima ACV sintetasa codificada por el gen *pcbAB* (Martin. 2000, Wu et al. 2012).
2. También en el citosol ocurre la ciclación del tripéptido ACV para formar la isopenicilina N por la eliminación de cuatro átomos de hidrogeno del tripéptido ACV consumiendo una molécula de oxígeno, este paso es catalizado por la enzima isopenicilina N sintasa codificada por el gen *pcbC* (Theilgaard et al. 2001).
3. La isopenicilina N entra al peroxisoma con ayuda de transportadores específicos en la membrana peroxisomal en donde se intercambia la cadena lateral de la isopenicilina N (ácido L-α-aminoadípico) por un ácido aromático activado en forma de acil-CoA. La reacción es llevada a cabo por la enzima isopenicilina N aciltransferasa que es codificada por el gen *penDE* (Theilgaard et al. 2001).



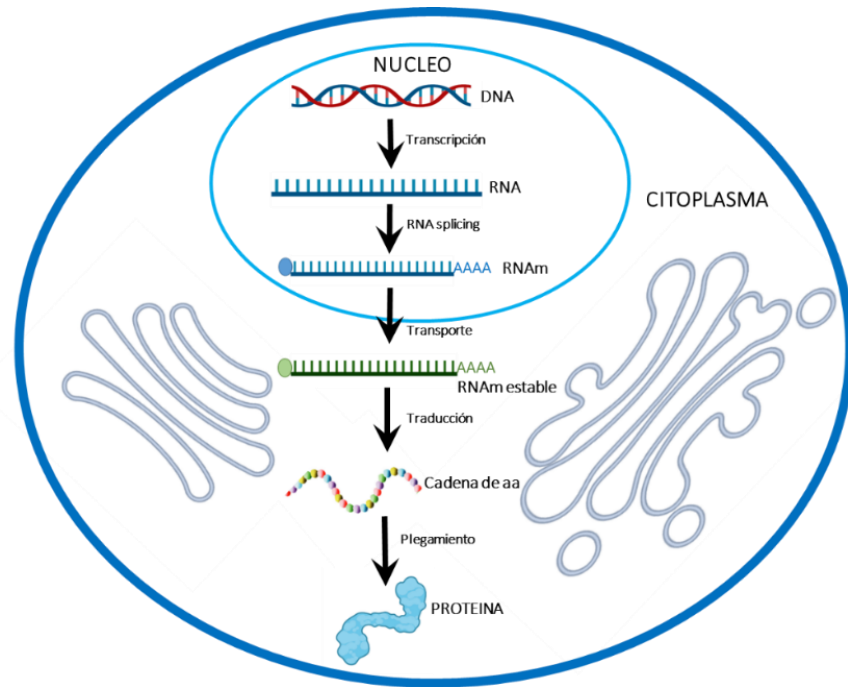
**Figura 3.** Ruta biosintética de la penicilina en *P. chrysogenum*. En los recuadros azules se indican los genes que codifican las enzimas correspondientes en cada paso de la biosíntesis.

Aunque la producción de metabolitos secundarios como la penicilina no es esencial para la supervivencia directa de los organismos que la producen, varios estudios muestran que los genes de biosíntesis de penicilina están controlados por una red reguladora compleja, por ejemplo, el pH ambiental, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, etc. (Brakhage et al. 2004). Por otro lado, en *P. chrysogenum* se logró identificar una secuencia de DNA en la región intergénica *pcbAB-pcbC* que era reconocida por una proteína de unión a DNA y cuya mutación causaba una importante disminución de la expresión de *pcbAB* (Kosalkova et al. 2000), esta secuencia se determinó mediante un ensayo de interferencia de uracilo (UIA, Uracil Interference Assay) como TTAGTAA, y la proteína que se une a ella se denominó PTA1.

El trabajo desarrollado en esta Tesis se centra en la identificación y caracterización de los factores transcripcionales que pudieran unirse a esta secuencia.

## REGULACIÓN GÉNICA DEL METABOLISMO SECUNDARIO Y HERRAMIENTAS PARA SU ESTUDIO

La regulación génica comprende todos aquellos procesos que afectan la acción de un gen a nivel de transcripción y traducción; la capacidad de los organismos para alterar sus patrones de expresión génica en respuesta a los cambios ambientales es esencial para su viabilidad (Wood et al. 2004). Cualquier paso de la expresión génica puede ser regulado, existiendo diferentes niveles de acuerdo con las necesidades de cada célula (Figura 4): Conformación y estructura del DNA, control transcripcional de la expresión génica, control postranscripcional de la expresión génica, control traduccional de la expresión génica y control postraduccional de la expresión génica.



**Figura 4.** Niveles de regulación de la expresión génica en eucariontes.

En general la célula responde a las señales extracelulares que se unen a sus receptores específicos en la membrana citoplasmática desencadenando diversas cascadas de señalización que concluyen en respuestas celulares a partir de la expresión de ciertos genes. Dentro del control transcripcional de la expresión génica se encuentra la interacción de múltiples proteínas activadoras o inhibidoras que actúan mediante su unión a secuencias específicas de reconocimiento en el DNA, estas proteínas son conocidas como factores de transcripción.

Los factores de transcripción son mensajeros nucleares de las señales extracelulares. Frecuentemente estos se fosforilan y pasan a un estado activo viajando al núcleo donde reconocen secuencias específicas localizadas en el DNA, teniendo un efecto positivo o negativo sobre la

transcripción del gen que regulan (Yan et al. 1998). Un mismo factor de transcripción puede inducir o reprimir la transcripción de uno o varios genes, también puede interactuar con otros factores formando complejos reguladores, participando así en la regulación de una gran variedad de procesos celulares, esto garantiza que se expresen los genes correctos en el momento y niveles correctos garantizando la supervivencia de la célula.

Los hongos tienen un metabolismo secundario bien desarrollado que les confiere un potencial casi ilimitado de variación metabólica crucial en el desarrollo del hongo y los capacita para desplegar sus metabolitos con diversas estructuras químicas y actividades biológicas. Sus vías de biosíntesis generalmente tienen a los genes codificantes ubicados de forma contigua en grupos de genes biosintéticos, a menudo corregulados de acuerdo con la función ecológica de su metabolito secundario codificante (Bills and Gloer. 2016, Keller. 2019).

En esto último radica la importancia de implementar técnicas experimentales como herramientas para conocer la función asociada a los genes, detectando patrones de expresión bajo determinadas condiciones de estudio que permiten dilucidar posibles rutas reguladoras.

Entre las técnicas más usadas por su efectividad se encuentra el silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia, que permite reducir la expresión de un gen mediante la introducción a nivel celular de un RNA de doble cadena pequeño activando una maquinaria celular que los reconoce y los transforma en siRNA, reacción catalizada por la enzima DICER; el complejo RISC reconoce estos siRNA que hibridan en las regiones complementarias del RNAm, evitando que codifique para proteínas específicas (Mello and Conte Jr. 2004).

En el lado opuesto se encuentra la sobreexpresión como técnica para estudiar la función génica, mediante la unión del gen de interés a un promotor fuerte o inducible que se adapte bien al metabolismo natural de la célula por medio de un vector para generar multicopias de dicho gen y así evaluar posibles cambios tanto morfológicos como en la producción de metabolitos.

En el metabolismo secundario, al ser un proceso complejo que se desarrolla a diferentes niveles, es natural que los niveles de expresión de algunos genes dependan de la expresión de otros más. El Northern blot permite detectar secuencias específicas de RNA por análisis de separación por tamaño, transferencia e hibridación de sondas específicas a partir de una muestra de RNA total permitiendo analizar un patrón particular de expresión génica (Brown et al. 2004).

Uno de los métodos más especializados para el estudio de la regulación de la expresión génica es el análisis de las interacciones proteína-DNA mediante cambio de movilidad electroforética (EMSA). Es un método rápido y sensible para detectar interacciones proteína-ácido nucleico y se basa en la observación de que la movilidad electroforética de un complejo proteína-ácido nucleico es típicamente menor que la del ácido nucleico libre (Hellman and Fried. 2007). Si bien la técnica es sencilla de implementar es lo suficientemente robusta para adaptarse a una amplia gama de condiciones de unión y a una variedad de tamaños de ácidos nucleicos y estructuras, proporcionando información de afinidad y especificidad.

### **TIPOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE REGULAN EL METABOLISMO SECUNDARIO**

La mayoría de las actividades biológicas se rigen por múltiples interacciones proteína-proteína y proteína-DNA, el fenómeno fundamental que subyace a estas interacciones es el proceso mediante el cual las proteínas buscan y reconocen sus sitios específicos en el DNA, lo que permite la transmisión de información genética para iniciar varios procesos biológicos (Yesudhas et al. 2017). Algunos ejemplos son: factores de transcripción que regulan de manera positiva o negativa el proceso de transcripción, procesos de corte y degradación de DNA e histonas por polimerasas o nucleasas para el empaquetamiento cromosómico y el proceso de transcripción, o algunos efectores que se involucran en la activación de la transcripción.

La capacidad de interacción de diversas proteínas con el DNA se da gracias a los dominios de unión que reconocen secuencias específicas de nucleótidos. Donde mejor se puede reconocer una secuencia es en el surco mayor del DNA, ya que las bases están más accesibles, y los aminoácidos que mejor reconocen estas estructuras son asparagina, glutamina, ácido glutámico, lisina y arginina, porque pueden establecer puentes de hidrógeno entre sus cadenas laterales y los pares de bases. Las proteínas utilizan una amplia gama de dominios de unión al DNA, algunos ejemplos se presentan estructuralmente en la figura 5 y se describen a continuación:

Dedos de zinc (ZF). Cuenta con dos residuos de histidina y dos de cisteína que contienen un ión zinc con enlaces coordinados, este motivo se compone de una hélice  $\alpha$  y una hebra  $\beta$  antiparalela; cuatro residuos de aminoácidos clave, ubicados en posiciones específicas en la punta del dedo, son responsables del reconocimiento del DNA mediante la creación de enlaces de hidrógeno con el surco principal. Aunque cada dominio de ZF tiene arreglos estructurales similares, las variaciones en

los residuos de aminoácidos clave impulsan un gran número de posibles combinaciones en términos de reconocimiento de secuencias de DNA (Razin et al. 2012).

Cremallera de leucina (bZIP). Las cremalleras de leucina son un dominio de interacción con DNA consistente en dos hélices  $\alpha$  anfipáticas (es decir, un lado hidrófobo y otro hidrófilo) formando una “coiled coil”, enrollamiento de las dos hélices. Tiene una región de interacción con DNA, rica en los aminoácidos básicos arginina y lisina, cargados positivamente, que interactúan electrostáticamente con los fosfatos cargados negativamente del “backbone” de la estructura del DNA. La región de cremallera tiene una serie de leucinas ubicadas cada siete residuos, que, por efecto hidrofóbico, mantienen la estructura del “coiled coil”. Así, tenemos una región hidrófoba, y dos regiones cargadas positivamente, que se repelen entre sí, la región hidrófoba permite la dimerización de la proteína, el conjunto de fuerzas resultante “retuerce” las alfa-hélices una sobre otra (Schumacher et al. 2000, Miller et al. 2003).

Hélice-giro-hélice (HTH). Se puede encontrar en varias proteínas represoras y activadoras, es el motivo más simple con dos hélices  $\alpha$  conectadas por un giro, las proteínas HTH se dimerizan y cada monómero identifica un lado de una secuencia de DNA simétrica. La hélice de reconocimiento (principalmente la segunda hélice) de los motivos HTH se une a las bases del DNA (especialmente en el surco principal) a través de interacciones hidrofobas y de hidrógeno, mientras que las otras hélices participan en el mantenimiento de la estabilidad proteína-DNA (Rigali et al. 2002).

Homeodominio (HD). Son dominios pequeños conservados con tres hélices que contienen aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, que a menudo se encuentran con dominios flanqueantes y cofactores adicionales, tienen una disposición de pliegues común, helix1 y helix2 son antiparalelas entre sí, mientras que helix3 se encuentra a través de ambos, las diferentes familias de dominios HD difieren en sus regiones del brazo N-terminal (Bürglin and Affolter. 2016).



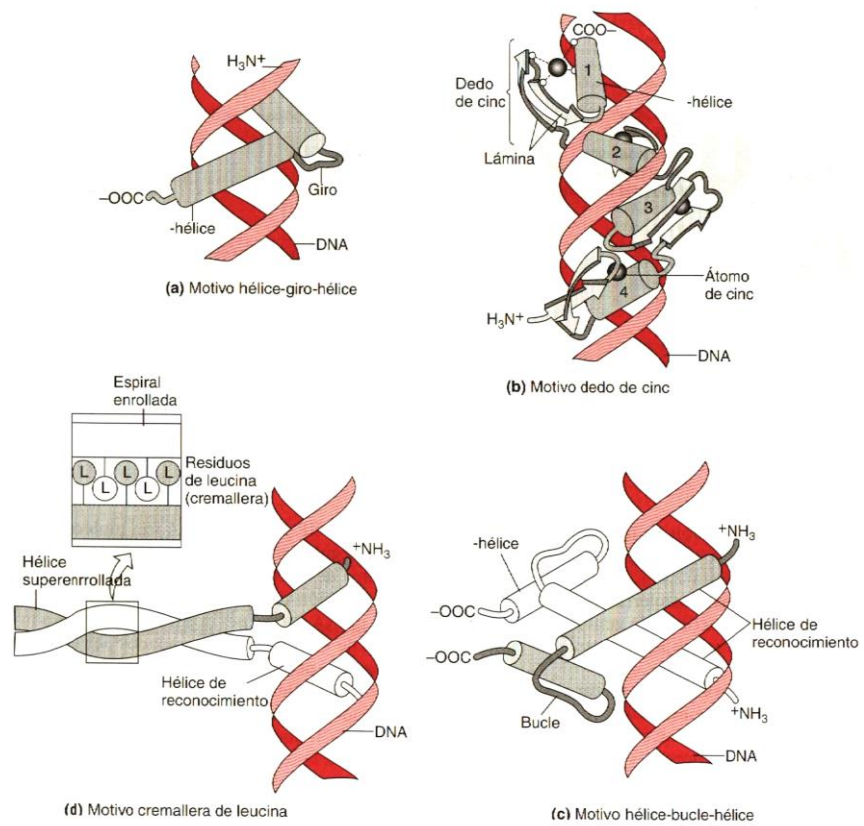


Figura 5. Figuras representativas de dominios de unión de factores de transcripción (Thieman y Palladino. 2010).

## II. ANTECEDENTES

### REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE PENICILINA EN *P. chrysogenum*

La regulación de la biosíntesis de penicilina se ha estudiado ampliamente, principalmente en *A. nidulans* y *P. chrysogenum* (Brakhage et al. 2004 y 2009, Martin et al. 2010). A diferencia de otras rutas de metabolitos secundarios de hongos no se ha podido identificar un regulador específico de los genes de penicilina. Solo se han logrado identificar reguladores globales que controlan la expresión de uno o varios de los tres genes de la ruta de penicilina como factores de transcripción de amplio dominio. Y así, se ha determinado la regulación por fuente de carbono, nitrógeno y pH, también se ha identificado el factor transcripcional *AnCF* que se une a cajas CCAAT (Caruso et al. 2002) en la región intergénica *pcbAB-pcbC* y en el promotor de *penDE* en *P. chrysogenum* también se encuentran varias cajas CCAAT.

### REGULACIÓN POR FUENTE DE CARBONO

Este tipo de regulación busca aprovechar la fuente de carbono más energética, la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* está fuertemente regulada por glucosa y sacarosa y en menor grado por maltosa, fructosa y galactosa, pero no por lactosa.

Este mecanismo es conocido como represión por fuente de carbono (represión por catabolito) en donde algunos de los genes de la ruta de biosíntesis de penicilina son reprimidos transcripcionalmente (Cepeda-García et al. 2014). Esta regulación se ejerce en diferentes niveles de la biosíntesis de penicilina: flujo del ácido L- $\alpha$ -aminoadípico, toma/activación de los precursores de la cadena lateral y en la regulación transcripcional y postranscripcional de los genes biosintéticos de penicilina.

En *P. chrysogenum* la represión por catabolito es regulada por el factor transcripcional CreA, un regulador de dominio amplio que se une a elementos reguladores en los promotores de genes diana para reprimir su transcripción. Así la transcripción del gen *pcbAB*, que codifica la primera enzima de la vía de biosíntesis de penicilina, se ve afectada, se observó que la atenuación del gen *creA* mediado por RNAi resultó en una mayor producción de penicilina cuando se usa como fuente de carbono a la glucosa (Cepeda-García et al. 2014).

## REGULACIÓN POR FUENTE DE NITRÓGENO

En hongos la fuente de nitrógeno incide de manera importante sobre la síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la regulación por nitrógeno está mediada por el factor de transcripción Nit-2, perteneciente a la familia GATA, en *Neurospora crassa* (Bernardes et al. 2017). También se conoce el factor de transcripción AREA de acción positiva, necesario para la expresión de genes implicados en la utilización de una amplia gama de fuentes de nitrógeno distintas del amonio y la glutamina en *A. nidulans* (Macios et al. 2012).

En particular los genes biosintéticos de penicilina también están sujetos a regulación por fuente de nitrógeno. Fuentes como el amonio reprimen la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC* en *P. chrysogenum* (Feng et al. 1994). También se ha caracterizado el factor transcripcional NRE, del tipo dedos de zinc, que tiene la capacidad de unirse a un lugar en la región intergénica que separa a los genes *pcbC-pcbAB* y que contiene seis sitios GATA y NRE se une a dos de ellas (Haas and Marzluf. 1995).

## REGULACIÓN POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

En principio las especies reactivas de oxígeno (ROS), al ser moléculas inestables que reaccionan fácilmente, si se acumulan pueden provocar daños en DNA, RNA y proteínas, hasta el punto de causar muerte celular. Sin embargo, en *Aspergillus terreus* Miranda et al. (2013) estableció la relación entre las ROS y la biosíntesis de lovastatina, con la acumulación repentina de ROS al inicio de la idiofase y activación los genes biosintéticos de lovastatina, incluido el factor de transcripción *lovE*. También se detectó que el gen *sod1* (proteína de defensa contra el estrés oxidante) se expresó intensamente durante la trofofase en fermentaciones de lovastatina y su expresión disminuyó radicalmente en la idiofase, indicando que la regulación a la baja de *sod1* promueve la acumulación de ROS durante la idiofase.

Más adelante se demostró la regulación positiva de las ROS sobre la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional y la importancia de *Yap1* (*Atyap1*) como factor de transcripción que relaciona las ROS con la biosíntesis de lovastatina. En la trofofase hubo una alta expresión de *Atfyap1* pero en la idiofase se reguló a la baja, indicando que *Atyap1* regula *sod1*, y además, ambos se regulan a la baja provocando la acumulación de ROS en la idiofase (Miranda et al. 2014).

La biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* y la biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium*

*chrysogenum* están reguladas por ROS, esto se demostró cuando se detectó una acumulación similar de ROS en la idiofase en fermentaciones de penicilina y cefalosporina. Cuando se adicionaron antioxidantes a las fermentaciones disminuyeron los niveles intracelulares de ROS y bajo radicalmente la producción de penicilina y cefalosporina C, por el contrario, con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oxidante exógeno) se incrementó la producción de penicilina y cefalosporina C; finalmente se demostró que estos antibióticos no presentan propiedades antioxidantes (Bibián et al. 2020). Entonces, es muy probable que la regulación de ROS sea un mecanismo general que controle el metabolismo secundario en hongos.

## REGULACIÓN POR pH

Por medio de la secreción de enzimas y metabolitos secundarios, así como de la capacidad homeostática los hongos filamentosos pueden sobrevivir y desarrollarse en un amplio intervalo de pH ambiental.

En *A. nidulans* PacC, regulador global del pH, una proteína con tres dedos de zinc del tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, está involucrado en la regulación de la transcripción del gen que codifica la isopenicilina N sintasa (Espeso et al. 1993, Tilburn et al. 1995). PacC sufre un procesamiento proteolítico cuando el pH del medio es alcalino para unirse a promotores de genes que se expresan a este pH y activar su transcripción.

Los genes de penicilina se expresan mejor a niveles de pH ligeramente alcalinos, mientras que se ven reprimidos a pH ácido en *P. chrysogenum* (Chu et al. 1997), el pH alcalino eleva los niveles de transcripción del gen *pcbC* lo que se correlaciona directamente con la presencia de siete sitios de unión a PacC en la región intergénica *pcbAB-pcbC* (Suarez and Peñalva. 1996).

## REGULACIÓN POR EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL AnCF

En *A. nidulans* se ha descrito un factor de transcripción de unión a cajas CCAAT, frecuente en regiones promotoras eucariotas como en la región de los genes de penicilina, llamado AnCF, compuesto de al menos tres subunidades denominadas HapB, HapC y HapE (Steidl et al. 2001). AnCF se une a cajas CCAAT para activar la transcripción de estos genes (Litzka et al. 1998).

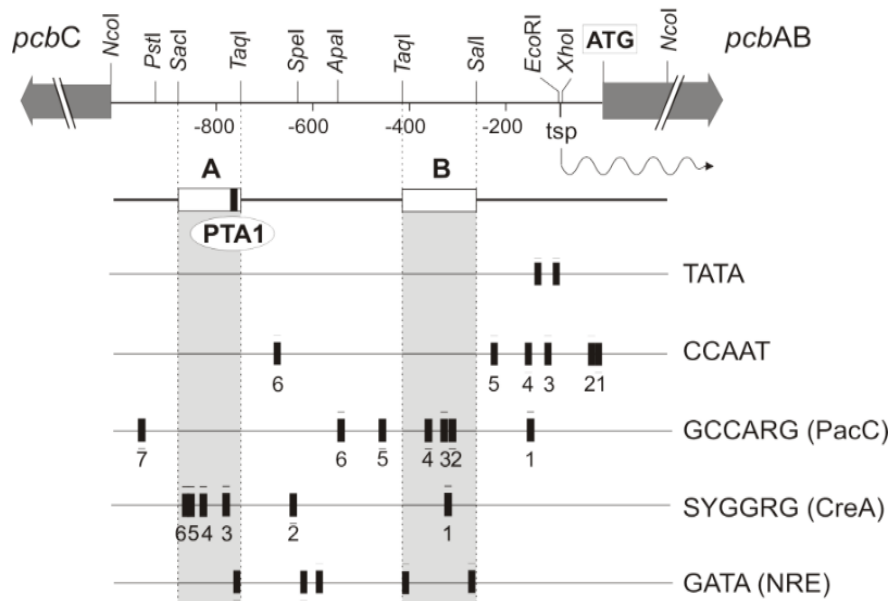
Haciendo una revisión a la región intergénica *pcbAB-pcbC*, así como al promotor del gen *penDE* de

*P. chrysogenum*, se encuentran presentes varias cajas de unión CCAAT con alto grado de similitud a las secuencias consenso de unión de AnCF.

### FACTOR TRANSCRIPCIONAL PTA1

En la región intergénica *pcbAB-pcbC* de *P. chrysogenum*, mediante un ensayo de interferencia de uracilo (UIA: Uracil Interference Assay), se identificó la secuencia heptamérica de DNA TTAGTAA, que se une de forma específica a un hipotético factor de transcripción que se nombró PTA1 (Penicillin Transcriptional Activator 1). Posteriormente, en ensayos de retardo en gel (EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay) se observó que la unión proteína-DNA era altamente específica, ya que al mutar cualquiera de los nucleótidos que conforman el heptámero se perdía la capacidad de unión del factor de transcripción (Kosalková et al. 2000).

La secuencia de unión TTAGTAA se ubica entre las posiciones -766 a -760 corriente arriba del codón ATG de inicio del gen *pcbAB*, en la región intergénica *pcbAB-pcbC*, como se muestra en la figura 6. También se resaltan otras cajas reguladoras con secuencias iguales o similares a secuencias consenso de unión de varios factores de transcripción: cajas CCAAT (factor de transcripción AnCF), cajas GCCARG (PacC), cajas SYGGRG (CreA) y cajas GATA (NRE), además de dos hipotéticas cajas TATA.



**Figura 6.** Promotor del gen *pcbAB*. Indicando: codón de inicio ATG, sitio de inicio de la transcripción (*tsp*), posición de la secuencia de unión de Pta1 (TTAGTAA), regiones A y B (importantes en la regulación del promotor), cajas TATA, cajas CCAAT, e hipotéticas cajas de unión de los factores transcripcionales PacC, CreA y NRE (Kosalková et al. 2000).

Para estudiar la función *in vivo* de la caja TTAGTAA, se hizo la fusión del promotor *pcbAB* al gen reportero *lacZ* de *Escherichia coli*. Después esta fusión se integró en el locus *pyrG* de la cepa *P. chrysogenum npe10 pyrG*, la cual tiene deletado todo el clúster de genes de penicilina (Kosalková et al. 2000). Los resultados muestran que al eliminar la caja se suprime por completo la expresión del gen *pcbAB* en cultivos en los que como fuente de carbono se usó 3% de glucosa o 3% de lactosa. Al mutar la caja TTAGTAA de manera puntual en la primera T y mutando de manera doble en la primera y quinta T, intercambiando ambas bases por C, se pudo observar en cultivos con 3% de glucosa una disminución en la expresión en un 35% y 50% respectivamente, lo que sugiere que la glucosa ejerce represión sobre el promotor del gen *pcbAB*.

### **REGULACIÓN DE LA CONIDIACIÓN EN *P. chrysogenum***

En hongos filamentosos, el metabolismo secundario a menudo está relacionado con procesos de desarrollo como la conidiación, ambos procesos están asociados con la fase de crecimiento estacionario (Adams and Yu. 1998). Se sabe que la inactivación de VelA o LaeA, ambos, parte del complejo Velvet, disminuye la conidiación y la producción de penicilina en *P. chrysogenum* (Holf et al. 2010).

Por otro lado, las proteínas G heterotriméricas en hongos regulan diferentes procesos relacionados con el desarrollo, como lo es el crecimiento de colonias y la conidiación. La regulación de la conidiación por Pga1, subunidad G $\alpha$  de una proteína G heterotrimérica, está mediada por la represión de los genes *brlA* y *wetA* (García-Rico et al. 2008). La inactivación de Pga1 aumenta la conidiación en *P. chrysogenum*, sin embargo, la síntesis de penicilina y la micotoxina roquefortina disminuye (García-Rico et al. 2008b).

Sigl et al. (2011) inactivaron *brlA* en *P. chrysogenum* y observaron que la conidiación se bloquea y la morfología de hifas se ve alterada durante el crecimiento en medio sólido, pero no afecta la producción de biomasa durante el crecimiento en medio líquido.

### **FAMILIA AP-1 DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES**

Las células por medio de la evolución han desarrollado complejas y eficientes estrategias que les permiten adaptarse a entornos variables que frecuentemente se vuelven hostiles, estos fenómenos de defensa y resistencia se desencadenan por medio de la transcripción de ciertos genes que

confieren la capacidad de soportar el estrés.

Dentro de los factores transcripcionales hablaremos de la familia AP-1, los cuales son proteínas de unión a DNA del tipo bZIP (cremallera de leucina) (Rodriguez-Pousada et al. 2010). En las levaduras, la familia de proteínas del tipo AP-1, llamada YAP (Yeast Activator Protein), es necesaria para la respuesta transcripcional al estrés oxidante comportándose como sensores del estado redox de la célula. Las proteínas YAP comparten muchas características con el complejo de factores AP-1 de mamíferos, uniéndose a secuencias de DNA muy similares (Toone et al. 2001).

Las proteínas YAP contienen una cremallera de leucina implicada en la dimerización y una región básica adyacente de unión a DNA, su secuencia preferida de unión es TGACTCA.

Se ha visto que algunos factores de transcripción YAP cambian su localización subcelular en respuesta al estrés oxidante siendo citoplasmáticos en células no estresadas, pero se acumulan rápidamente en el núcleo después de que la célula entra en contacto con agentes oxidantes debido a que comienza una cascada de señalización que culmina en la expresión de genes que codifican enzimas y moléculas antioxidantes (Kuge et al. 2001).

La familia de los factores de transcripción AP-1 es una de las más estudiadas y tiene una diversidad de efectos funcionales que se explica por el hecho de que la secuencia reguladora AP-1 se encuentra en la región promotora de genes muy diversos.

## **FACTORES TRANSCRIPCIONALES Yap1 DE LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS**

En las células eucariotas se desencadena una respuesta molecular rápida al verse expuestas a condiciones ambientales adversas lo que implica cambios en el nivel de transcripción de genes que modulan la actividad de factores de transcripción particulares. El vínculo entre las señales de estrés y el arranque de la maquinaria de transcripción lo proporcionan determinadas vías de señalización de la quinasa MAPK que se activan fuertemente por una variedad de estímulos adversos que incluyen estrés osmótico, oxidante y choque térmico, luz ultravioleta e inhibición de la síntesis de proteínas.

*Saccharomyces cerevisiae* contiene ocho proteínas bZIP de la familia YAP (*Yap1-Yap8*). De este grupo, *Yap1* y *Yap2* son activadores de la transcripción implicados en la resistencia a fármacos pleiotrópicos, y al menos cuatro miembros de la familia YAP se unen de manera eficiente a la secuencia de unión TACTAA muy similar, a la secuencia de unión de proteínas del tipo AP-1

(TGACTCA) (Fernandes et al. 1997).

Al sobreexpresar los genes *Yap1* y *Yap2* se observa un incremento en la resistencia a una variedad de fármacos y metales (Hertle et al. 1991, Schnell and Entian. 1991, Bossier et al. 1993). Además, se ha descrito que *Yap1* está involucrado en la respuesta al estrés oxidante (Kuge and Jones. 1994) afectando directamente la transcripción de al menos cuatro genes implicados en el estado de oxidación de la célula: *GSH1* que codifica la  $\gamma$ - glutamilcisteína sintetasa, *TRX2* que codifica tiorredoxina, *YCF1* que codifica un transportador de unión a ATP y *GLR1* que codifica glutatión reductasa.

Son cinco dominios los que caracterizan al factor transcripcional *Yap1*: un dominio de unión a DNA (bZIP), una secuencia de localización nuclear N-terminal (NLS), una secuencia de exportación nuclear C-terminal (NES) y dos regiones ricas en cisteína (CRD).

En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* se conoce un factor de transcripción homólogo a *Yap1*, llamado *Pap1*, proteína del tipo bZIP, que está involucrado en la resistencia a múltiples fármacos y que cuando se elimina resulta en sensibilidad a una variedad de compuestos tóxicos (Toone et al. 1998). Cuando *Pap1* se somete a un estado de oxidación por  $H_2O_2$  se promueve su acumulación nuclear y la activación de genes antioxidantes, donde la peroxiredoxina (*Tpx1*) desempeña el papel de activador de *Pap1* (Calvo et al. 2013). Las secuencias preferidas de unión de *Pap1* son TTAGTAA y TTACGTAA (Toda et al. 1992, Fujii et al. 2000). A pesar de una identidad relativamente alta entre las proteínas del tipo bZIP en hongos y levaduras, estas proteínas reconocen diversas secuencias de DNA.

En hongos filamentosos se han identificado proteínas homólogas a *Yap1* y *Pap1* de levaduras, si bien al analizar las cadenas completas de aminoácidos no se logran altos valores de identidad sí que se conservan los dominios importantes que caracterizan a los factores de transcripción *Yap1* y que los vuelve funcionales para responder a variadas condiciones de estrés.

*AfYap1*, el homólogo de *Yap1* de *Aspergillus fumigatus*, confiere resistencia contra el estrés oxidante. En una mutante  $\Delta AfYap1$  se observó hipersensibilidad a oxidantes como  $H_2O_2$  y menadiona, en contraste una cepa multicopia de *AfYap1* es resistente a ambos oxidantes además de a la diamida (Qiao et al. 2008). Si bien *AfYap1* participa en la regulación de varios genes de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS) estas proteínas antioxidantes no juegan un papel importante en la patogenicidad de *A. fumigatus* (Lessing et al. 2007).



El factor transcripcional AtfB, del tipo bZIP, se identificó por primera vez en *Aspergillus oryzae* como un factor de transcripción de la familia ATF/CREB implicado en la respuesta a estrés oxidante y la tolerancia de los conidios al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sakamoto et al. 2008). En *Aspergillus parasiticus*, AtfB está asociado a la resistencia al estrés oxidante en conidiosporas. Al silenciar *AtfB* disminuyen los niveles del metabolito secundario y carcinógeno aflatoxina y se observa deterioro en el desarrollo de conidiosporas, esto se respalda con una disminución en los niveles de proteína AtfB y la regulación por esta disminución de muchos genes del grupo de aflatoxinas y del metabolismo secundario (Roze et al. 2011, Wee et al. 2017). Su sitio de unión consiste en una secuencia compuesta de un sitio de tipo AP-1 más un sitio CRE1 adyacente.

RsmA (restaurador del metabolismo secundario A), factor transcripcional del tipo bZIP en *A. nidulans*, que tiene un moderado grado de identidad con Yap3 de *S. cerevisiae*, aumenta en gran medida la producción de metabolitos secundarios al unirse en dos sitios de la región promotora del gen *afIR* (TGACACA y TTAGTAA), el cual codifica un factor de transcripción que activa la transcripción de la esterigmatocistina, micotoxina carcinógena y hepatotóxica (Yin et al. 2012). La sobreexpresión de *rsmA* remedia parcialmente la pérdida de metabolitos secundarios en mutantes del complejo Velvet (Yin et al. 2013).

## RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDANTE

Los hongos filamentosos, como parte importante de su evolución, han desarrollado la capacidad de detectar y responder a un variado abanico de tensiones, incluida entre ellas las oxidantes, lo que les permite su supervivencia frente a cambios repentinos en su entorno que pueden ser potencialmente dañinos e incluso letales. Debido a que el desarrollo fisiológico y metabólico se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas es imposible evitar la generación de ROS, así que los hongos filamentosos cuentan con mecanismos de respuesta complejos para evitar la muerte o el daño por oxidación. Varios pasos son determinantes en estas respuestas, incluida la activación de reguladores transcripcionales involucrados en el control de la maquinaria antioxidante (Montibus et al. 2015).

Las ROS como el superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) son subproductos del metabolismo aeróbico natural, producido principalmente por la reducción parcial de oxígeno durante la respiración. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede oxidar los centros de azufre de hierro y las cisteínas en determinadas proteínas además de reaccionar con metales de transición y producir el radical

hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) que puede oxidar prácticamente cualquier molécula celular causando daño y mutaciones del DNA, inactivación de proteínas, entrecruzamiento y fragmentación de proteínas y peroxidación de lípidos. Sin embargo, las células pueden poner en marcha una serie de mecanismos para mantener niveles bajos de ROS intracelulares, que en conjunto constituyen la respuesta antioxidante. Las enzimas superóxido dismutasas (dismutan  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), catalasas (descomponen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ), peroxidasas (descomponen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la oxidación de otro sustrato), glutatión peroxidasas (usan glutatión para descomponer  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ ) y peroxiredoxinas (utilizan el poder reductor para descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ), son los efectores más comunes y frecuentes de la respuesta antioxidante mediada por enzimas (Aguirre et al. 2005 y 2006).

Diversos estudios han mostrado que cuando *S. cerevisiae* y *S. pombe*, cepas fúngicas modelo, son sometidas a desafíos por ROS de manera externa desarrollan mecanismos específicos para detectar y eliminar ROS, que siempre se han considerado subproductos dañinos inevitables del metabolismo aeróbico. También se ha encontrado evidencia que apunta a una participación de las ROS en funciones fisiológicas importantes, como un punto de control eucariota para combatir y regular el estrés oxidante. Estos mecanismos involucran: cascada de MAP quinasa de respuesta al estrés, fosforilación en múltiples etapas y el factor transcripcional del tipo AP-1 (Aguirre et al. 2005, Ikner and Shiozaki. 2005).

Yap1 fue identificado por primera vez en *S. cerevisiae*, considerado un homólogo funcional de AP-1 de mamíferos, y ha sido caracterizado a fondo como un factor de transcripción que juega un papel esencial en la inducción de genes antioxidantes. Su actividad está regulada principalmente a través de la localización nuclear, es decir, Yap1 se distribuye tanto en el citoplasma como en el núcleo, se encuentra preferentemente en el citoplasma bajo condiciones sin estrés, y se concentra en el núcleo por la exposición de las células al estrés oxidante (Kuge et al. 1997, Maeta et al. 2004).

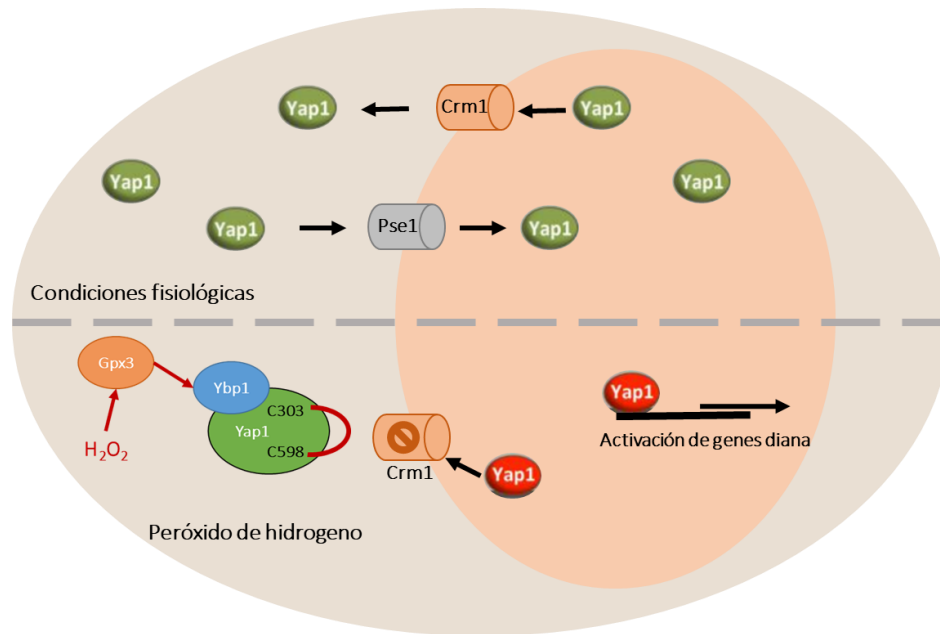
En respuesta al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Yap1 y su proteína homóloga Pap1 de *S. pombe* se acumulan en el núcleo (Delaunay et al. 2002, Toone et al. 1998), donde inducen un conjunto de genes necesarios como respuesta al estrés generado. De hecho, mutantes delecionados en los genes correspondientes desarrollan hipersensibilidad a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Algo que caracteriza a estos factores de transcripción fúngicos similares a AP-1 es que tienen dominios ricos en cisteína carboxilo terminal (C-CRD) y amino terminal (N-CRD), ambos dominios son críticos para la resistencia al estrés oxidante y para la optimización de la localización nuclear.

En general la activación de Yap1 por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 7) ocurre en minutos por oxidación, cumpliendo

así la función de sensor redox (Delaunay et al. 2000), además la actividad de Yap1 se regula por localización diferencial dependiente del factor Crm1 (receptor de exportación nuclear) (Toone et al. 1998, Yan et al. 1998). En condiciones fisiológicas Yap1 se ubica en el citoplasma, ingresando al núcleo por la importina Pse1 y saliendo del núcleo por la exportina Crm1 (Rodrigues-Pousada et al. 2019), pero permanece en el núcleo como respuesta al estrés oxidante (Kuge et al. 1997, Toone and Jones. 1999). En estado reducido la NES, ubicada dentro del CRD, está expuesta e interactúa con Crm1 (Delaunay et al. 2002, Rowe et al. 2012), permitiendo que Yap sea exportado desde el núcleo, esta interacción se inhibe bajo condiciones de estrés oxidante por una modificación en la conformación que oculta la NES debido a la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre la cys303 y cys598, esto bloquea el reconocimiento de Crm1 y se evita la exportación al citoplasma por lo tanto Yap se acumula en el núcleo (Kuge et al. 1998, Yan et al. 1998, Wood et al. 2004, Rodrigues-Pousada et al. 2019).

La acumulación de Yap1 en el núcleo activa un conjunto de genes importantes implicados en la resistencia a oxidantes (Kuge et al. 1998, Qiao et al. 2008). Además, varios estudios indican que los genes implicados en la reparación del DNA, la replicación y el control del ciclo celular pueden ser activados por Yap1 (Monteiro et al. 2008).

Dentro de los cinco dominios característicos de Yap1 (un dominio tipo b-ZIP, una secuencia NLS, una secuencia NES y dos regiones CRD), se debe resaltar que la primer región CRD (dominio N-CRD) contiene cys303, cys310 y cys315, mientras que el CRD C-terminal (dominio C-CRD) contiene cys598, cys620 y cys629, y la oxidación de estas cisteínas es fundamental para regular la localización nuclear de Yap1 (Fernandes et al. 1997, Delaunay et al. 2000, Mendoza-Martínez et al. 2020).



**Figura 7.** Representación de la localización de Yap1 entre el núcleo y el citoplasma en condiciones fisiológicas y la activación de Yap por  $H_2O_2$ , dependiente de la proteína Gpx3 e Ybp1, induciendo la formación de un enlace disulfuro entre cys303 y cys598 de Yap1 lo que impide el reconocimiento de la NES por Crm1 (modificado de Rodrigues-Pousada et al. 2019).

## HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Si bien los avances en la investigación científica mayoritariamente han sido respaldados por trabajo experimental *in vivo*, se ha vuelto evidente el aporte que brinda la bioinformática usando recursos computacionales para solucionar problemas a una escala de magnitud que sobrepasa cualquier discernimiento. El avance en las tecnologías ha hecho que se den pasos agigantados en el desarrollo de herramientas, como servidores y librerías virtuales, que son un soporte ideal para el respaldo, análisis e interpretación de una enorme y creciente avalancha de datos de millones de proteínas, muchas de las cuales no se han caracterizado experimentalmente y tal vez nunca lo sean.

Los campos más populares y útiles en el análisis y la interpretación de diversos tipos de datos incluyen estudio de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, dominios de proteínas y estructura de proteínas, volviéndose estas tareas casi rutinarias dentro del estudio de un organismo.

Un área en particular que se ha estudiado es el análisis de la regulación de diversos genes por factores de transcripción, así como la interacción entre sí y con sus socios vinculantes ya que eso diversifica su funcionalidad. Un acercamiento interesante a estas relaciones es a través de plataformas bioinformáticas, que cada vez son más precisas. A continuación, se mencionan solo algunas de las herramientas disponibles en la red y utilizadas en el presente trabajo que

enriquecieron mucho las investigaciones mostrando nuevas perspectivas y ofreciendo respaldo teórico a procedimientos experimentales.

cNLS Mapper. Programa de predicción de señales de localización nuclear (NLS) de alta precisión que calcula las puntuaciones de actividad NLS mediante el uso de perfiles basados en la actividad, pero no en la secuencia, para diferentes clases de NLS específicos de la vía de la importina  $\alpha/\beta$  clásica, donde la importina  $\alpha$  reconoce una NLS y la importina  $\beta$  interactúa con componentes del complejo de poro nuclear para permitir translocación. Además, usa un algoritmo de puntuación de motivos basado en la aditividad, con lo que se consigue una precisión de predicción significativa en términos de sensibilidad y especificidad (Kosugi et al. 2009).

LocNES. Predictor de señales de exportación nuclear (NES), péptidos análogos cortos que guían a las proteínas fuera del núcleo a través de la vía de exportación mediada por la proteína Crm1. LocNES escanea secuencias de proteínas buscando péptidos que por consenso se ajusten como una NES asignando una matriz de puntuación específica de posición para calcular un puntaje de probabilidad de péptidos a los candidatos con el modelo Support Vector Machine (Xu et al. 2015).

STRING v11.0 (Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins). Base de datos que tiene como objetivo recopilar, puntuar e integrar todas las fuentes de información de interacción proteína-proteína disponibles públicamente y complementarlas con predicciones computacionales, para construir una red global integral y objetiva que incluya interacciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) a través de una alta cobertura de información, facilidad de uso del sistema y un sistema de puntuación consistente y eficiente (Szklarczyk et al. 2019).

I-Tasser (Iterative Threading ASSEMBly Refinement). Algoritmo automatizado de predicción estructural y de función biológica para una proteína a partir de su secuencia, a través de un reconocimiento de pliegues basado en subprocesos, seguido de un reensamblaje de estructuras basado en fragmentos y simulaciones de perfeccionamiento. La interfaz enfatiza específicamente la interpretación biológica de los resultados del modelado para garantizar estructuras de alta resolución y predicciones precisas de funciones proteicas (Zheng et al. 2019).

SWISS-MODEL. Servidor de modelado por homología de proteínas, que incluye el modelado de complejos homo y heteroméricos a partir de las secuencias de aminoácidos de los fragmentos que interactúan. Se hace uso de estructuras de proteínas experimentales (plantillas) para construir modelos de proteínas objetivo, tiene la capacidad de manejar información ambigua o conflictiva presente en los datos estructurales disponibles, que es crucial para el desarrollo de pipeline

estables y completamente automatizados con una estimación de calidad a nivel de estructura terciaria y cuaternaria (Waterhouse et al. 2018).

MODELLER. Programa informático para el modelado comparativo de estructuras tridimensionales de proteínas, se parte de un alineamiento entre la secuencia a modelar contra estructuras relacionadas conocidas implementando un método inspirado en la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de proteínas denominado satisfacción de restricciones espaciales, que utiliza un conjunto de criterios geométricos para crear una función de densidad de probabilidad para la ubicación de cada átomo en la proteína, calculando automáticamente un modelo que contiene todos los átomos que no son de hidrogeno (Webb and Sali. 2016).

### III. JUSTIFICACIÓN

A lo largo del tiempo en el desarrollo de la biotecnología el hongo filamentoso *P. chrysogenum* ha sido relevante por su capacidad para producir el antibiótico  $\beta$ -lactámico penicilina, cuyo descubrimiento, entre otras cosas, tuvo una influencia decisiva en el desarrollo de la medicina moderna. Generar conocimiento científico que permita entender los procesos regulatorios que influyen ya sea de manera negativa o positiva en la ruta biosintética de la penicilina es importante para el mejoramiento de cepas productoras y el perfeccionamiento de la producción a nivel industrial.

La secuencia TTAGTAA regula la expresión del gen *pcbAB*, el primero de la vía biosintética de penicilina, y es la secuencia de unión a un factor de transcripción no identificado y denominado PTA1 (Kosalková et al. 2000). Esta secuencia es idéntica o muy similar a las secuencias de unión de factores de transcripción de tipo Yap en diversos hongos y levaduras. Considerando que factores de este tipo se han relacionado con la respuesta al estrés oxidante y con el metabolismo secundario en algunos hongos, se puede hipotetizar que uno o más factores transcripcionales de este tipo están involucrados en la regulación de la expresión del gen *pcbAB*, afectando así la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

## IV. HIPÓTESIS

La biosíntesis de penicilina está regulada por especies reactivas de oxígeno y el sitio de unión TTAGTAA juega un papel importante en este proceso con la participación de uno o más factores transcripcionales del tipo AP-1 de *Penicillium chrysogenum*.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Análisis de la participación de factores transcripcionales del tipo AP-1 de *P. chrysogenum* en la respuesta al estrés oxidante y en la producción de penicilina.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificación de la secuencia de unión a DNA de los factores transcripcionales PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 en los promotores de los genes de penicilina.
- Análisis de la influencia del estrés oxidante en los procesos de producción de penicilina y conidiación.
- Estudio de la participación de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en la producción de penicilina mediante atenuación y sobreexpresión.
- Estudio de la participación de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en la respuesta al estrés oxidante
- Análisis morfológico y de producción de conidios en cepas con diferentes fondos genéticos de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*.
- Análisis bioinformático de las características estructurales y de función de las proteínas que codifican los factores transcripcionales AP-1.

# VI. ANÁLISIS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES\*

### MICROORGANISMOS

*Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089/DSM 1075), reidentificada como *Penicillium rubens*, NCBI taxonomy ID: 1108849 (Houbraken et al. 2011), usada como cepa de referencia y para experimentos de transformación, se considera una cepa de media-baja capacidad productiva (Elander. 1983, Jami et al. 2010); obtenida por mutación y selección de la cepa *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (de tipo silvestre) (Cantoral et al. 1987, Díez et al. 1990), esta cepa posee una sola copia de la agrupación de genes biosintéticos de penicilina.

*Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *pyrG*, es una cepa derivada de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, auxótrofa de uridina, ya que tiene mutado el gen *pyrG*, mutación obtenida de manera aleatoria con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (Diez et al. 1987), usada como cepa para experimentos de transformación.

*Penicillium chrysogenum* Q204L, cepa que contiene una mutación de activación constitutiva del gen de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas, se obtuvo por transformación de la cepa Wis54-1255 con un plásmido portador de un alelo activador dominante del gen *pga1* (*pga1*<sup>Q204L</sup>) que codifica una subunidad  $G\alpha$  de la proteína G heterotrimérica de *P. chrysogenum* (Zúñiga León. 2021) utilizada como cepa control en Northern blot para la determinación de la represión transcripcional del gen *brlA*.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983), usada como cepa huésped para la amplificación de plásmidos de silenciamiento, sobreexpresión y expresión heteróloga. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes/ $\mu$ g de DNA), posee una delección en el gen *lacZ* del operón *lac*, susceptible de ser complementada por determinados plásmidos de clonación.

*Micrococcus luteus* ATCC-9341 (Álvarez et al. 1987), bacteria Gram positiva de la familia de las *Micrococcaceae*, usada como cepa de valoración contra penicilina G en bioensayos.

---

\* Los esquemas de los fragmentos amplificados por PCR, mapas de plásmidos y construcciones, así como las secuencias de oligonucleótidos usados experimentalmente en este apartado se encuentran detallados en Material suplementario.



## CONDICIONES DE CULTIVO

Para la conidiación de *P. chrysogenum* Wis54-1255, Wis54-1255 *pyrG* y Q204L se utilizó una alícuota de un concentrado de conidios en glicerol al 40% y se inocularon placas de medio Power incubando a 26 °C por 7 días aproximadamente hasta la conidiación, en el caso de la cepa Wis54-1255 *pyrG* se usó además uridina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 100 µg/mL para la reversión de su auxotrofia.

En la obtención de micelio de *P. chrysogenum* Wis54-1255, Wis54-1255 *pyrG* y Q204L se inocularon  $5 \times 10^8$  conidios recién colectados en 100 mL de medio PMMY y se incubó a 250 rpm, 28 °C por 36 h para la extracción de RNA, y por 18-20 h para la formación de micelio joven necesario para la obtención de protoplastos, en el caso de la cepa Wis54-1255 *pyrG* el medio se complementó con uridina a una concentración final de 100 µg/mL para la reversión de su auxotrofia.

La regeneración de protoplastos se realizó por cobertera en medio de cultivo mínimo Czapek con estabilizador osmótico Sorbitol 1M, como agente de selección de transformantes atenuadas se usó el antibiótico fleomicina (InvivoGen) a partir de 30 µg/mL, se incubaron las placas a 28 °C por 5-7 días hasta observar la formación de colonias.

Para medición de especies reactivas de oxígeno (ROS), formación de biomasa y producción de penicilina se utilizaron  $5 \times 10^8$  conidios recién colectados de las cepas control y transformantes correspondientes y se inocularon en 100 mL de medio MCIP incubando a 250 rpm, 28 °C por 24 h, después de este tiempo se tomaron 8 mL del medio inóculo con biomasa desarrollada y se añadieron a 50 mL de medio MCFP por triplicado biológico y se incubó a 250 rpm, 28 °C por 120 h.

Se inoculó *M. luteus* ATCC-9341 con una alícuota de un glicerol al 20% en medio TSB para la obtención de biomasa o TSB+2% de agar bacteriológico por estría con asa bacteriológica para aislamiento de colonia, se incubó a 200 rpm (para medio líquido), 30 °C por 12 h, para los bioensayos se ocupó TSB con 1% de agar bacteriológico para permitir la difusión del antibiótico presente en las muestras de medio de cultivo.

*E. coli* DH5α se inoculó en 25 mL de medio LB con 10-12 colonias aisladas y se incubaron a 200 rpm, 37 °C por 9 h para convertirlas en ultracompetentes (Inoue et al. 1990, Hengen. 1996), se tomaron 2.5 mL para inocular 250 mL de medio LB manteniéndolo a 200 rpm, 18 °C por aproximadamente 48 h hasta alcanzar una  $DO_{600} = 0.5-0.6$ . Se usó LB con 2% de agar bacteriológico

y ampicilina a 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) para la regeneración de transformantes, incubando a 37 °C por 12 h.

### **OBTENCIÓN DE CÉLULAS *E. coli* ULTRACOMPETENTES**

Una vez obtenida la DO indicada en CONDICIONES DE CULTIVOS se colocó el cultivo en un baño de hielo por 10 min y se centrifugó a 5000 rpm, 4 °C por 10 min; las células se resuspendieron en 80 mL de amortiguador TB frío y se mantuvieron en hielo por 10 min, se centrifugó a 5000 rpm, 4 °C por 10 min, las células se resuspendieron en 20 mL de amortiguador TB más 1.4 mL de DMSO frío y se mantuvieron en hielo por 10 min, se repartieron en alícuotas de 100 µL almacenando a -70 °C hasta su uso.

Para transformar se usó una alícuota de 50 µL de *E. coli* ultracompetentes y se mezcló con la cantidad necesaria de plásmido más un control negativo, se incubaron en hielo por 30 min, el choque térmico se hizo a 42 °C por 2 min y se volvieron a colocar en hielo añadiendo 800 µL de medio LB, la regeneración se realizó como se indica en el apartado de CONDICIONES DE CULTIVO.

### **PLÁSMIDOS DE SILENCIAMIENTO MEDIADO POR RNAi PARA *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA***

Se planteó seguir una estrategia basada en el silenciamiento génico mediado por RNAi, por su eficacia para reducir la expresión de genes como lo describe Ullán et al. (2008) y Cepeda-García et al. (2014). A partir de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* clonados previamente en el plásmido pBluescript KS+ y usando los pares de oligonucleótidos: siYAP1-R y siYAP1-F, siRSMa-R y siRSMa-F se amplificó por PCR un fragmento del exón 2 del gen *Pc-yap1* (458 pb) y un fragmento del exón 3 del gen *Pc-rsmA* (409 pb), respectivamente, con la polimerasa *pfu* Ultra II (Agilent Technologies) con 68 °C de hibridación y 30 seg de extensión.

Estos fragmentos se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), se cuantificaron y se verificó tamaño e integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Los fragmentos de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*, así como el plásmido pGpdPki-RNAi se digirieron con la enzima de restricción NcoI (Thermo Scientific) usando 5 U de enzima por cada µg de DNA, el plásmido además se trató con 1 U de FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) por cada µg de DNA plasmídico lineal, posteriormente se purificaron las digestiones con

el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

La reacción de ligación se realizó con 2 U de T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) usando una relación plásmido-inserto de 1:5 y se mantuvo a 13 °C por 12 h obteniendo los plásmidos pGpdPki-RNAi/PcYap1 o pGpdPki-RNAi/PcRsmA, donde los fragmentos de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* se insertaron en el sitio de restricción NcoI ubicado entre los dos promotores constitutivos orientados en sentido opuesto (*gpd* de *A. nidulans* y *pki* de *A. niger*).

La conservación y amplificación de ambas construcciones se realizó en células ultracompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### PLÁSMIDOS PARA SOBREEXPRESIÓN DE *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA*

Se diseñaron oligonucleótidos para la fusión de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* al promotor constitutivo del gen *pki* de *A. niger* para la construcción de plásmidos de sobreexpresión: pPyrG-*pki::Pc-yap1* y pPyrG-*pki::Pc-rsmA*. Considerando las  $T_M$  de los pares de oligonucleótidos, la longitud de los fragmentos y la diferencia de tamaño entre ellos que se compensó con la concentración del material genético en la reacción, se diseñaron los ciclos de la PCR así como las mezclas de reacción.

En una primera PCR usando como molde 50 ng de DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 con los oligonucleótidos PcYap1-Ter-F y PcYap1-Ter-R se amplificó el gen *Pc-yap1* más 300 pb del terminador dando un fragmento total de 2181 pb y con los oligonucleótidos RsmA-Ter-F y RsmA-Ter-R se amplificó el gen *Pc-rsmA* más 300 pb del terminador dando un fragmento de 1327 pb; usando la polimerasa *pfu* Ultra II con 63 °C de hibridación y 2 min de extensión para ambos casos.

En una segunda PCR se obtuvo el promotor *pki* usando como molde 50 ng del plásmido pGpdPki-RNAi con los oligonucleótidos pki-PcYap1-F/pki-PcYap1-R y pki-RsmA-F/pki-RsmA-R para cada una de las fusiones donde se obtuvo un fragmento de 1041 pb; usando la polimerasa *pfu* Ultra II con una temperatura de hibridación de 53 °C y 1 min de extensión, todas estas PCR's se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

En una tercera PCR se fusionó cada uno de los genes al promotor *pki* con la siguiente mezcla de reacción para *Pc-yap1*:

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua estéril	36 µL
Amortiguador	5 µL
<i>PcYap1</i> -Ter (20 ng)	1 µL
<i>pki-PcYap1</i> (40 ng)	1 µL
dNTP's (10 mM) (Thermo Scientific)	1 µL
<i>pki-PcYap1</i> -F (20 mM)	2.5 µL
<i>PcYap1</i> -Ter-R (20 mM)	2.5 µL
<i>pfu</i> Ultra II	1 µL

**Tabla 1.** Componentes para una reacción de PCR con volumen final de 50 µL que fusione el promotor de *pki* a *Pc-yap1*, los componentes se descongelan sobre una cama de hielo de manera paulatina.

Incorporando al inicio de la PCR un ciclo largo con la hibridación a 57 °C por 5 min y la extensión por 10 min, seguido de 30 ciclos regulares con la hibridación a 57 °C por 1 min y la extensión por 4 min.

Y en el caso de *Pc-rsmA* se usó la siguiente mezcla de reacción:

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua estéril	36 µL
Amortiguador	5 µL
<i>PcRsmA</i> -Ter (30 ng)	1 µL
<i>pki-PcRsmA</i> (40 ng)	1 µL
dNTP's (10 mM) (Thermo Scientific)	1 µL
<i>pki-RsmA</i> -F (20 mM)	2.5 µL
<i>RsmA</i> -Ter-R (20 mM)	2.5 µL
<i>pfu</i> Ultra II	1 µL

**Tabla 2.** Componentes para una reacción de PCR con volumen final de 50 µL que fusione el promotor de *pki* a *Pc-rsmA*, los componentes se descongelan sobre una cama de hielo de manera paulatina.

Con 64 °C de hibridación y 3 min de extensión. Las PCR's se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

Se digirieron 10 µg del fragmento *pki-PcYap1*-Ter y el plásmido PBKSpyrG, derivado del plásmido pBluescript que contiene el gen *pyrG* de *P. chrysogenum*, con las enzimas de restricción: EcoRV (Thermo Scientific) y SpeI (Thermo Scientific), y 10 µg del fragmento *pki-PcRsmA*-Ter y el plásmido PBKSpyrG con las enzimas de restricción: KpnI (Thermo Scientific) y XhoI (Thermo Scientific) para la inserción de los fragmentos en el plásmido.

Estas digestiones se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa para cortar y purificar las bandas de cada fragmento con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, se realizó la ligación con 2.5 U de T4 DNA ligasa usando 150 ng de inserto y 50 ng de plásmido. La conservación y amplificación de ambas construcciones se realizó en células ultracompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### **OBTENCIÓN DE CEPAS SILENCIADAS Y SOBREENPRESADAS DE *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA***

Para la transformación por protoplastos se siguió el protocolo descrito por Cantoral et al. (1987), se colectaron  $5 \times 10^8$  conidios de *P. chrysogenum* Wis54-1255 (para la atenuación) o Wis54-1255 *pyrG* (para la sobreexpresión) y se inocularon en medio PMMY hasta que el tubo germinativo alcanzo una longitud media equivalente a unas 10-15 veces el diámetro de un conidio, el micelio se recuperó a través de un filtro nytal de 30  $\mu\text{m}$  de poro (Merck Millipore) y se lavó con 100 mL de NaCl 0.9% para eliminar restos de medio de cultivo.

Se resuspendieron 2 gr de biomasa húmeda con 10 mL de TPP y se prepararon 10 mL de una solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) disueltas en TPP a una concentración final de 20 mg/mL, esta solución se esterilizó con un filtro de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Merck Millipore), se mezclaron ambas preparaciones en un matraz estéril y se incubó a 80 rpm y 28 °C monitoreando la liberación de protoplastos al microscopio cada hora.

La suspensión de protoplastos se filtró a través de un filtro nytal de 30  $\mu\text{m}$  de poro, el efluente se centrifugó a 2500 rpm, 4 °C por 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió suavemente con KCM hasta un volumen final de 5 mL. Se realizó un recuento del número de protoplastos en una cámara de Neubauer (Marienfeld), se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se resuspendieron con el volumen necesario para una concentración de  $2.5 \times 10^8$  protoplastos/mL en KCM con 10% de PCM.

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión final de protoplastos y se mezclaron con 10  $\mu\text{g}$  del plásmido de interés purificado más un control para poder determinar la capacidad de regeneración, así como la reversión, se mantuvieron en hielo durante 20 min, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de PCM y se mezcló suavemente manteniendo a temperatura ambiente por 20 min, el polietilenglicol del PCM se diluyó con 600  $\mu\text{L}$  de KCM.

Se inocularon por cobertera en medio Czapek/Sorbitol 1 M usando el marcador de selección necesario, más los controles para reversión y regeneración (en diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), se incubó a 28 °C monitoreando la aparición de colonias. La selección de transformantes se realizó mediante pases a diferentes medios de cultivo descartando posibles falsos positivos:

1<sup>er</sup> pase: Medio Czapek picando las colonias aisladas.

2<sup>o</sup> pase: Medio PW sembrando de forma masiva con ayuda de NaCl 0.9%.

3<sup>er</sup> pase: Medio Czapek inoculando con conidios en una dilución en serie para obtener colonias aisladas.

4<sup>o</sup> pase: Medio PW inoculando con colonias totalmente aisladas homocariontes.

5<sup>o</sup> pase: Medio PW de manera masiva para recoger conidios que se conservaron en glicerol -20 °C.

#### **CONFIRMACIÓN DE CEPAS SILENCIADAS Y SOBREEXPRESADAS DE *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA***

Las transformantes se cultivaron en medio PMMY para extracción de DNA, el micelio se lavó dos veces con NaCl 0.9% y se colocó en tubos de 2 mL con perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro (Biospec) para romper en el equipo MINIBEADBEATER (Biospec) por un periodo de 3 min.

Una vez roto el micelio se realizó la extracción de DNA genómico con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), el DNA se cuantificó y se corrió un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad.

Para la confirmación por PCR se tomaron 50 ng de DNA genómico de las cepas silenciadas y como controles el plásmido purificado pGpdPki-RNAi, DNA de *P. chrysogenum* Wis54-1255 transformada con el plásmido pGpdPki-RNAi sin inserto y DNA de *P. chrysogenum* Wis54-1255 sin transformar. Se usaron los oligonucleótidos Pki1(gpd1)F y Gpd1(pki1)R, estos amplifican un fragmento de 148 pb del promotor *pki* y 103 pb del promotor *gpd* y si se integraron los fragmentos de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* se esperaban fragmentos de 709 pb y 660 pb, respectivamente, usando la polimerasa *pfu* Ultra II con 64 °C de hibridación y 1 min de extensión.

Con estas cepas silenciadas además se realizó una RT-PCR semicuantitativa usando como molde RNA extraído de micelio a las 36 h (con la adición de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo) y 60 h de inoculado un cultivo liquido en medio PMMY siguiendo el protocolo descrito por Domínguez-Santos et al. (2012), se usaron los oligonucleótidos qPcYap1-F/qPcYap1-R para medir la expresión

del gen *Pc-yap1* y los oligonucleótidos qRsmA-F/qRsmA-R para medir la expresión del gen *Pc-rsmA* y como gen de control se usó el gen Pc20g11630 (*γ-actina*) amplificando un fragmento con los oligonucleótidos qactA-F/qactA-R.

En el caso de las cepas *OE::PcYap1* se confirmaron por PCR usando 50 ng de DNA genómico de las cepas sobreexpresadas y como controles DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* sin transformar y los plásmidos purificados PBKSpyrG y pPyrG-*pki::Pc-yap1*. Se usaron los oligonucleótidos Pki1(gpd1)F y OE-PcYap1-R que amplifican un fragmento de 604 pb que incluye, 154 pb del promotor *pki* y 450 pb hasta el fin del exón 1 del gen *Pc-yap1*, usando la polimerasa *pfu* Ultra II con 54 °C de hibridación y 1 min de extensión.

Finalmente, las cepas *OE::PcRsmA* se confirmaron por PCR usando 50 ng de DNA genómico de las cepas sobreexpresadas y como controles DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* sin transformar y los plásmidos purificados PBKSpyrG y pPyrG-*pki::Pc-rsmA*. Se usaron los oligonucleótidos Pki1(gpd1)F y OE-RsmA-R que amplifican un fragmento de 571 pb que incluye, 154 pb del promotor *pki* y 417 pb hasta el fin del exón 2 del gen *Pc-rsmA*, y una segunda confirmación con los oligonucleótidos Pki1(gpd1)F y siRSMa-R que amplifican un fragmento de 1098 pb que incluye, 154 pb del promotor *pki* y 944 pb del gen *Pc-rsmA*, usando la polimerasa *pfu* Ultra II con 55 °C de hibridación y 1 min de extensión.

## **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PARA LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDANTE**

Era importante, dada nuestra hipótesis sobre la función de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*, determinar el posible efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante exógeno en procesos como la conidiación y la producción de penicilina; por lo cual, previo a una caracterización más detallada, se pusieron a punto los siguientes ensayos para seleccionar una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> idónea.

### **Influencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la producción de penicilina de *P. chrysogenum* Wis54-1255**

El cultivo se preparó como se indica en CONDICIONES DE CULTIVO por triplicado biológico en el medio MCFP con *P. chrysogenum* Wis54-1255, probando las siguientes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich): 25, 50, 100, 150 y 200 mM como oxidante exógeno.

Se tomaron alícuotas de 2 mL de cada cultivo desde el tiempo 0 y hasta las 96 h, cada 24 h, en tubos estériles previamente pesados y etiquetados, se centrifugó a 14000 rpm, temperatura

ambiente por 10 min, el medio de cultivo se recuperó en tubos limpios y se almacenó a 4 °C para bioensayos. La biomasa se lavó con 1 mL de NaCl 0.9% resuspendiendo con vortex durante 30 seg y se centrifugó a 14000 rpm, temperatura ambiente por 10 min, se desechó el sobrenadante y se añadió 1 mL de HCl 0.1M resuspendiendo con vórtex durante 30 seg finalmente se centrifugó a 14000 rpm, temperatura ambiente por 10 min desechando el sobrenadante y colocando los tubos con biomasa en una estufa a 60 °C por 72 h para medición de peso seco.

Para medir penicilinas totales se realizaron bioensayos (García-Estrada et al. 2008) con una curva de penicilina G (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 µg/mL) por duplicado, 50 µL por triplicado de cada muestra de medio de cultivo y como cepa de valoración *M. luteus* a una  $DO_{final}=0.01$  en TSA con 1% de agar bacteriológico, las placas de bioensayo se refrigeraron a 4 °C por 2 h para permitir que el antibiótico difundiera en el medio y posteriormente se incubaron a 30 °C por 12-15 h y se midieron los halos de inhibición.

#### **Influencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la conidiación de *P. chrysogenum* Wis54-1255**

Se inocularon por triplicado biológico 50 µL de una suspensión con  $1 \times 10^6$  conidios/mL en medio de esporulación incubando a 28 °C. Se colectaron conidios cada 24 h, por 120 h, y se realizó el conteo en cámara Neubauer, esta misma cinética se realizó adicionando al medio de cultivo concentraciones de 20, 50, 100, 140 y 180 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante exógeno para ver el efecto del estrés oxidante sobre la conidiación.

#### **Supervivencia de conidios al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Para evaluar la sensibilidad de los conidios al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se tomaron por triplicado 100 µL de una suspensión de  $1 \times 10^4$  conidios/mL de las cepas silenciadas y sus respectivos controles y se mezclaron con 900 µL de NaCl 0.9% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las siguientes concentraciones: 0 (control), 100, 130, 160 y 180 mM. Se homogeneizó y se mantuvieron por 20 min a temperatura ambiente, se tomaron 50 µL de estas mezclas y se inocularon en medio PDA incubando a 28 °C por 24 h después de lo cual se contaron las colonias presentes en cada placa.



## **ANÁLISIS DE CEPAS SILENCIADAS Y SOBREENPRESADAS DE *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA***

### **Crecimiento radial**

Se inocularon por triplicado biológico 3  $\mu\text{L}$  de una suspensión con  $1 \times 10^4$  conidios/mL en el centro de placas Petri con medio PDA incubando a 28 °C, se midió el crecimiento radial de micelio cada 24 h por 144 h.

### **Cinética de conidiación y resistencia a estrés oxidante**

Se inocularon por triplicado biológico 50  $\mu\text{L}$  de una suspensión con  $1 \times 10^6$  conidios/mL en medio de esporulación incubando a 28 °C, se colectaron conidios cada 24 h, durante 120 h, y se realizó el conteo en cámara Neubauer. Esta misma cinética se repitió adicionando al medio de cultivo concentraciones de 20, 50, 100, 140 y 180 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante exógeno para ver el efecto del estrés oxidante sobre la conidiación.

### **Producción de penicilina y bioensayo de estrés oxidante**

El cultivo se preparó como se indicó en CONDICIONES DE CULTIVO por triplicado biológico en el medio MCFP bajo dos condiciones: sin  $\text{H}_2\text{O}_2$  y con 100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante exógeno adicionado al momento de inocular los triplicados biológicos.

Las alícuotas se tomaron desde el tiempo 0 y hasta las 120 h, cada 24 h, procesándolas para medición de peso seco y penicilinas totales como se indica en el apartado anterior: Influencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la producción de penicilina de *P. chrysogenum* Wis54-1255.

### **Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las ROS se cuantificaron siguiendo el método modificado descrito por Miranda et al. (2014), se evaluaron dos condiciones: sin adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y con 100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el tiempo 0 para inducción de estrés oxidante, se usó el mismo cultivo de la medición de producción de penicilina, se tomaron 2 mL de muestra desde el tiempo 0 hasta las 120 h, cada 24 h, 1 mL para la adición de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína) (Sigma-Aldrich) y 1 mL como reacción control, se centrifugó a 14000 rpm, temperatura ambiente por 10 min y se eliminó el medio de cultivo. La biomasa se resuspendió con 1 mL de PBS frío, en oscuridad se adicionó  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  manteniendo en hielo por 40 min, se colocaron por triplicado 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra en una microplaca de 96 pozos y se leyó a 485 nm de excitación y 530 nm de

emisión en un lector de placas de fluorescencia DTX 880 con detector multimodo (Beckman-Coulter), la señal obtenida se normalizó con el contenido de biomasa (por medio de peso seco).

## NORTHERN BLOT

Para el Northern blot se elaboró un protocolo basado en la técnica estándar de Northern blot que usa sondas radioactivas (Sambrook. 1989), sustituyendo la radioactividad por el uso de quimioluminiscencia. En medio Power con un disco de papel filtro grado 3MM (Whatman) encima se inocularon  $1 \times 10^6$  conidios de *P. chrysogenum*: Wis54-1255, Q204L, si-*PcRsmA*-24, si-*PcRsmA*-25, si-*PcYap1*-8 y si-*PcYap1*-12, y se incubaron a 28 °C; se hizo un raspado de la biomasa a las 48 h y 120 h para la extracción de RNA por el método de Trizol (Ambión Life Technologies) y se conservó a -80 °C hasta su uso.

Se verificó la integridad del RNA por electroforesis y el revelado sirvió como referencia para cuantificar por densitometría además de cuantificarse cada una de las muestras en un lector de microplaca Epoch (Biotek), se hicieron cálculos para usar 10 µg de RNA por cada muestra en el Northern blot.

Se preparó un gel de agarosa desnaturalizante al 1.2% con MAE a una concentración final 1X y 3% de formaldehído, las muestras se mezclaron con tampón de carga para RNA 1.25X en relación 1:1 y la electroforesis se corrió en MAE 1X a 80 V por aproximadamente 180 min.

La transferencia se realizó por capilaridad en amortiguador SSC 10X con papel filtro 3MM y una membrana de nylon Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare), después de 12-16 h, el RNA en la membrana se fijó en el UVC 500 Crosslinker (Amersham Bioscience) irradiando a 1200 que equivalen 956 Joules por 15 seg.

A partir de DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 se amplificó una sonda de prueba de 573 pb del gen Pc06g00470 (*brlA*) con los oligonucleótidos qbrlA-1F y qbrlA-1R. También se usó el fragmento de atenuación del gen *Pc-yap1* (458 pb) como segunda sonda de prueba, para la sonda control se usó el gen Pc20g11630 (*γ-actina*) obteniendo por PCR un fragmento de 508 pb con los oligonucleótidos qAct-1F y qAct-1R.

El marcaje de las sondas se realizó con el Biotin DecaLabel DNA Labeling kit (Thermo Scientific) y se cuantificaron en un lector de microplaca Epoch para obtener valores de ng/ $\mu$ L y la relación A260/180, se almacenaron a -20 °C hasta su uso

Para la hibridación se desnaturalizó DNA de esperma de salmón (Sigma-Aldrich), a la membrana de la transferencia se le añadió 20 mL de solución de hibridación suplementada con DNA de esperma de salmón desnaturalizado a una concentración de 500  $\mu$ g/mL y se incubó a 42 °C durante 3 h.

Las sondas marcadas se hirvieron 10 min para desnaturalizar y se enfriaron en hielo, se añadieron las sondas desnaturalizadas a 20 mL de solución de hibridación en una concentración de 15 ng/mL con DNA de esperma de salmón desnaturalizado a una concentración de 100  $\mu$ g/mL. Se decantó la primera solución de la membrana y se sustituyó por la nueva preparación incubando a 42 °C por 12 h.

Se añadió solución de lavado I durante 15 min a temperatura ambiente, se desechó el líquido y se realizó un segundo lavado con solución de lavado I durante 15 min a 42 °C, un tercer lavado con solución de lavado II durante 15 min a 42 °C y un lavado final con solución de lavado II durante 15 min a 65 °C.

Para la detección de la señal se siguió el protocolo indicado por el kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Scientific) y el equipo ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD) con la aplicación Chemiluminescent blot, la densidad relativa de las señales de hibridación se determinó con el software ImageLab 6-0.1 (BIO-RAD).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el programa NCSS 12 Data Analysis (2018 NCSS, LLC) considerando producción específica de penicilina, ROS, biomasa y conidiación como variables de respuesta. Se hizo una comparación múltiple de medias de Tukey Kramer ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### ORTÓLOGOS DE Yap1, RsmA y AtfB EN EL GENOMA DE *P. chrysogenum*

En el genoma de *P. chrysogenum* se identificó un gen que mantiene identidad con Yap1 de *S. cerevisiae* y Pap1 de *S. pombe* registrado con el código Pc20g15280, tiene una longitud de 1884 pb y codifica para una proteína de 582 aminoácidos. Esta proteína tiene un 28% de identidad general con Yap1 de *S. cerevisiae*, 41% y 52% en dos regiones conservadas de 107 y 58 aminoácidos ubicados en los extremos N- y C-terminal, respectivamente, 63.6% de identidad general con AfYap1 de *A. fumigatus* y 39.6% con Fgap1 de *Fusarium graminearum*, también presenta una identidad del 56% en la región conservada del extremo amino de 70 aminoácidos y 25% en la mitad de la región C-terminal del regulador Pap1 de *S. pombe*.

No se encontró ninguna otra proteína en el genoma de *P. chrysogenum* con alta identidad con Yap1, por lo que se considera a Pc20g15280 como ortólogo de *Yap1* y para fines de este trabajo lo llamaremos *Pc-yap1*, y es candidato para unirse a la secuencia reguladora TTAGTTA en el promotor *pcbAB*.

Un segundo gen registrado con el identificador Pc12g16510, presenta homología con RsmA, proteína similar a Yap3 que regula el metabolismo secundario en *A. nidulans*, *A. fumigatus* y *Pestalotiopsis fici*, tiene una longitud de 1031 pb codificando una proteína de 299 aminoácidos, en esta secuencia se localizó en la parte central un dominio bZIP. Esta proteína presenta una identidad con RsmA de *A. nidulans* de 59.4%, un 43.2% de identidad con PfZipA (ortólogo de RsmA) de *P. fici* y la mayor similitud en el genoma de *S. cerevisiae* es con Yap3p con un 23.4% de identidad, con Fcr3p de *Candida albicans* se observó una identidad de 29.1%.

Pc12g16510 es otro candidato para unirse a la secuencia TTAGTAA por ser ortólogo de RsmA que se une *in vitro* a una secuencia TTAGTAA en el promotor del gen regulador del grupo de esterigmatocistina AfIR de *A. nidulans* (Yin et al. 2012) y que para este estudio lo llamaremos *Pc-rsmA*.

Un gen registrado con el identificador Pc21g08330, con una longitud de 960 pb y que codifica para una proteína de 319 aminoácidos, presenta una identidad de 45.8% con Atf21 de *Aspergillus flavus*, AtfB de *A. parasiticus* y AtfB de *A. oryzae*, 58.7% de identidad con Atf21 de *Aspergillus clavatus* y 54.9% de identidad con Atf21 de *A. fumigatus*.

Otro factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés oxidante en algunos *Aspergilli* es AtfB/Atf21 (Hong et al. 2013, Fountain et al. 2016), perteneciente a la familia de factores de transcripción ATF/CREB (Hai and Curran. 1991) que se unen como homo o heterodímeros a la secuencia consenso TKACGTMA que coincide con la secuencia reguladora TTAGTAA, con la adición de una base S, una de estas secuencias es TTACGTAA que se encuentra en la región promotora del gen *penDE* en la posición -697 corriente arriba del codón de inicio ATG, por lo tanto, decidimos nombrar a la proteína que codifica Pc21g08330 como PcAtf21.

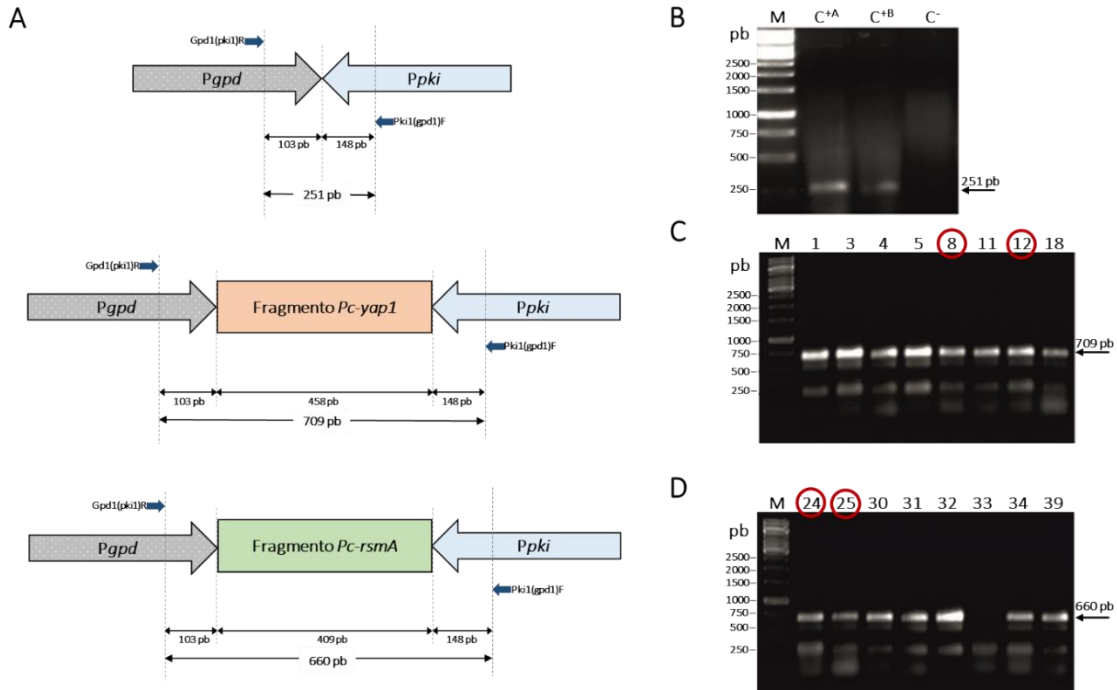
Esta información respaldada con literatura plantea la posibilidad de que uno o varios de estos genes de *P. chrysogenum* regulan el metabolismo secundario, en particular la producción de penicilina, y además están involucrados en la respuesta a estrés oxidante, por lo que a través de análisis experimentales y bioinformáticos se buscara determinar su participación en estos procesos.

Los genes Pc20g15280, Pc12g16510 y Pc21g08330 se clonaron en el plásmido pBLUESCRIPT KS+ para su conservación y estas construcciones se usaron como molde para la amplificación por PCR de los fragmentos necesarios para obtener plásmidos de silenciamiento y sobreexpresión, además de las construcciones para la expresión de proteína heteróloga.

## **CONFIRMACIÓN DE CEPAS CON LOS GENES SILENCIADOS Y SOBREENPRESADOS**

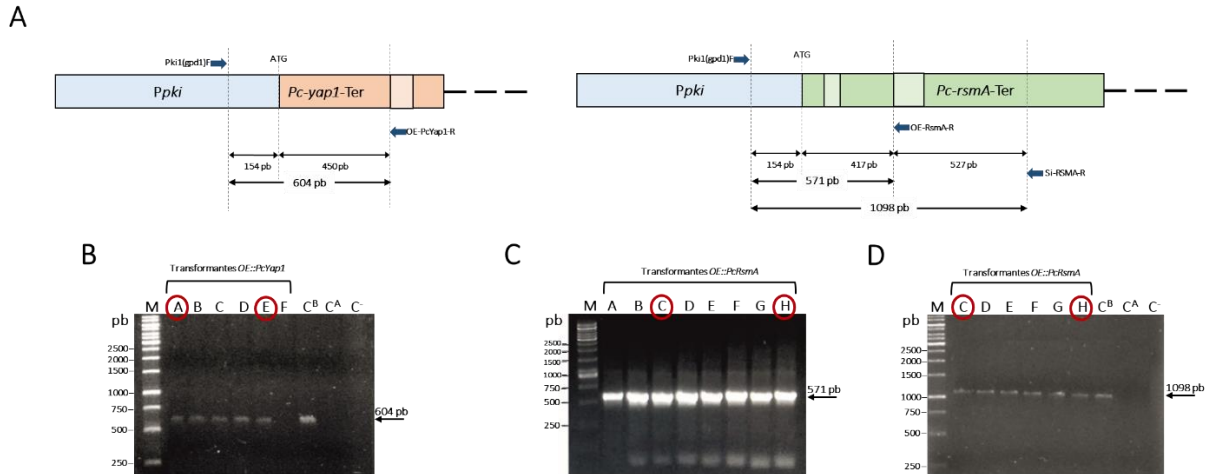
Después de la transformación por protoplastos y la correspondiente selección indicada en PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES se obtuvo un lote de aproximadamente 50 transformantes silenciadas y sobreexpresadas. Se realizó una extracción de DNA para llevar a cabo reacciones de PCR buscando amplificar fragmentos determinados que revelaran la transformación exitosa de las cepas Wis54-1255 y Wis54-1255 *pyrG*.

En el caso de las cepas silenciadas, como se muestra en la figura 8, se confirmaron y seleccionaron dos transformantes de cada gen, en el caso del gen *Pc-yap1* se buscaron aquellas muestras que amplificaran un fragmento de 709 pb y con *Pc-rsmA* las que amplificaran un fragmento de 660 pb.



**Figura 8.** Confirmación por PCR de cepas silenciadas de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*. **A** Diagrama de la región dentro del plásmido pGpdPki-RNAi donde se encuentran enfrentados los promotores *gpd* y *pki* y donde se insertaron los fragmentos de silenciamiento de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*, también se indican los tamaños de amplicones esperados con los oligonucleótidos Gpd1(pki)R y Pki1(gpd1)F si se integraron los plásmidos pGpdPki-RNAi/*PcYap1* o pGpdPki-RNAi/*PcRsmA* en el proceso de transformación por protoplastos en Wis54-1255 y de los controles de PCR. **B** Gel de agarosa con los productos de PCR donde se usó como DNA molde en C<sup>+</sup>A: Plásmido de atenuación pGpdPki-RNAi purificado y sin inserto (251 pb), C<sup>+</sup>B: DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 transformado con el plásmido de atenuación pGpdPki-RNAi vacío (251 pb), C: DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 sin transformar (sin amplicon). **C** Gel agarosa con los productos de PCR donde se usó como molde DNA genómico de un lote de silenciadas de *Pc-yap1*. **D** Gel agarosa con los productos de PCR donde se usó como molde DNA genómico de un lote de silenciadas de *Pc-rsmA*. Para todos los gels, M: Marcador de peso molecular GeneRuler de 1 kb (Thermo Scientific). En círculos rojos se marcan las cepas silenciadas que se eligieron para posteriores análisis.

En la figura 9 se muestran las transformantes que se seleccionaron después de amplificar por PCR los fragmentos deseados para confirmarlas como cepas de sobreexpresión, con el gen *Pc-yap1* se buscó un fragmento de 604 pb y con *Pc-rsmA* un fragmento de 571 pb.

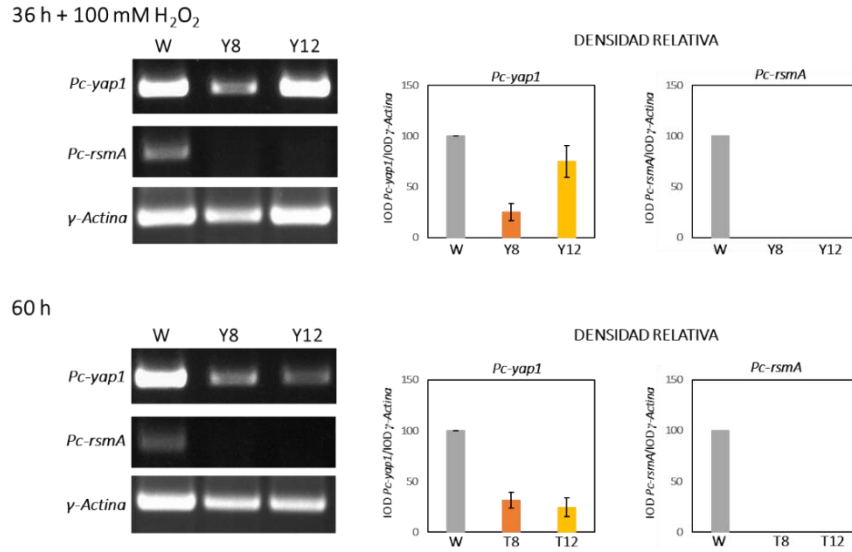


**Figura 9.** Confirmación por PCR de cepas sobreexpresadas de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*. **A** Diagrama de la fusión del *Ppki* en el codón de inicio ATG de *Pc-yap1* o *Pc-rsmA* para los plásmidos de sobreexpresión, también se indican los tamaños de los amplicones esperados con determinados pares de oligonucleótidos para la confirmación de *OE::PcYap1* y *OE::PcRsmA*. **B** Gel de agarosa con los productos de PCR del fragmento esperado con los oligonucleótidos *Pki1(gpdl)F* y *OE::Pcyap1-R* para la confirmación de *OE::PcYap1*, carriles A a F: DNA genómico de transformantes *OE::PcYap1*, C: DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* sin transformar. C<sup>A</sup>: DNA genómico de transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío, C<sup>B</sup>: Plásmido pPyrG-*pki::Pc-yap1* purificado. **C** Gel de agarosa con los productos de PCR del fragmento esperado con los oligonucleótidos *Pki1(gpdl)F* y *OE::RsmA-R* para la confirmación de *OE::PcRsmA*, carriles A a H: DNA genómico de transformantes *OE::PcRsmA*. **D** Gel de agarosa con los productos de PCR del fragmento esperado con los oligonucleótidos *Pki1(gpdl)F* y *si-RSMA-R* para la confirmación de *OE::PcRsmA*, C: DNA genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* sin transformar. C<sup>A</sup>: DNA genómico de transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío, C<sup>B</sup>: Plásmido pPyrG-*pki::Pc-rsmA* purificado. Para todos los gels, M: Marcador de peso molecular GeneRuler de 1 kb (Thermo Scientific). En círculos rojos se marcan las cepas silenciadas que se eligieron para posteriores análisis.

A partir de un cultivo líquido con 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se extrajo RNA a las 36 h y una segunda extracción se realizó a las 60 h de un cultivo sin tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se realizó una RT-PCR semicuantitativa, a continuación, se muestran los resultados obtenidos.

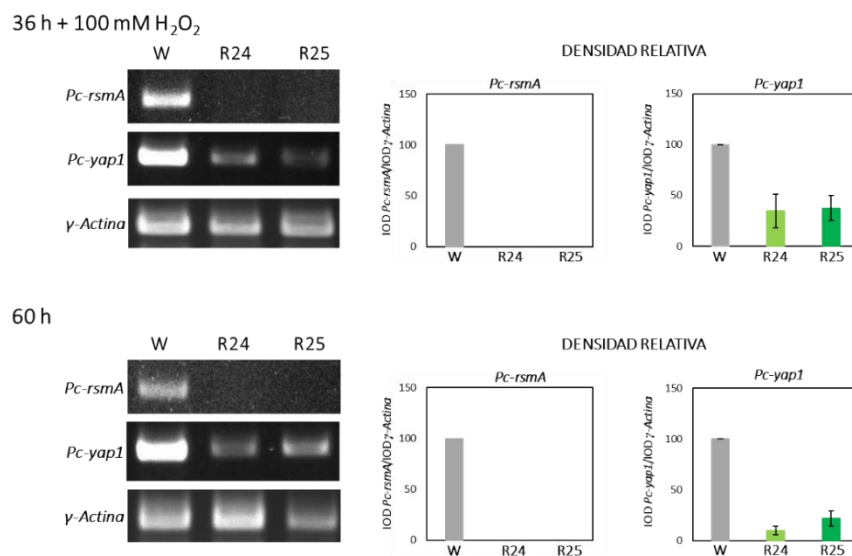
En la figura 10 se muestra los resultados de la RT-PCR de las cepas silenciadas de *Pc-yap1*, se observa que la expresión de *Pc-yap1* a las 36 h disminuye un 75% para la mutante *si-PcYap1-8* y un 25% menos para la mutante *si-PcYap1-12* en comparación con la cepa de control Wis54-1255, el mismo fenómeno se observó a las 60 h con una disminución del 69% en la expresión de *Pc-yap1* en *si-PcYap1-8* y 75% menos en *si-PcYap1-12*.

La expresión de *Pc-rsmA* es indetectable en ambos tiempos de muestreo con esta técnica de medición. Estos resultados apuntan a la posibilidad de que *PcYap1* regule positivamente la transcripción de *Pc-rsmA*.



**Figura 10.** RT-PCR semicuantitativa de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* en cultivos de 36 h (con 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 60 h. Del lado izquierdo se observa la intensidad de las bandas en un gel de agarosa de los productos de las reacciones de la RT-PCR, del lado derecho el análisis densitométrico de las bandas, los resultados se normalizaron con la intensidad de las bandas del gen  $\gamma$ -Actina gen que se expresa constitutivamente. La cepa de referencia que se uso es *P. chrysogenum* Wis54-1155 (Carril W) con un valor de densidad = 100, Y8: cepa si-*PcYap1*-8, Y12: si-*PcYap*-12.

Al medir los niveles de transcripción de *Pc-yap1* en cepas atenuadas en el gen *Pc-rsmA* por RT-PCR se pudo observar que la expresión de *Pc-yap1* fue menor en las cepas silenciadas en comparación con la cepa de control Wis54-1255 (Figura 11). A las 36 h con el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la intensidad de la señal de *Pc-yap1* se vio disminuida en alrededor del 65% para ambas cepas y a las 60 h la señal se reduce en más del 80% para ambas cepas, este resultado indica que *Pc-rsmA* regula de manera positiva la transcripción del gen *Pc-yap1*.



**Figura 11.** RT-PCR semicuantitativa de las cepas silenciadas de *Pc-rsmA* en cultivos de 36 h (con 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 60 h. Del lado izquierdo se observa la intensidad de las bandas en un gel de agarosa de los productos de las reacciones de la RT-PCR, del lado derecho el



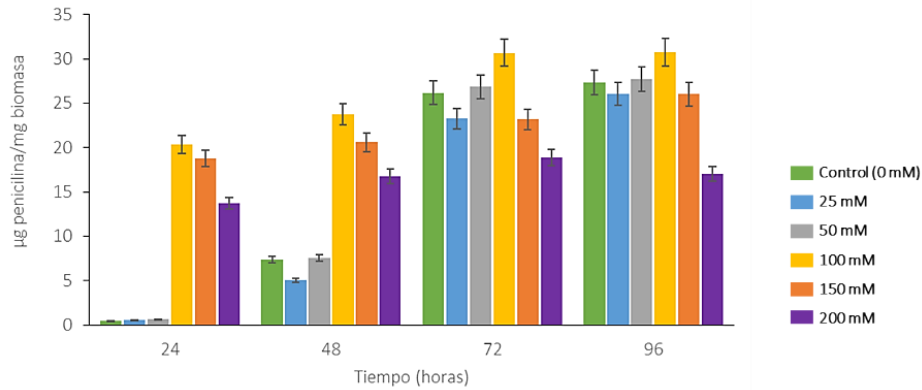
análisis densitométrico de las bandas, los resultados se normalizaron con la intensidad de las bandas del gen  $\gamma$ -Actina gen que se expresa constitutivamente. La cepa de referencia que se uso es *P. chrysogenum* Wis54-1155 (Carril W) con un valor de densidad = 100, R24: cepa si-*PcRsmA*-24, R25: si-*PcRsmA*-25.

Para ambos casos al observar los resultados, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induce una respuesta a estrés oxidante lo que se ve reflejado en una mayor transcripción de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* sin llegar a los niveles de la cepa de control, esto por efecto del silenciamiento.

### **INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDANTE SOBRE LA CONIDIACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PENICILINA DE *P. chrysogenum* Wis54-1255**

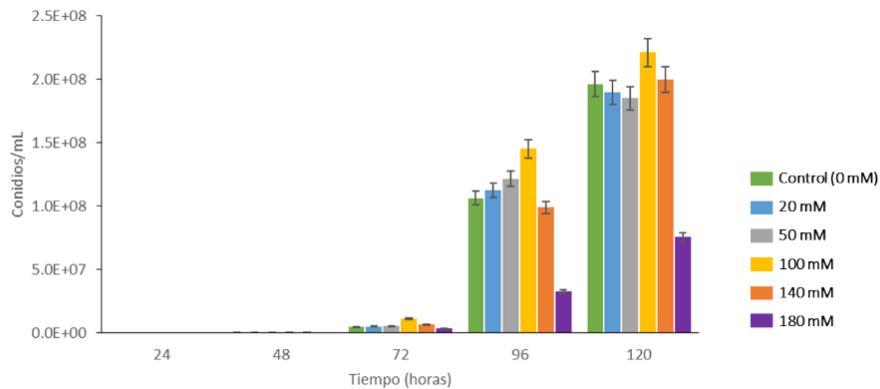
En un cultivo complejo de producción de penicilina de *P. chrysogenum* Wis54-1255 se probaron varias concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 25, 50, 100, 150 y 200 mM y se midió la producción específica de penicilinas. En estos cultivos, hasta 150 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se vio un efecto sobre el desarrollo y la biomasa del hongo, mientras que en 200 mM se observó un lisado de la biomasa. En la producción de penicilina a partir de 100 mM se puede observar en la gráfica 1 un cambio importante en el patrón de producción de penicilina a lo largo del tiempo cuando se compara contra el cultivo control (0 mM) adelantándose desde las 24 h, donde se cuantificaron hasta 20  $\mu$ g/mg de biomasa. A las 48 h, se llega a triplicar la producción, a las 72 h la producción es de 1.3 veces más con referencia al control y finalmente a las 96 h ya no es significativa la diferencia de producción, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística (P<0.05).

En 150 y 200 mM se adelantó e incremento la producción de penicilina a las 24 y 48 h, sin superar los resultados observados con 100 mM, y a partir de las 72 h la producción decayó en comparación al control. Con estos resultados podemos concluir que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la acumulación de ROS y se regula positivamente la biosíntesis de penicilina, siendo 100 mM la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elegida para posteriores experimentos ya que equilibra la inducción e incremento en la producción de penicilina sin llegar a dañar el desarrollo del hongo.



**Gráfica 1.** Producción de penicilina en *P. chrysogenum* Wis54-1255 bajo diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido al inicio de un cultivo sumergido. El gráfico se basa en un triplicado biológico de cada condición y las barras de error representan la desviación estándar.

También se analizó la respuesta al estímulo de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el proceso de conidiación, usando medio de esporulación, en la gráfica 2 no se observa una diferencia significativa en los tratamientos de 20, 50 o 140 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con 100 mM se incrementó la producción de conidios en un 133% a las 72 h, 37% a las 96 h y a 155% a las 120 h. Con 180 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la conidiación se vio afectada de manera negativa, estos resultados reafirman a 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como la concentración ideal para posteriores análisis.



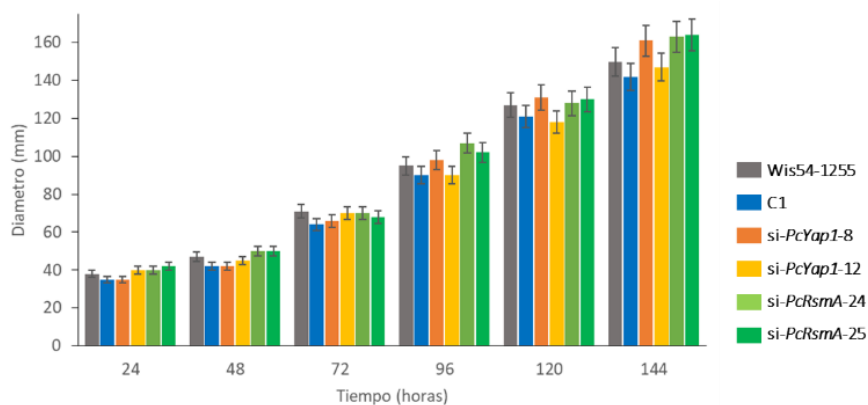
**Gráfica 2.** Producción de conidios en *P. chrysogenum* Wis54-1255 bajo diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido al medio de cultivo sólido. El gráfico se basa en un triplicado biológico de cada condición y las barras de error representan la desviación estándar.

### ***Pc-yap1* Y *Pc-rsmA* NO INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL MICELIO**

Una vez que se confirmaron las mutantes: *si-PcYap1-8*, *si-PcYap1-12*, *si-PcRsmA-24*, *si-PcRsmA-25*, *OE::PcYap1-A*, *OE::PcYap1-E*, *OE::PcRsmA-C* y *OE::PcRsmA-H*, se analizaron a profundidad comparando siempre su comportamiento contra 2 cepas de control: *P. chrysogenum* Wis54-1255 para cepas silenciadas o *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* para cepas sobreexpresadas y la

mutante con el plásmido de silenciamiento (pGpdPki-RNAi) o de sobreexpresión (PBKS-pyrG) pero sin el inserto de cada gen para corroborar que los posibles efectos observados sean exclusivamente por el cambio en la expresión de los genes y no por la integración del plásmido como tal.

En una cinética de 144 h se midió el desarrollo radial en el crecimiento del micelio en medio PDA a partir de una cantidad controlada de conidios.



**Gráfico 3.** Crecimiento radial, comparación de cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* contra la cepa control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y la transformante con el plásmido vacío pGpdPki-RNAi (C1). El gráfico se basa en un triplicado biológico y las barras de error representan la desviación estándar.

No se observan diferencias significativas de las cepas silenciadas contra las cepas de control ni en la comparación entre las cepas de control a lo largo de la cinética (Gráfica 3), de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). El crecimiento radial se observa desde las 24 h aumentando en promedio 21% a las 48 h, 47% más de crecimiento hacia las 72 h y posteriormente se observó un desarrollo de entre 30-40% cada 24 h hasta el final de la cinética.

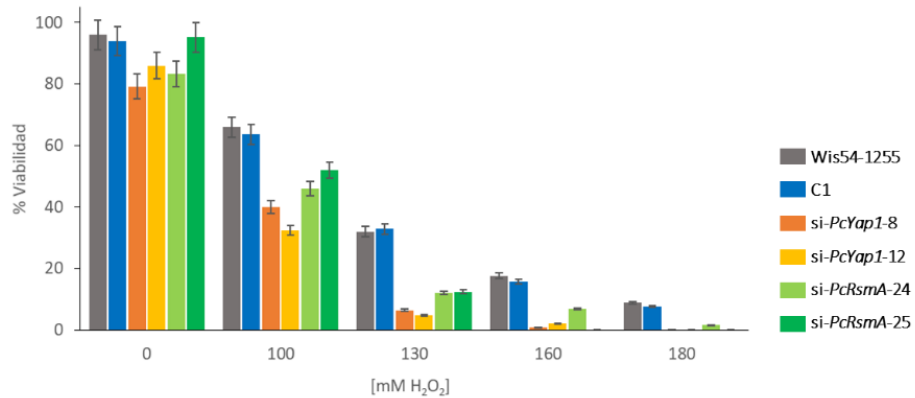
### ***Pc-yap1* Y *Pc-rsmA* REGULAN POSITIVAMENTE LA CONIDIACIÓN**

Se evaluó la capacidad de los conidios para germinar después de someterlos a estrés oxidante provocado por diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ , se analizaron las cepas de control y las cepas silenciadas. En la gráfica 4 se puede observar un efecto negativo en general que se incrementa conforme aumenta la concentración de  $H_2O_2$  añadido como tratamiento.

Con 100 mM de  $H_2O_2$  las silenciadas de *Pc-yap1* pierden viabilidad en más del 60% y las silenciadas de *Pc-rsmA* la pierden en más del 50%, si se compara con las cepas de control que pierden

aproximadamente 35% de su viabilidad, resulta evidente que el silenciamiento merma la resistencia al estrés oxidante de los conidios.

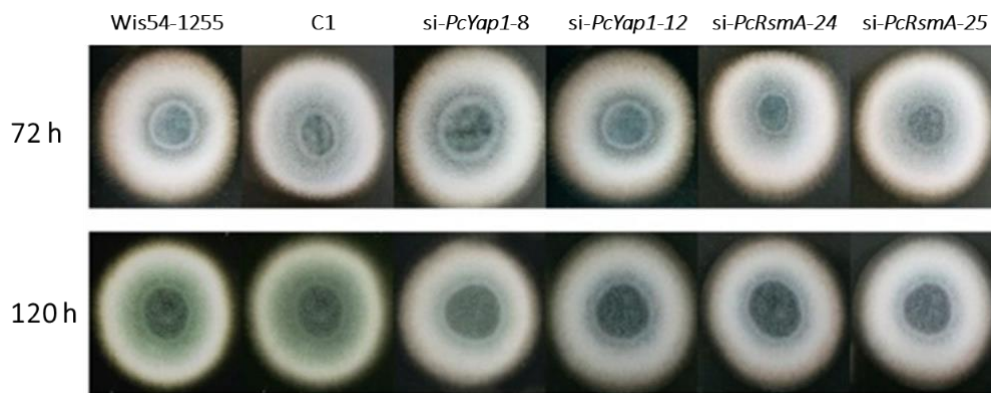
A partir de 130 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el efecto se vuelve más notorio, las silenciadas de *Pc-yap1* pierden viabilidad en más del 90% y las silenciadas de *Pc-rsmA* la pierden en más del 80%, mientras que las cepas de control pierden 65% de viabilidad y a partir de 160 mM la viabilidad prácticamente se pierde para las cepas silenciadas.



**Gráfica 4.** Efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en la viabilidad de conidios sometidos a estrés oxidante con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diferentes concentraciones, el gráfico muestra el porcentaje de conidios capaces de formar colonias respecto al número inicial de conidios inoculados. El gráfico se basa en un triplicado biológico y las barras de error representan la desviación estándar.

Se montó una cinética de conidiación de 120 h para monitorear la generación de conidios, también era importante determinar si el estrés oxidante afectaba el proceso de conidiación y de ser así en qué nivel, por lo que, se probaron diversas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se observó el efecto causado.

En la figura 12 se puede observar cómo afecta el silenciamiento de ambos genes en la conidiación cuando se compara en dos tiempos diferentes contra cepas de control.



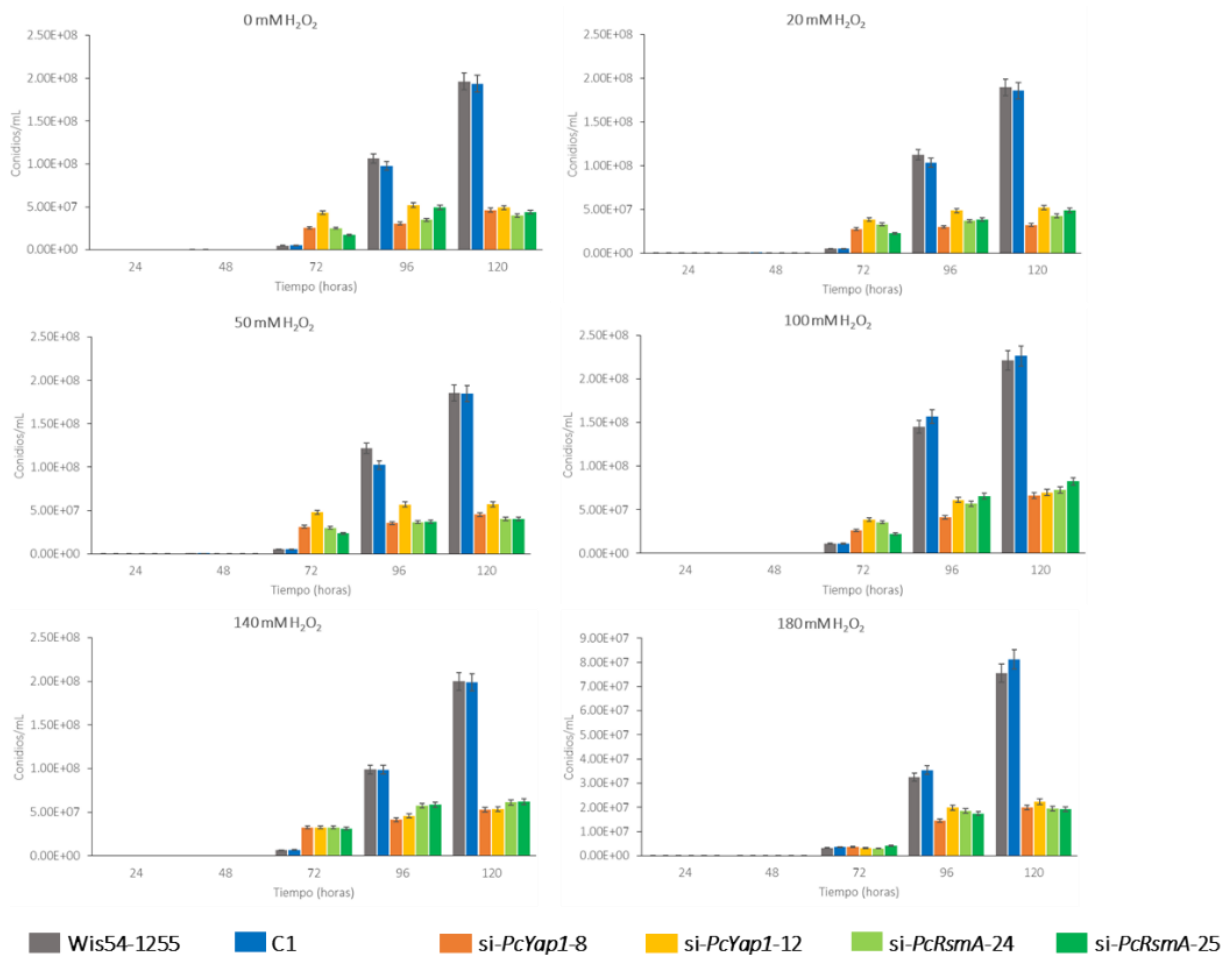
**Figura 12.** Colonias de cepas de control, cepas silenciadas del gen *Pc-yap1* y cepas silenciadas del gen *Pc-rsmA*. Se inocularon 4 µL de una suspensión de 1x10<sup>6</sup> conidios/mL en el centro de placas Petri con medio Power y se incubaron a 28 °C para fotografiarlas a las 72 y 120 h. C1: Wis54-1255 transformada con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío.

Analizando la cinética de la gráfica 5 se observa que las cepas de control no presentan diferencias significativas entre ellas teniendo desarrollo de conidios a partir de las 48 h e incrementando la cuenta aproximadamente en 1 orden de magnitud cada 24 h. En la condición control, es decir sin  $H_2O_2$ , en las cepas silenciadas de ambos genes la conidiación se ve retrasada hasta las 72 h donde la silenciada *si-PcYap1-12* tiene una cuenta de conidios 9 veces más alta que los controles, *si-PcYap1-8* y *si-PcRsmA-24* producen 5 veces más conidios y *si-PcRsmA-25* tiene una producción de 3.5 veces más, en comparación siempre con las cepas de control.

Con el paso del tiempo se frena la producción de conidios en las silenciadas, a las 96 h las cepas control producen el doble de conidios que las silenciadas y a las 120 h las silenciadas quedan 4 veces por debajo en comparación a las cepas de control.

Cuando se añade  $H_2O_2$  a una concentración de 20 mM no se ven cambios significativos si se compara contra la condición control, la conidiación de las silenciadas se retrasa hasta las 72 h y se ve disminuida en comparación a las cepas de control, por lo que se considera que esta concentración no es suficiente para inducir estrés oxidante en la célula. Es el mismo caso cuando se adicionan 50 mM de  $H_2O_2$ , el comportamiento de las silenciadas y los controles es similar cuando se compara con la cinética de control.

Sin embargo, cuando se adicionan 100 mM de  $H_2O_2$  la respuesta tanto de las cepas de control como de las silenciadas se modifica, los controles se siguen comportando estadísticamente de manera similar entre ellos, pero si se comparan contra ellos mismos en la cinética sin  $H_2O_2$  a lo largo del tiempo, la conidiación sigue arrancando a las 48 h pero con incremento del 28%, el mayor incremento se ha dado a las 72 h con un 125% más de conidios, a las 96 h aumenta un 48% y a las 120 h un 15%.



**Gráfica 5.** Producción de conidios bajo condiciones de estrés oxidante con un gradiente de  $H_2O_2$  que va de 0 mM (control) a 180 mM adicionado al medio de cultivo, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

En el caso de las cepas si-*PcYap1* la conidiación arranca desde las 48 h a diferencia de las mismas cepas en la cinética control y se observa además un incremento en la conidiación del 3% en si-*PcYap1-8* y un decremento del 11% en si-*PcYap1-12* a las 72 h, teniendo una cuenta más alta que las cepas control, si-*PcYap1-8* aumenta un 35% y si-*PcYap1-12* un 17% a las 96 h, a las 120 h ambas silenciadas incrementan aproximadamente un 42% en comparación a ellas mismas en la cinética control.

Las cepas si-*PcRsmA* presentan un cambio aún más drástico cuando se comparan contra ellas mismas en la cinética control, la conidiación arranca desde las 48 h, a las 72 h si-*PcRsmA-24* presenta un incremento del 42% y si-*PcRsmA-25* del 30% con una cuenta de conidios más alta que las cepas de control en este punto, a las 96 h si-*PcRsmA-24* presenta un incremento del 63% y si-

*PcRsmA*-25 del 34% finalmente a las 120 h *si-PcRsmA*-24 presenta un incremento del 82% y *si-PcRsmA*-25 del 87%.

Cuando el tratamiento es con 140 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se sigue detectando un efecto en el proceso de conidiación, las cepas de control no presentan diferencias significativas entre sí y cuando se comparan con ellas mismas en la condición de control la conidiación se incrementa un 10% a las 24 h, 34% a las 48 h y a las 96 y 120 h no se ven diferencias con los mismos tiempos en la gráfica control.

Las silenciadas *si-PcYap1* presentan un retraso en la conidiación hasta las 72 h, cuando se comparan contra ellas mismas en la condición sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el caso de *si-PcYap1*-8 la conidiación aumenta 28%, 35% y 14% a las 72, 96 y 120 h respectivamente; mientras que la *si-PcYap1*-12 conidia un 24% menos a las 72 h y un 13% menos a las 96 h, aunque incrementa 8% a las 120 h.

Las silenciadas *si-PcRsmA* también presentan un retraso en la conidiación hasta las 72 h, en la comparación contra la condición control *si-PcRsmA*-24 incrementa la producción de conidios un 30%, 64% y 54% a las 72, 96 y 120 h respectivamente, por otro lado, *si-PcRsmA*-25 tiene una alta producción de conidios sobre todo a las 72 h con un 82% más de producción, 19% más a las 96 h y 41% más de conidios a las 120 h.

Aunque estos resultados son consistentes con el incremento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como inductor de estrés oxidante no son tan marcados como con el uso de 100 mM, por lo que probablemente 140 mM sea una concentración lo suficientemente alta como para empezar a causar daño en la célula.

Finalmente se probó la concentración de 180 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donde se observó un efecto negativo sobre la conidiación en comparación con la cinética de control, las cepas de control retrasan el inicio de la conidiación hasta las 72 h además de disminuir la producción de conidios comparándolo contra los mismos controles sin la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con una cuenta de 30% menos a las 72 h, 65% menos a las 96 h y 60% menos a las 120 h.

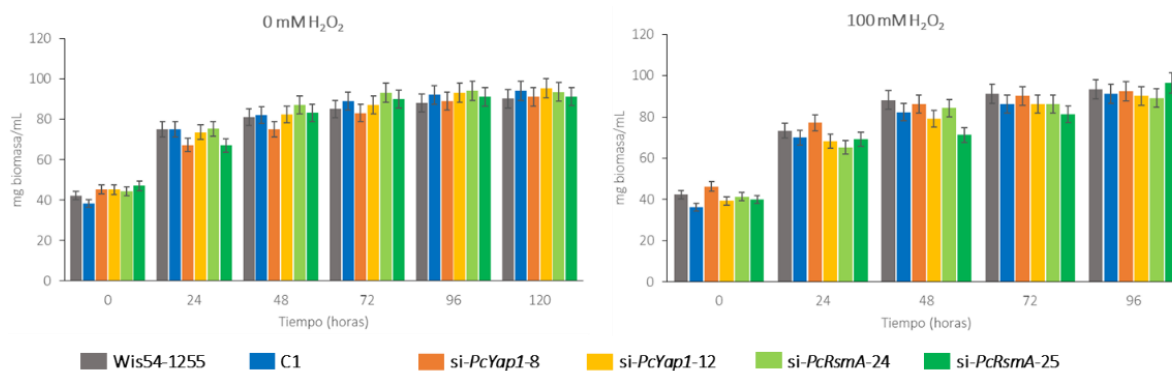
Las *si-PcYap1* se ven aún más afectadas, *si-PcYap1*-8 desarrolla conidios hasta las 72 h aunque 86% menos que en este mismo punto en la cinética control, 53% menos a las 96 h y finalmente 57% menos a las 120 h; por otro lado *si-PcYap1*-12 sigue el mismo comportamiento, retraso de la conidiación hasta las 72 h con una disminución del 93%, 62% menos a las 96 h y 55% menos a las 120 h.

En el caso de las *si-PcRsmA* se mantiene la misma tendencia de retraso y disminución en la conidiación, para *si-PcRsmA-24* los conidios se producen en un 88% menos a las 72 h, 47% menos a las 96 h y 51% menos a las 120 h comparando contra la misma cepa en la cinética control; para *si-PcRsmA-25* se cuantificó 76% menos de conidios a las 72 h, 65% menos a las 96 h y 56% menos a las 120 h como siempre en comparación con la misma cepa en la cinética sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Con estos resultados es claro que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a determinada concentración afecta el proceso de conidiación, llegando a un punto en el que la concentración del oxidante es lo suficientemente alta como para además afectar el desarrollo de la célula.

## REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE PENICILINA

Como parte de la normalización de datos se monitoreó la formación de biomasa en la misma cinética donde se midió la producción de penicilina comparando la condición control (sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) contra la adición de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Gráfica 6.** Producción de biomasa en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

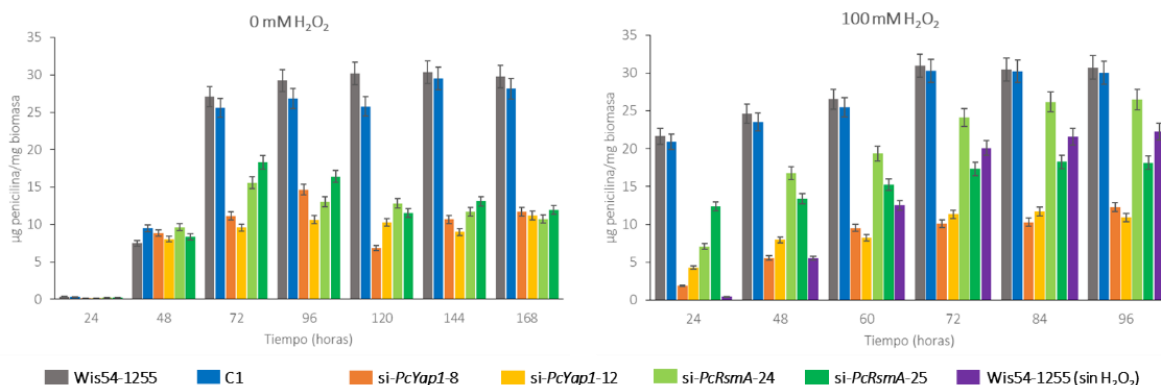
En la gráfica 6 se muestra el análisis de las cepas silenciadas sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cepas de control no muestran diferencias significativas entre sí a lo largo del tiempo, el mayor incremento de biomasa se da a las 24 h con un 87% más en comparación al tiempo 0, a partir de las 48 h y hasta el fin de la cinética el aumento de biomasa se da entre un 2% y 9%. Las cepas silenciadas, tanto de *Pc-yap1* como de *Pc-rsmA*, presentan el mayor incremento de biomasa a las 24 h con un 56%, después de las 48 h el aumento va de entre el 2% y 20% hasta el fin de la cinética. En términos generales en cada punto de la cinética no se presentan diferencias significativas entre las cepas silenciadas y de



control, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

Cuando se adicionan 100 mM de  $H_2O_2$  (Gráfica 6) el comportamiento no varía de manera importante, las cepas de control no presentan diferencias significativas entre sí a lo largo de la cinética, el mayor incremento de biomasa en todas las cepas se da a las 24 h con un aumento que va del 65% al 82% aproximadamente, a partir de las 48 h y hasta el fin de la cinética el aumento de biomasa en todos los casos se mantiene entre el 3% y 19%. Finalmente, cuando se hace la comparación contra la condición control en ningún punto de la cinética con ninguna cepa se detectan diferencias significativas en el desarrollo de la biomasa, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

Dentro del mismo procedimiento experimental se midió la producción específica de penicilina. Además de la condición control, sin adición de  $H_2O_2$  se cuantificó la producción de penicilina con la adición de 100 mM de  $H_2O_2$  al medio con el fin de determinar si esto afectaba la producción y el efecto del silenciamiento de los genes.



**Gráfica 7.** Producción de penicilina en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de  $H_2O_2$  para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

En la condición sin  $H_2O_2$  (Gráfica 7), en las cepas control se detectó la penicilina a partir de las 48 h, llegando a un máximo de producción a las 96 h y manteniéndose estable con  $\pm 5\%$  de variación aproximadamente hasta el final de la cinética.

En el caso de las cepas silenciadas si-*PcYap1* a las 48 h no presentan diferencias significativas en comparación con las cepas de control, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, a partir de las 72 h hasta el final de

la cinética es evidente una disminución en la producción de penicilina en comparación con las cepas de control que va desde un 45% hasta un 75% menos.

Las cepas silenciadas *si-PcRsmA* siguen la misma tendencia, sin mostrar diferencias significativas a las 48 h en comparación con las cepas de control, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). A partir de las 72 h hasta el fin de la cinética se observó un descenso de la producción de entre el 38% y 63% para *si-PcRsmA-24* y de entre el 30% y 59% para *si-PcRsmA-25*.

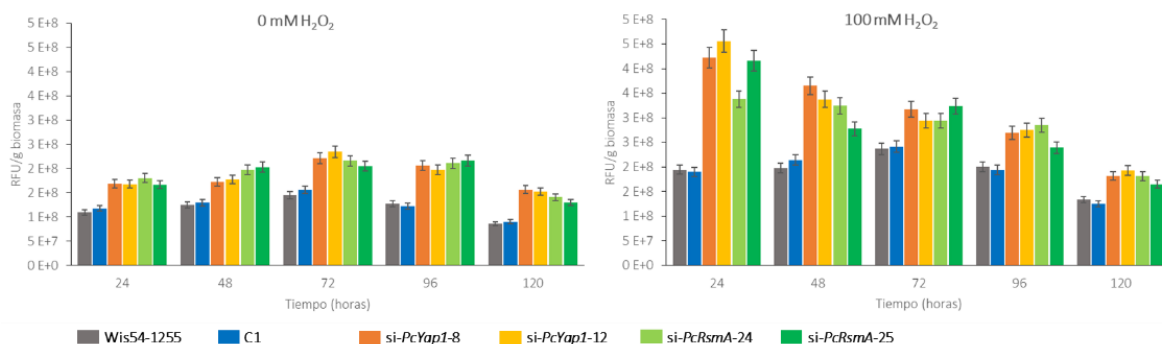
Cuando el cultivo se somete a un tratamiento con  $H_2O_2$  (Gráfica 7) y se compara con los resultados del tratamiento control, se observa un adelanto en la producción de penicilina a las 24 h en todas las cepas, a las 48 h las cepas de control cuadruplican su producción, la duplican a las 60 h y a partir de 72 h producen 0.5 veces más. Las silenciadas no presentan diferencias significativas, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ), por efecto de la adición de  $H_2O_2$  a excepción de *si-PcRsmA-24* que incrementa su producción entre un 60% y 98% entre las 48 h y 96 h, y *si-PcRsmA-25* tiene un 60% más de producción a las 48 h pero deja de ser significativo después de este punto.

En la comparación entre cepas en el tratamiento de  $H_2O_2$ , las cepas de control no presentan diferencias significativas entre sí a lo largo de la cinética, *si-PcYap1-8* muestra una producción más baja entre un 60% y 91%, *si-PcYap1-12* también produce entre 62% y 80% menos penicilinas, *si-PcRsmA-24* produce entre 13% y 67% menos y *si-PcRsmA-25* entre 40% y 43% menos, esto es cuando se comparan contra las cepas control en cada punto de la cinética.

En resumen, el silenciamiento de las cepas *si-PcYap1* y *si-PcRsmA* sufren un decremento importante en la producción de penicilina, la adición de  $H_2O_2$  no parece tener un efecto positivo en la producción en las cepas silenciadas de *Pc-yap1*, pues se cuantificaron niveles similares en los cultivos con y sin  $H_2O_2$ . Sin embargo, en las cepas silenciadas de *Pc-rsmA* si es notorio el efecto positivo en la producción de penicilinas por adición de  $H_2O_2$ .

## PAPEL DE *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA* EN LA DEFENSA ANTE EL ESTRÉS OXIDANTE

Se midió la acumulación de ROS en RFU (unidades relativas de fluorescencia)/g de biomasa a lo largo del tiempo probando también la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para observar un posible efecto en la acumulación interna de ROS.



**Gráfica 8.** Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), expresadas en unidades relativas de fluorescencia (RFU) por gramo de biomasa (como peso seco), en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto del silenciamiento de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 y transformante con el plásmido pGpdPki-RNAi vacío (C1). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

En el caso de la condición de control, la acumulación de ROS no presenta diferencias significativas entre las cepas de control a lo largo de la cinética (Gráfica 8), de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). Se cuantificaron ROS desde las 24 h, con una acumulación del 11% y 19% a las 48 y 72 h y un descenso del 17% y 29% a las 96 y 120 h.

Durante toda la idiofase es importante mencionar que las cepas silenciadas, tanto de *Pc-yap1* como de *Pc-rsmA*, mostraron una acumulación mayor de ROS en comparación a las cepas de control, en ambas condiciones de cultivo (con y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

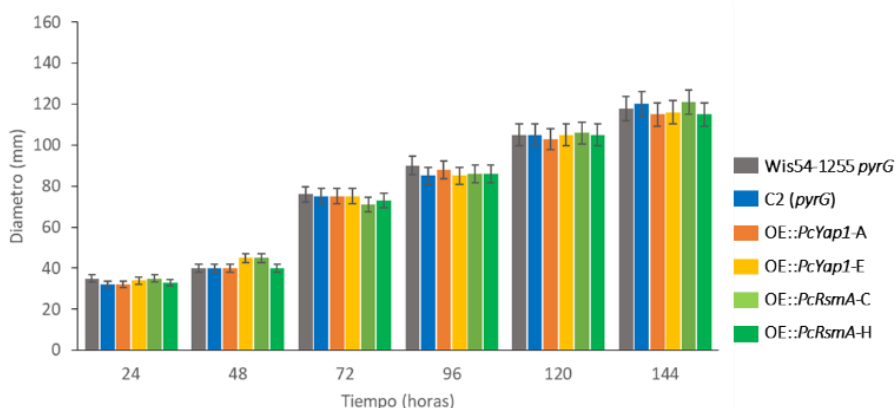
Cuando se comparan las cepas silenciadas se observó que *si-PcYap1-8* y *si-PcYap1-12* no presentan diferencias significativas entre sí y acumulan más ROS que las cepas de control con 48% más a las 24 h, 40% más a las 48 h, 56% más a las 72 h, 65% más a las 96 h y de 77% más a las 120 h. El caso de las *si-PcRsmA-24* y *si-PcRsmA-25* es similar, sin diferencias significativas entre ellas, pero con una mayor acumulación de ROS en comparación con las cepas de control, 58% más a las 24 h, 60% más a las 48 h, 43% más a las 72 h, 73% más a las 96 h y 60% más a las 120 h.

Cuando se adiciona H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en términos generales se incrementa la concentración de ROS en las células en comparación a la cinética de control, entre 47% y 69% más ROS en el caso de las cepas

de control a lo largo de la cinética sin presentar diferencias significativas entre ellas. La cepa si-*PcYap1*-8 sigue esta tendencia con un aumento en la concentración de ROS entre 150% y 16%, la si-*PcYap1*-12 aumenta entre 171% y 25%, la cepa si-*PcRsmA*-24 acumula entre 87% y 29% más ROS y si-*PcRsmA*-25 entre 149% y 11% más, esto a partir de las 24 h y hasta el fin de la cinética con respecto a las mismas cepas en la condición control.

## EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA* SOBRE LA CONIDIACIÓN, PRODUCCIÓN DE PENICILINA Y RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE

Se repitieron los mismos análisis de caracterización para las cepas sobreexpresadas con sus respectivos controles y se obtuvieron los siguientes resultados:



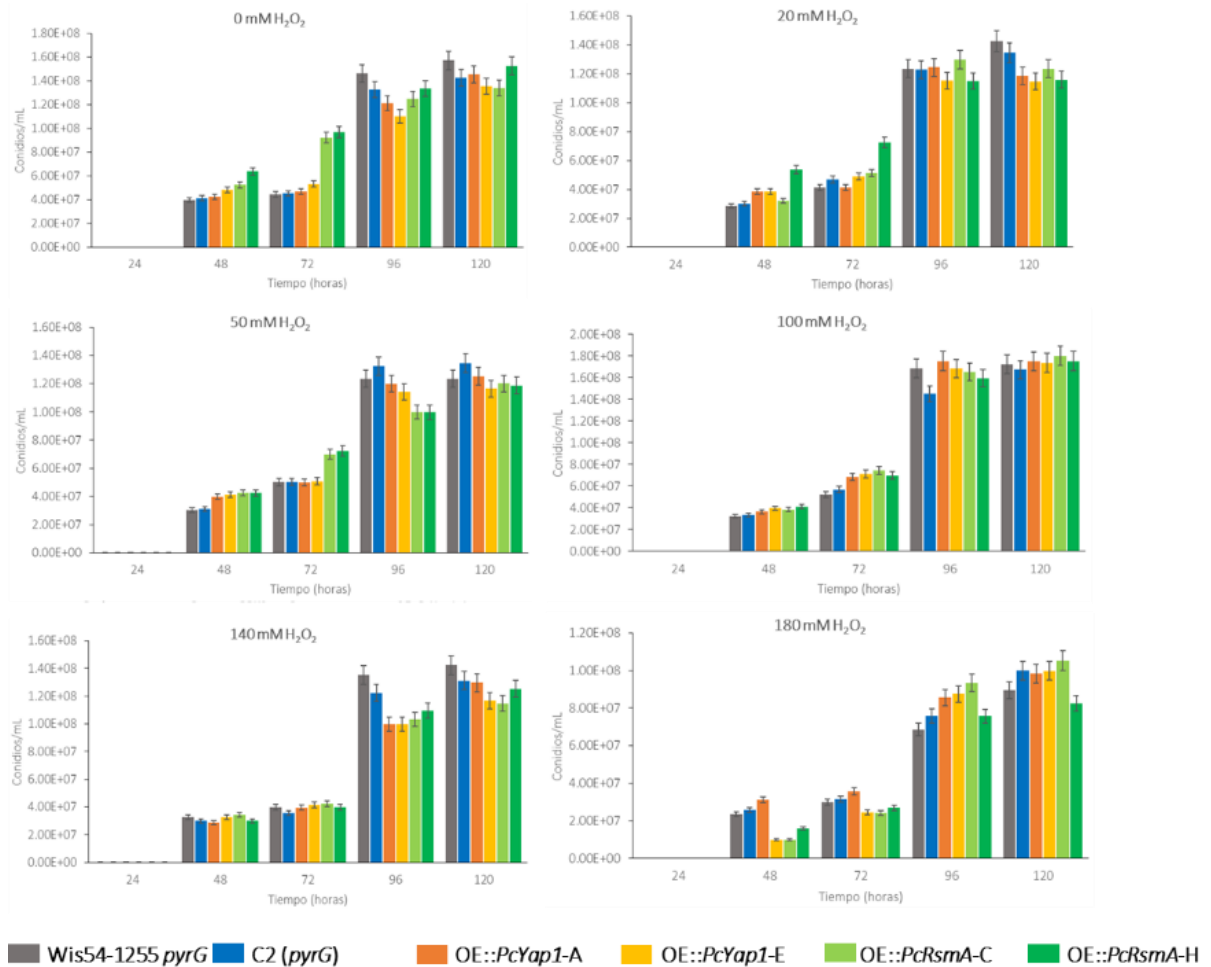
**Gráfica 9.** Crecimiento radial, comparación de cepas sobreexpresadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* contra la cepa control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y la transformante con el plásmido vacío PBKSpyrG (C2). El gráfico se basa en un triplicado biológico y las barras de error representan la desviación estándar.

En la gráfica 9 se presenta el crecimiento radial de las cepas sobreexpresadas, se puede observar que no hay diferencia significativa, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). El desarrollo se presenta desde las 24 h con el mayor incremento en el crecimiento (77%) entre las 48 y 72 h, y a partir de este tiempo hasta las 144 h el crecimiento es en promedio del 16% cada 24 h.

Si se compara el crecimiento radial de las cepas silenciadas (Gráfica 3) contra las sobreexpresadas se detecta un rezago en el desarrollo de las sobreexpresadas y sus controles creciendo un 11% menos en promedio, aunque solo es significativo a partir de las 120 horas, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). Este

menor desarrollo se podría atribuir al uso de diferentes cepas de *P. chrysogenum* en la transformación por protoplastos.

Con las cepas sobreexpresadas de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* se siguió el mismo procedimiento experimental para el monitoreo del proceso de conidiación, probando la adición de  $H_2O_2$  en un rango de 20 mM a 180 mM como oxidante exógeno para observar si esto afectaba de manera positiva o negativa la conidiación.



**Gráfica 10.** Producción de conidios bajo condiciones de estrés oxidante con un gradiente de  $H_2O_2$  que va de 0 mM (control) a 180 mM adicionado al medio de cultivo, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 pyrG y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

En la gráfica 10, cuando no se adiciona  $H_2O_2$ , las cepas de control no presentan diferencias significativas entre ellas a lo largo del tiempo, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). Iniciando el proceso de conidiación a las

48 h con una media de  $4 \times 10^7$  conidios/mL que a las 120 h incrementan a una media de  $1.5 \times 10^8$  conidios/mL.

En el caso de la cepa sobreexpresada OE::*PcYap1*-A esta no presenta diferencias significativas en comparación con las cepas de control, mientras que OE::*PcYap1*-E muestra un incremento del 19% a las 48 h, del 18% a las 72 h mientras que a las 96 h presenta un descenso del 21% y un descenso del 10% a las 120 h.

Para OE::*PcRsmA*-C en comparación con las cepas de control el incremento de la conidiación es desde las 48 h con una producción de 30% más, 105% más conidios a las 72 h pero con un descenso del 11% tanto en las 96 h como a las 120 h. OE::*PcRsmA*-H incrementa un 58% a las 48 h, 116% más a las 72 h, mientras que a las 96 y 120 h no se encontraron diferencias significativas en comparación con las cepas de control en estos mismos tiempos.

Cuando se agrega 20 mM de  $H_2O_2$  la cinética de conidiación se ve afectada ligeramente, en la comparación con las mismas cepas de control sin la adición de  $H_2O_2$  la conidiación a las 48 h disminuye un 28%, a las 72 h no muestra diferencias significativas, a las 96 h la conidiación desciende un 10% y sin diferencias significativas a las 120 h. La OE::*PcYap1*-A no presenta diferencias significativas en comparación a ella misma en la condición control más que a las 72 h con un descenso de la conidiación del 12% y a las 120 h con un descenso del 18%, en el caso de la OE::*PcYap1*-E solo se ven diferencias a las 48 h con 21% menos conidios y a las 120 h con 15% menos de conidios. Para OE::*PcRsmA*-C las diferencias se detectaron solo a las 48 y 72 h con un descenso en la conidiación del 39% y 44% respectivamente, mientras que OE::*PcRsmA*-H muestra un descenso en el conteo de conidios del 16% a las 48 h, 25% menos a las 72 h, 14% menos a las 96 h y 24% menos a las 120 h siempre comparando contra ellas mismas en los mismos tiempos en la gráfica control.

Con la adición de 50 mM de  $H_2O_2$  las cepas control mantienen su comportamiento iniciando la conidiación a las 48 h, un incremento del 11% a las 72 h, sin diferencias significativas a las 96 h y un descenso de 15% a las 120 h en comparación a la gráfica control. Las cepas OE::*PcYap1*-A y OE::*PcYap1*-E no presentan diferencias significativas en comparación a ellas mismas en la cinética control a excepción de las 120 h con un descenso del 14% en la conidiación, además no presentan diferencias significativas a las 72, 96 y 120 h cuando se comparan contra las cepas de control en el mismo tratamiento. Con OE::*PcRsmA*-C la conidiación se ve afectada con un descenso de 19% a las 48 h, 24% menos a las 72 h, 20% menos a las 96 h y 10% menos a las 120 h cuando se compara

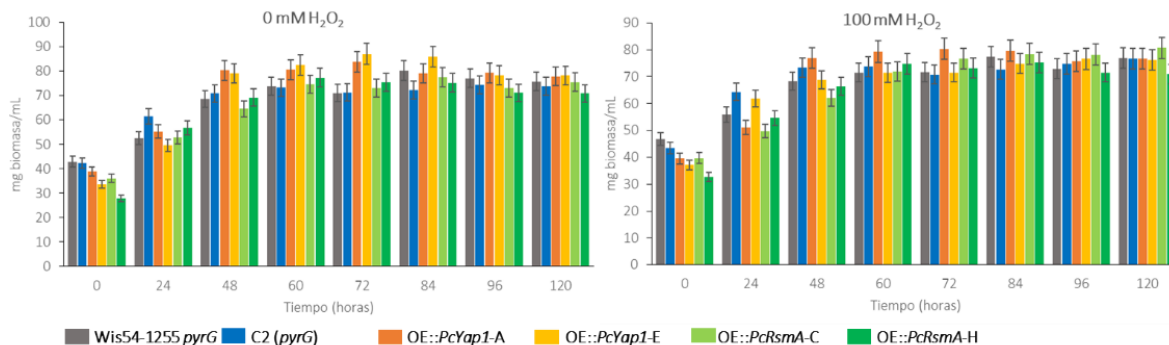
contra ella misma en la gráfica control; OE::*PcRsmA*-H presenta un descenso de la conidiación aún más marcado a lo largo del tiempo 34% menos a las 48 h, 26% menos a las 72 h, 25% menos a las 96 h y 22% menos a las 120 h.

En el tratamiento de 100 mM se detecta un incremento general en la conidiación, en el caso de las cepas control el incremento se detecta a partir de las 72 h con un aumento del 22%, 15% más a las 96 h, y del 16% a las 120 h en comparación con la condición control. Con OE::*PcYap1*-A el incremento se nota partir de las 72 h con un 46% más de conidios, 45% más a las 96 h y 20% más a las 120 h; con OE::*PcYap1*-E la tendencia es la misma un aumento del 34% a las 72 h, 53% más a las 96 h y 28% más a las 120 h, siempre comparando las cepas contra ellas mismas en la gráfica control. Para OE::*PcRsmA*-C el efecto en la conidiación se detecta hasta las 96 h con un aumento del 33% y 34 % más a las 120 h, igualmente OE::*PcRsmA*-H presenta un aumento a partir de las 96 h con 20% más conidios y 15% más a las 120 h comparando con la gráfica de la condición control. Además, cuando se comparan todas las cepas entre ellas en el tratamiento a lo largo del tiempo no se encuentran diferencias significativas en el conteo de conidios.

Con un tratamiento de 140 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el efecto vuelve a ser negativo en términos generales cuando se compara con los mismos tiempos en la gráfica control, en el caso de las cepas de control hay un descenso de entre el 10% y 15% a lo largo de la cinética. Con las cepas OE::*PcYap1*-A y OE::*PcYap1*-E el descenso es del 32% a las 48 h, del 20 % a las 72 h, del 17% y 9% menos respectivamente a las 96 h y del 12% menos a las 120 h. Para OE::*PcRsmA*-C y OE::*PcRsmA*-H el descenso en la conidiación es del 35% y 53% respectivamente a las 48 h, del 56% a las 72 h, 18% menos conidios a las 96 h y del 16% menos a las 120 h, siempre comparando con la cinética de control. También se detectó que a las 48 y 72 h no hay diferencias significativas entre las cepas en este tratamiento.

Finalmente, con una adición de 180 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detecta una disminución de la conidiación de las cepas de control que va del 30% al 50% menos, en comparación con los mismos controles en la condición sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para OE::*PcYap1*-A el descenso de la conidiación a lo largo de la cinética va del 24% al 32% y con OE::*PcYap1*-E la disminución es del 80% a las 48 h, 54% menos a las 72 h, y del 23% a las 96 y 120 h. Las cepas OE::*PcRsmA*-C y OE::*PcRsmA*-H presenta un descenso del 81% y 75% respectivamente a las 48 h, descenso del 73% en ambos casos a las 72 h, 35% y 43% menos conidios a las 96 h y 22% y 46% menos a las 120 h, en comparación con las mismas cepas en la condición control.

Con los resultados en el análisis de las cepas sobreexpresadas se confirma, aunque de manera menos evidente que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cierta concentración afecta el proceso de conidiación, siendo la concentración de 100 mM la idónea para posteriores análisis sobre las cepas sobreexpresadas.



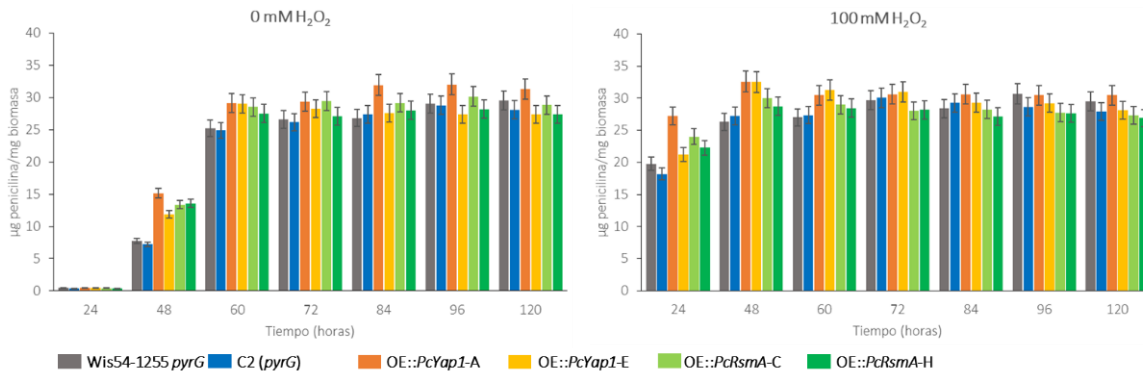
**Gráfica 11.** Producción de biomasa en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

El análisis de producción de biomasa de las cepas sobreexpresadas se muestra en la gráfica 11 en el que se observa que, sin la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cepas de control no muestran diferencias significativas entre ellas, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ). Los mayores incrementos de mg de biomasa/mL se dan a las 24 h con un 34% de aumento y a las 48 h con un incremento del 22%, en el resto de la cinética el incremento de la biomasa es menos drástico con un aumento en promedio del 3%.

Las cepas OE::PcYap1-A y OE::PcYap1-E presentan un incremento en la producción de biomasa de 45% a las 24 h y de 52% a las 48 h, en el resto de los puntos de la cinética el incremento se da entre el 2% y 5%. Con OE::PcRsmA-C y OE::PcRsmA-H la tendencia es similar con un aumento de la biomasa del 71% a las 24 h y del 22% a las 48 h, a partir de las 60 h y hasta las 120 h el aumento de biomasa va entre el 1% y 10%.

Cuando se adicionan 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mantiene el mismo comportamiento tanto en las cepas de control como en las sobreexpresadas con un aumento de entre el 33% y 47% a las 24 h, a las 48 h el aumento va entre el 18% y 29% y a partir de las 60 h hasta el fin de la cinética el aumento es entre el 1% y el 14%. En el tratamiento las cepas de control no presentan diferencias significativas entre ellas en toda la cinética y cuando se hace la comparación contra la condición control ni las cepas de control ni las sobreexpresadas de ambos genes presentan diferencias significativas a lo largo de todos los puntos de las cinéticas, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ).



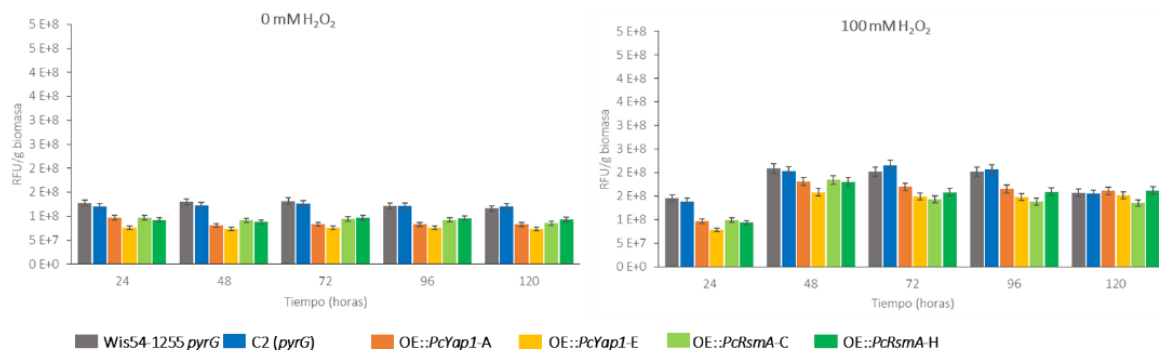


**Gráfica 12.** Producción de penicilina en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

En el caso de las cepas sobreexpresadas, al medir la producción específica de penicilina esta no presenta cambios tan drásticos (Gráfica 12) como en el caso de las cepas silenciadas. En primer lugar, las cepas de control no presentan diferencias significativas entre sí a lo largo del tiempo y a partir de las 60 h y hasta las 120 h la variación en la producción es de máximo 5%. A las 24 h y entre las 72 y 120 h no hay diferencias significativas entre las cepas de control y las cepas sobreexpresadas, a las 48 h las cepas sobreexpresadas presentan una mayor producción en comparación con las cepas de control, OE::PcYap1-A produce 102% más, OE::PcYap1-E 58% más, OE::PcRsmA-C 78% más y OE::PcRsmA-H 81% más.

Con la adición de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medir la producción de penicilinas y comparando contra la cinética sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detecta un aumento en la producción a las 24 h de entre 40 y 60 veces y las 48 h un aumento de entre 2 y 4 veces, en los demás puntos de las cinéticas no se encuentran diferencias significativas como se puede ver en la gráfica 12.

Cuando se hace la comparación entre cepas dentro del tratamiento, las cepas de control no presentan diferencias significativas entre ellas, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ), a las 24 h las cepas sobreexpresadas producen más penicilinas que las cepas de control: OE::PcYap1-A produce 43% más, OE::PcYap1-E 12% más, OE::PcRsmA-C 26% más y OE::PcRsmA-H 17% más, mientras que a las 48 h OE::PcYap1-A y OE::PcYap1-E producen 22% más, OE::PcRsmA-C 12% más y OE::PcRsmA-H 7% más. En el resto de los puntos de la cinética no se encuentran diferencias significativas entre las cepas de control y las cepas sobreexpresadas.



**Gráfica 13.** Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), expresadas en unidades relativas de fluorescencia (RFU) por gramo de biomasa (como peso seco), en medio líquido con adición al inicio del cultivo de 0 mM (control) y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducción de estrés oxidante, se muestra el efecto de la sobreexpresión de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* y transformante con el plásmido PBKSpyrG vacío (C2). Cada gráfico se basa en triplicados biológicos y las barras de error representan la desviación estándar.

La medición de ROS en las cepas sobreexpresadas sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestra que en las cepas de control la acumulación de ROS a lo largo del tiempo no cambia significativamente, de acuerdo con una comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar significancia estadística ( $P < 0.05$ ), como se observa en la gráfica 13. Las cepas sobreexpresadas tanto del gen *Pc-yap1* como de *Pc-rsmA* acumulan menos ROS que las cepas de control, entre un 21% y 41% menos a partir de las 24 h y hasta el final de la cinética.

Cuando se adiciona 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se compara contra la cinética sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> las cepas de control acumulan más ROS desde las 24 h con un 15% de incremento encontrando la diferencia más grande a las 96 h con 68% de aumento. En el caso de las cepas sobreexpresadas cuando se comparan contra ellas mismas en la cinética de control la diferencia se detecta a partir de las 48 h con incrementos desde el 50% hasta el 125%.

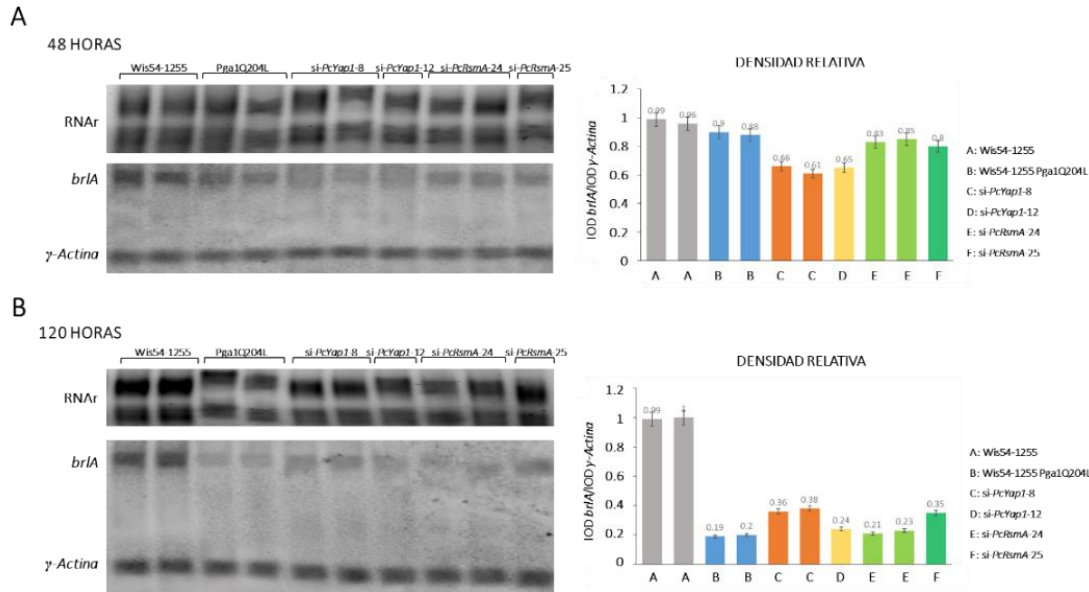
En la comparación entre cepas con el mismo tratamiento los controles no presentan diferencias significativas entre sí a lo largo de la cinética, las atenuadas del gen *Pc-yap1* acumulan entre 12% y 44% menos ROS que las cepas de controles entre las 24 y 96 h mientras que a las 120 h no hay diferencias significativas. Las sobreexpresadas del gen *Pc-rsmA* producen entre 11% y 34% menos ROS que las cepas control entre las 24 y 96 h pero a las 120 h OE::PcRsmA-H no presenta diferencias significativas con las cepas de control en este mismo tiempo mientras que OE::PcRsmA-C acumulan 13% menos ROS.

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *brlA* Y *Pc-yap1*

Con los resultados obtenidos en la cinética de conidiación de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* se planteó un análisis por Northern blot para verificar la expresión del gen *brlA*, primer gen en la vía de la conidiación, y determinar si este gen era el punto de regulación. Se extrajo RNA a las 48 h, en el arranque de la conidiación, y a las 120 h, momento de máxima expresión de *brlA* (García-Rico et al. 2008), se usaron dos cepas de control con diferente fondo génico: *P. chrysogenum* Wis54-1255, como cepa de referencia para el nivel de expresión de *brlA* y *P. chrysogenum* Wis54-1255 Pga1Q204L, cepa que expresa un alelo dominante activador del gen que codifica la subunidad G $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica, ya que la activación constitutiva de esta vía da como resultado la disminución de la conidiación hasta el punto de ser casi inexistente por la represión de la expresión de *brlA* (García-Rico et al. 2008).

Las cepas de control se compararon con las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*, a las 48 h (Figura 13A) la expresión de *brlA* no presenta diferencias significativas entre las cepas de control, y se detectó una disminución en la expresión del mismo gen en las cepas con silenciamiento, las silenciadas de *Pc-yap1* presentan una disminución en la expresión del 34-39% y las silenciadas de *Pc-rsmA* una disminución del 15-20%.

La disminución en la expresión de *brlA* se hace evidente a las 120 h (Figura 13B), la cepa de control Wis54-1255 Pga1Q204L, como era de esperar, tiene disminuida la expresión de *brlA* en un 80% en comparación con la cepa Wis54-1255, las cepas silenciadas de *Pc-yap1* presentan una disminución del 62-76% en la expresión de *brlA* y las cepas silenciadas de *Pc-rsmA* una disminución del 65-79%.



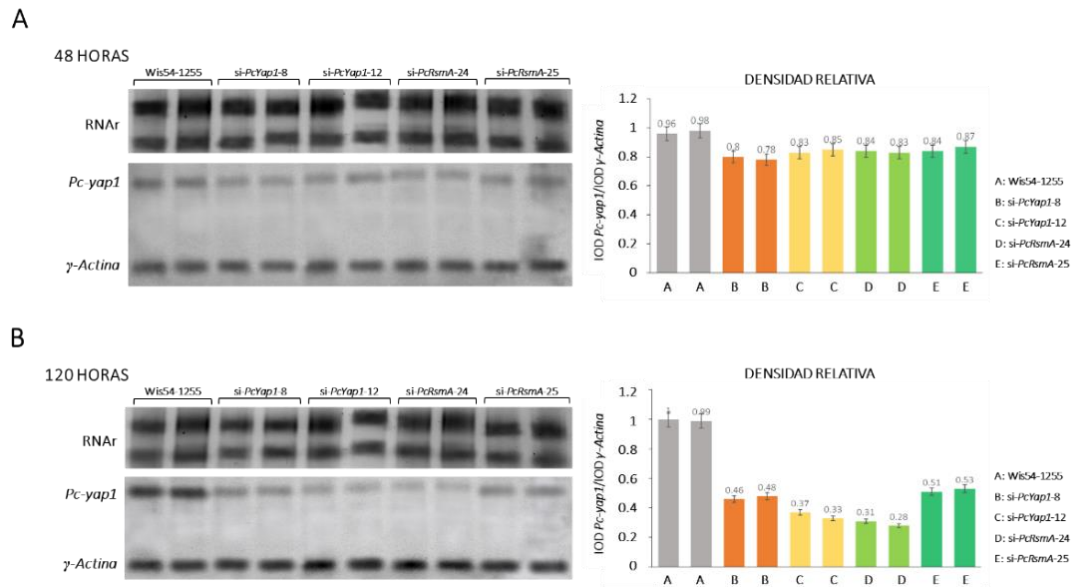
**Figura 13.** Regulación de la expresión del gen *brlA* **A** Northern blot con RNA extraído a las 48 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control Wis54-1255 y Wis54-1255 Pga1Q204L, como controles se muestra la carga de rRNA y la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1 (ver materiales y métodos). **B** Northern blot con RNA extraído a las 120 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a las cepas control Wis54-1255 y Wis54-1255 Pga1Q204L, como controles se muestra la carga de rRNA y la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1. Los duplicados que se muestran en ambos casos son estadísticos, pero no biológicos.

La variación en la expresión de *brlA* entre silenciados del mismo gen se puede justificar por los diferentes niveles de atenuación que se obtienen al transformar por RNAi y la disminución en la expresión es clara señal de que *brlA* es el punto clave en la regulación de la conidiación.

Al estudiar los datos que se habían obtenido, donde ambos grupos de silenciados (si-*PcYap1* y si-*PcRsmA*) tienen una disminución en la expresión de *brlA* se planteó un segundo análisis por Northern blot para el gen *Pc-yap1* ya que se sospechaba que *Pc-rsmA* puede estar regulando de alguna manera a *Pc-yap1* y por lo tanto afectando de manera indirecta la expresión de *brlA*, para este análisis se usó como cepa control a *P. chrysogenum* Wis54-1255. A las 48 h (Figura 14A) la expresión de *Pc-yap1* se ve disminuida, en comparación con la cepa control, las silenciadas de *Pc-yap1* presentan un 15-22% menos de expresión y las silenciadas de *Pc-rsmA* también expresan a *Pc-yap1* un 13-17% menos.

En el análisis de las 120 h (Figura 14B) las silenciadas de *Pc-yap1* presentan 52-67% menos de expresión del gen *Pc-yap1*, en comparación con la cepa control, y las silenciadas de *Pc-rsmA* expresan un 47-72% menos a *Pc-yap1*. Estos resultados demuestran que *Pc-rsmA* regula a *Pc-yap1*, lo que implica que la regulación de *Pc-RsmA* sobre *brlA* podría deberse a la regulación ejercida

sobre *Pc-yap1*, sin descartar la posibilidad de que también regule directamente a *brlA* mediante unión a su promotor.



**Figura 14.** Regulación de la expresión del gen *Pc-yap1* **A** Northern blot con RNA extraído a las 48 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a la cepa control Wis54-1255, como controles se muestra la carga de rRNA y la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1 (ver materiales y métodos). **B** Northern blot con RNA extraído a las 120 h de las cepas silenciadas de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* en comparación a la cepa control Wis54-1255, como controles se muestra la carga de rRNA y la expresión del gen  $\gamma$ -actina para la normalización de los datos, a la derecha el análisis densitométrico donde se ajustó la IOD de la cepa Wis54-1255 = 1. Los duplicados que se muestran en ambos casos son estadísticos, pero no biológicos.

# VII. ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROTEÍNAS

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES\*

### MICROORGANISMOS

*Pichia pastoris* X-33 (fenotipo Mut+), levadura metilotrófica con capacidad para metabolizar metanol como única fuente de carbono para experimentos de expresión heteróloga, que proporciona muchas ventajas como sistema de expresión tales como procesamiento de proteínas, plegamiento de proteínas y modificación postraduccional.

### CONDICIONES DE CULTIVO

*P. pastoris* X-33 se cultivó en medio YPD líquido o con 2% de agar para formación de biomasa y mantenimiento de la cepa.

Se usaron 50 mL de YPD-2% glicerol para el crecimiento celular de una transformante inoculando con una colonia aislada incubando a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600} = 2-6$ . Las células se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm, temperatura ambiente por 5 min y se resuspendieron suavemente en 100 mL de medio YP con 1% de metanol en condiciones de esterilidad para la inducción de la expresión heteróloga por 72 h, se añadió 1% de metanol cada 24 h para compensar el metanol consumido y evaporado incubando a 30 °C y 250 rpm.

### TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO

La obtención del CDS de los genes *Pc-yap1*, *Pc-rsmA* y *Pc-Atf21* de *P. chrysogenum* Wis54-1255, su inserción en los plásmidos pPICZ A o pPICZ B y la clonación en células electrocompetentes de *P. pastoris* se desarrolla al detalle en la tesis de maestría CLONACIÓN Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *Pichia pastoris* DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES *PcYap1*, *PcRsmA* y *AtfB* DE *Penicillium chrysogenum*.

---

\* Los esquemas de los fragmentos amplificados por PCR, mapas de plásmidos y construcciones, así como las secuencias de oligonucleótidos usados experimentalmente en este apartado se encuentran detallados en Material suplementario.

Más detalles también se incluyen en el artículo: bZIP transcription factors PcYap1 and PcRsmA link oxidative stress response to secondary metabolism and development in *Penicillium chrysogenum* (Pérez-Pérez et al. 2022).

### **EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (IMAC) DE LAS PROTEÍNAS PcYap1, PcRsmA y PcAtf21**

Para la extracción de proteína heteróloga, una vez inducida la expresión como se indica en CONDICIONES DE CULTIVO, se siguió el protocolo del *Pichia* Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* usando 20 mL de amortiguador de rotura pH 7.4, 10 gramos de perlas de vidrio y 50 µL de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) en un tubo de 50 mL agitando vigorosamente con un vortex en periodos de 30 seg intercalados con un baño de hielo para evitar calentar la muestra. El extracto crudo de proteínas se recuperó por centrifugación a 5000 rpm, 4 °C por 15 min y se lavó con amortiguador de unión pH 8 en unidades de ultrafiltración Amicon Ultra-15 de 10 kDa (Merck Millipore) hasta concentrar a un volumen final de 1 mL aproximadamente.

Para la purificación por IMAC se usó el kit de columnas Ni-NTA Spin 50 (Qiagen) equilibrando la resina con amortiguador de unión pH 8, la columna con el concentrado de proteínas se mantuvo a 12 °C por 16 h aproximadamente, después se lavó con amortiguador de unión pH 8 suplementado con diferentes concentraciones de imidazol (50 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM) para un gradiente de purificación por centrifugación a 14000 rpm, 4 °C por 5 min, las fracciones obtenidas se conservaron a 4 °C hasta su análisis por SDS-PAGE y cuantificación por método de Bradford, alícuotas de reserva se conservaron a -20 °C para posteriores análisis.

### **ENSAYO DE RETARDO EN GEL (EMSA)**

Para determinar posibles sitios de unión de las proteínas PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 se diseñaron sondas específicas y mutadas, usando además sondas control para la validación de los experimentos. Dependiendo del tamaño de cada sonda se amplificaron por PCR (más de 80 pb) o por hibridación de dos oligonucleótidos complementarios (menos de 60 pb), el marcaje se realizó con Biotina-11-UTP siguiendo el protocolo indicado en el kit Biotin 3' End DNA Labeling (Thermo

Scientific). Para los ensayos de retardo es necesaria una sonda de doble hebra por lo que una vez hecho el marcaje se realizó el alineamiento mezclando concentraciones iguales de cada sonda (forward y reverse), se desnaturalizaron a 90 °C, posteriormente se enfrió en razón de 1 °C por min hasta llegar a la  $T_M$  de las sondas y se mantuvo en esta temperatura por 30 min, finalmente se enfrió en razón de 1 °C por min hasta llegar a  $T_a$  (22 °C aproximadamente) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Se preparó un gel de poliacrilamida nativo al 5% (H<sub>2</sub>O 6.25 mL, TBE 5X 2 mL, Acrilamida/BIS 29:1 al 40% 1.25 mL, sonicando 10 min y se añadió APS 0.025g/500 µL H<sub>2</sub>O, TEMED 6 µL) y se recorrió por 60 min a 100 V en una cámara Mini-Protean Tetra System (BIO-RAD) con TBE 0.5X frío, las reacciones se prepararon como se indica en la tabla 3 sin usar ningún tipo de agitación mecánica más que un suave pipeteo y evitando calentar los componentes con el calor de las manos:

COMPONENTE	VOLUMEN
H <sub>2</sub> O miliQ	6 µL
Amortiguador de unión 10X	2 µL
Glicerol al 50%	4 µL
MgCl <sub>2</sub> 100 mM	1 µL
Sonda -Biotinilada (20 fmol)	4 µL
Proteína purificada (10 µg)	3 µL

**Tabla 3.** Componentes de una reacción de unión con un volumen final de 20 µL, cada componente se descongela paulatinamente en una cama de hielo para evitar la degradación.

Las reacciones se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 min y se añadió 5 µL de tampón de carga a cada reacción mezclando con pipeteo suave, una vez recorrido el gel se lavaron los pozos, se cargaron las reacciones de unión y se corrieron a 80 V hasta que el azul de bromofenol migro  $\frac{3}{4}$  del gel.

Para la transferencia se usó una membrana de nylon Amersham Hybond-N+ previamente equilibrada en TBE 0.5X por 10 min, se intercalaron las esponjas, gel, membrana y papel secante en una unidad de transferencia electroforética Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) y se transfirió en TBE 0.5X frío a 380 mA constantes por 60 min.

Una vez terminada la transferencia se eliminó de la membrana el exceso de TBE con papel absorbente y se realizó el entrecruzamiento por 10 min en el UVC 500 Crosslinker para fijar la sonda



de DNA a la membrana. Para la detección de la señal se siguió el protocolo indicado por el kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module y una cámara CCD Kodak.

## ENSAYO DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS PURIFICADAS

Con las proteínas purificadas y resuspendidas en amortiguador de unión pH 8 con 300 mM de imidazol se analizó su papel como sensores de ROS *in vitro* por exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adaptando metodologías previamente descritas por Delaunay et al. (2000) y Wood et al. (2004).

Se usaron geles SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras con 25 µg de proteína PcYap1 o PcRsmA, probando por un lado un gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM mezclando cada una de estas concentraciones con la proteína (PcYap1 o PcRsmA) por pipeteo suave usando un tiempo de exposición de 15 min a temperatura ambiente.

Además se probaron diferentes tiempos de exposición y la adición de proteína control (sin tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para poder detectar la diferencia de movilidad por acción del tratamiento bajo las siguientes condiciones, 25 µg de proteína PcYap1 o PcRsmA con 400 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con tiempos de exposición de 5, 15 y 30 min a temperatura ambiente, más otras 3 reacciones exactamente iguales a las cuales justo antes de cargar en el gel de poliacrilamida se les adicionó otros 25 µg de proteína sin tratamiento mezclando bien por pipeteo suave, la corrida se realizó a 150 Volts por aproximadamente 90 min.

En un segundo experimento se usaron geles SDS-PAGE al 8% en condiciones no reductoras y reductoras como control experimental, usando 15 µg de proteína PcYap1 o PcRsmA, con la adición de 400 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cada una de las proteínas (PcYap1 o PcRsmA) por pipeteo suave y usando diferentes tiempos de exposición (5, 15 y 30 min) además de un control sin exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> todo esto a temperatura ambiente, enseguida a las muestras para los geles reducidos se les agregó buffer de carga con β-mercaptoetanol, se calentaron a 90 °C por 5 min y se cargaron en los geles de poliacrilamida.

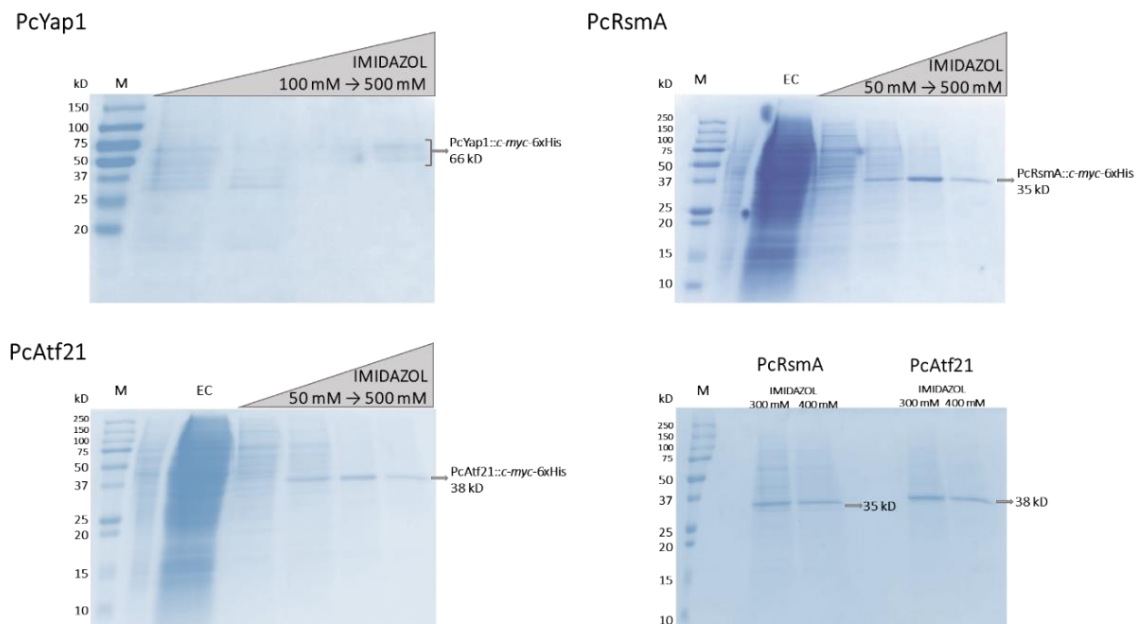
Para los geles no reducidos, a las muestras correspondientes se les añadió buffer de carga sin β-mercaptoetanol y se cargaron sin calentar en los geles de poliacrilamida correspondiente, se corrió a 150 Volts por aproximadamente 90 min.

Terminada la electroforesis se fijaron los geles y se tiñeron con Blue Silver Coomassie (Candiano et al. 2004) y se fotodocumentaron con la placa Molecular Imager Gel Doc EZ System simple tray White (BIO-RAD).

## RESULTADOS

Después de la expresión de PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 en *P. pastoris* se realizó una extracción de proteína total y se purificó utilizando un gradiente con diferentes concentraciones de imidazol como se indica en Procedimientos Experimentales, las fracciones recuperadas se analizaron en SDS-PAGE como se muestra en la figura 15.

Se pueden observar las bandas correspondientes a las proteínas PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 con sus respectivos pesos moleculares en kilodaltones considerando el peso que agrega la etiqueta *c-myc-6xHis* a cada una de ellas. Analizando estas purificaciones se eligió la fracción de 300 mM para trabajar en experimentos posteriores por el grado de pureza y concentración de la proteína.

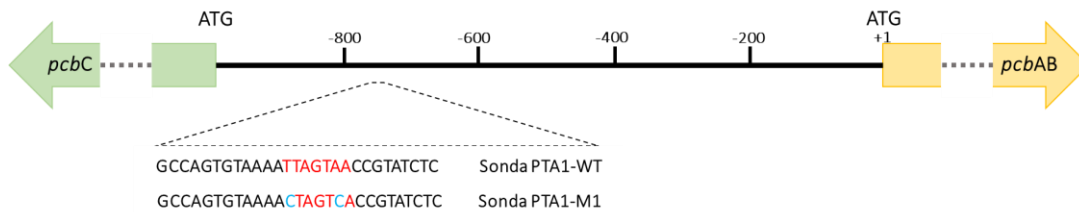


**Figura 15.** Purificación de proteínas recombinantes PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 etiquetadas con *c-myc-6xHis*. Carril M: 2  $\mu$ L de marcador Precision Plus Protein 250 kD (BIO-RAD), carril EC: Extracto crudo de proteína, las concentraciones de imidazol utilizadas fueron 100, 250, 300 y 500 mM para PcYap1::c-myc-6xHis, y 50, 200, 300 y 500 mM para PcRsmA::c-myc-6xHis y PcAtf21::c-myc-6xHis. Panel inferior derecho, comparación de tamaño entre PcRsmA::c-myc-6xHis y PcAtf21::c-myc-6xHis utilizando las fracciones con mayor porcentaje de purificación.

Una vez identificadas las fracciones con proteína parcialmente purificada se procedió a realizar los EMSA necesarios para la confirmación de hipotéticos sitios de unión para las proteínas PcYap1, PcRsmA y PcAtf21.

## IDENTIFICACIÓN DE SITIOS ESPECÍFICOS DE UNIÓN PARA PcYap1 Y PcRsmA EN LA REGIÓN INTERGÉNICA *pcbAB-pcbC*

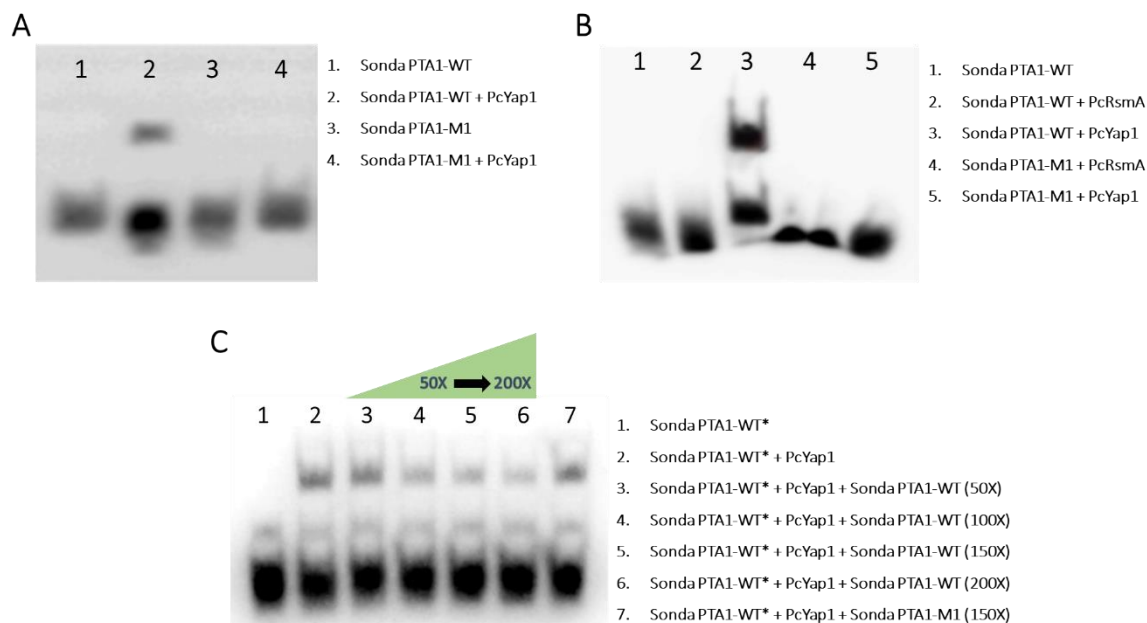
Partiendo del antecedente reportado por Kosalková et al. (2000) que identificó la secuencia TTAGTAA en la posición 766-760 pb corriente arriba del codón ATG de inicio del gen *pcbAB* a la cual se une un factor de transcripción sin identificar que se nombró PTA1, se diseñó una sonda de 28 pb que incluyera esta secuencia de unión (TTAGTAA) que llamamos PTA1-WT y una segunda sonda de 28 pb nombrada PTA1-M1 con el cambio de bases en las posiciones 1 y 6 para tener la secuencia mutada CTAGTCA (Figura 16), y así poder determinar la especificidad de unión. Esto con la finalidad de identificar si el factor transcripcional PTA1 corresponde a PcYap1 o PcRsmA.



**Figura 16.** Esquema general de la región intergénica *pcbAB-pcbC* indicando la posición y la secuencia de las sondas PTA1-WT y PTA1-M1, en color rojo se muestra la secuencia de unión.

Con las sondas debidamente etiquetadas e hibridadas se probaron contra las proteínas PcYap1 y PcRsmA. Posterior a la incubación se corrieron en un PAGE nativo (Figura 17) donde se puede observar la unión de PcYap1 a la secuencia TTAGTAA, pero no a la secuencia mutada CTAGTCA (Figura 17A). Por otro lado, PcRsmA no se une a ninguna de las dos secuencias utilizadas (Figura 17B).

Una vez comprobada la unión de PcYap1 a la sonda PTA1-WT ahora era necesario analizar la especificidad añadiendo a las reacciones un exceso de sondas PTA1-WT y PTA1-M1 sin etiquetado, denominadas sondas frías. En la figura 17C se puede observar la competencia entre las sondas PTA1-WT\* (biotinilada) y PTA1-WT (sonda fría) vista como una pérdida progresiva de señal en la unión proteína-sonda biotinilada cuando se incrementa la concentración de sonda fría en la reacción, mientras que la sonda PTA1-M1 no compitió contra PTA1-WT\*, con este resultado podemos afirmar que la unión de PcYap1 a TTAGTAA es específica.

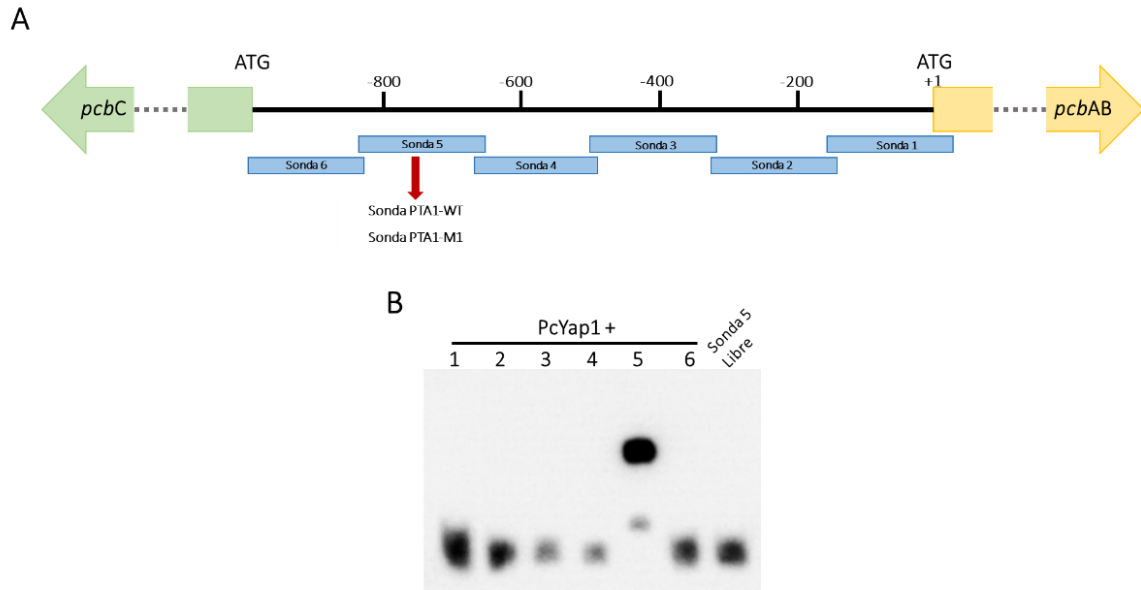


**Figura 17.** EMSA para determinar la capacidad de unión de PcYap1 y PcRsmA a la secuencia TTAGTAA. **A** Reacción de unión positiva de PcYap1 a la sonda PTA1-WT que contiene la secuencia TTAGTAA y falta de unión a la sonda PTA1-M1 que contiene la secuencia mutada CTAGTCA. **B** Prueba de unión de la proteína PcRsmA con las sondas PTA1-WT y PTA1-M1 usando como reacción de control la proteína PcYap1 contra las mismas sondas. **C** Prueba de especificidad para la unión de PcYap1 a la secuencia TTAGTAA donde PTA1-WT\* se refiere a la sonda etiquetada con biotina y PTA1-WT y PTA1-M1 son las “sondas frías” (sin etiquetado) que se adiciona en altas concentraciones que van de 50X a 200X como se indica en la parte superior del gel.

Una vez confirmado este primer sitio de unión para PcYap1 se decidió realizar un rastreo a lo largo de toda la región intergénica *pcbAB-pcbC* para buscar otros posibles sitios de unión cubriendo una región de 1062 pb. En una primera etapa se diseñaron oligonucleótidos (Suplemento 9) para amplificar por PCR las siguientes sondas:

- Sonda 1: 198 pb
- Sonda 2: 195 pb
- Sonda 3: 186 pb
- Sonda 4: 185 pb
- Sonda 5: 191 pb
- Sonda 6: 203 pb

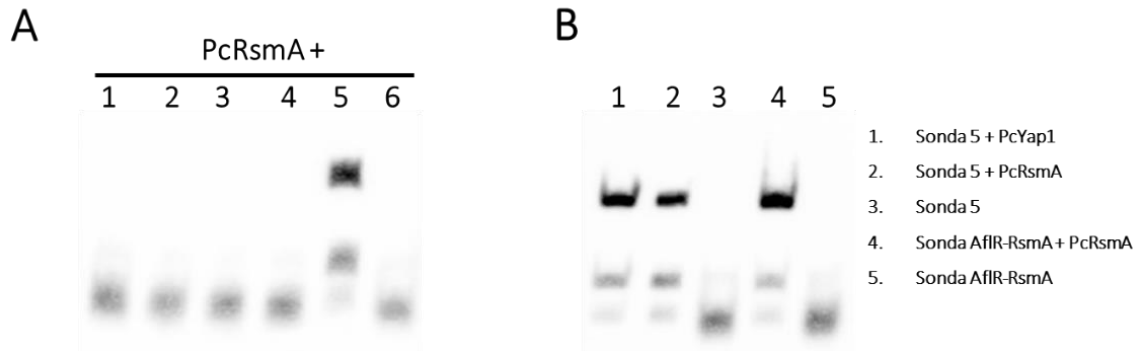
Estas sondas además de cubrir toda la región intergénica *pcbAB-pcbC* se diseñaron para empalmarse unas sobre otras en sus extremos (Figura 18A), una vez amplificadas y etiquetadas con biotina se hibridaron para poder usarse en reacciones de unión contra PcYap1 obteniendo solo una interacción positiva con la sonda 5 (Figura 18B). En esta sonda se encuentra el sitio de unión TTAGTAA por lo que se puede confirmar un solo sitio de unión para PcYap1 dentro de la región intergénica *pcbAB-pcbC*.



**Figura 18.** Análisis de la región intergénica *pcbAB-pcbC* para identificar posibles sitios de unión de PcYap1. **A** Esquema para representar la ubicación del conjunto de 6 sondas para un primer rastreo, se indica además la posición de la sonda PTA1-WT y PTA1-M1 dentro de la sonda 5. **B** EMSA con las reacciones de unión de PcYap1, los carriles 1 a 6 corresponden a reacciones de unión entre las sondas 1 a 6 con PcYap1 y como control el último carril muestra la sonda 5 libre.

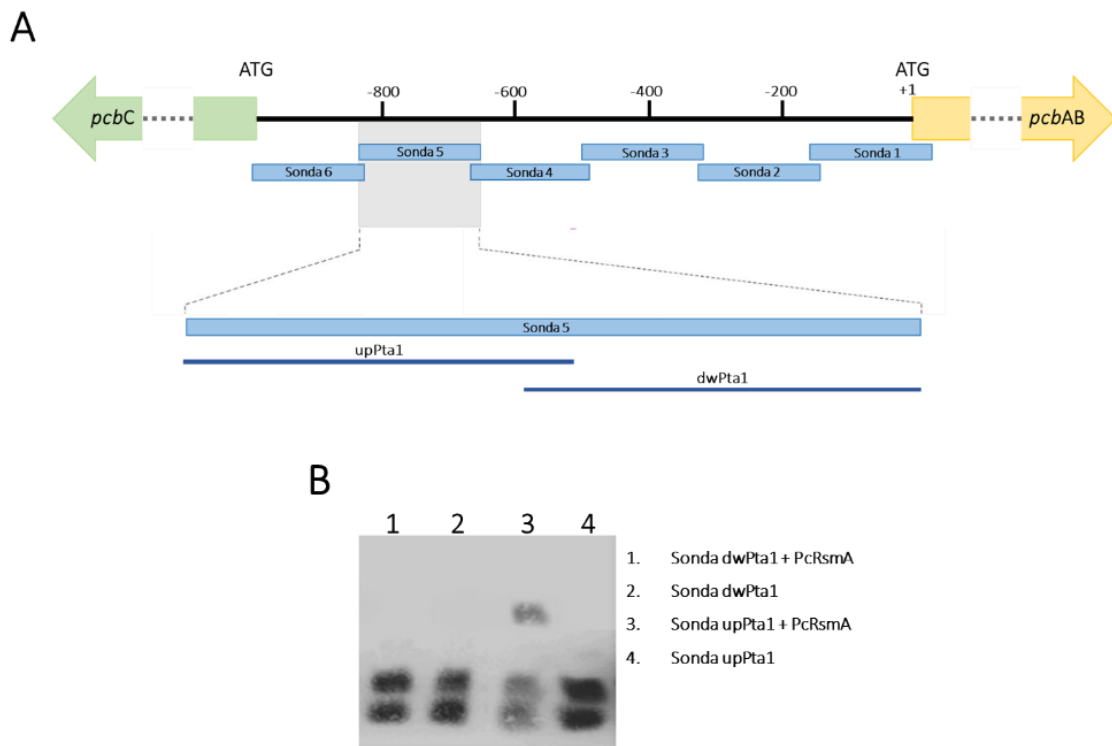
Hasta este punto se había determinado lo siguiente: **1)** PcYap1 se une de manera específica a la secuencia TTAGTAA (Figura 17A), **2)** PcRsmA no se une a la secuencia TTAGTAA (Figura 17B), **3)** Haciendo un rastreo inicial en toda la región intergénica *pcbAB-pcbC* se confirmó la unión de PcYap1 a la sonda 5 que contiene la secuencia TTAGTAA, de la sonda PTA1-WT, como sitio único de unión (Figura 18B), **4)** Experimentalmente pudimos concluir que PcRsmA es un regulador positivo de la biosíntesis de penicilina (Ver apartado: Análisis de Regulación de la Expresión Génica). Con esta información se planteó la posibilidad de que PcRsmA tenga un sitio de unión diferente dentro de la región intergénica *pcbAB-pcbC* y/o su participación en la regulación sea de manera indirecta a través de otros genes involucrados en la biosíntesis de penicilina.

Así que se realizó un EMSA primero de PcRsmA contra las 6 sondas que cubren toda la región intergénica *pcbAB-pcbC* obteniendo un resultado positivo con la sonda 5 (Figura 19A). Un segundo EMSA para reconfirmar la unión de esta sonda tanto a PcYap1 como a PcRsmA y para probar como control positivo una sonda llamada *AflR-RsmA* de 25 pb (Suplemento 9) que corresponde a una región en el promotor del gen *AflR* del cluster de esterigmatocistina de *A. nidulans* que contiene la secuencia TGACACA (Figura 19B), la cual se había comprobado que era un sitio de unión de la proteína RsmA en *A. nidulans* (Yin et al. 2012).



**Figura 19.** Análisis de la región intergénica *pcbAB-pcbC* para identificar posibles sitios de unión de PcRsmA. **A** EMSA con las reacciones de unión de PcRsmA, los carriles 1 a 6 corresponden a reacciones de unión entre las sondas 1 a 6 con PcRsmA. **B** EMSA para reconfirmar la unión de PcYap1 y PcRsmA a la sonda 5, como control positivo la sonda AflR-RsmA que contiene la secuencia de unión TGACACA para RsmA en *A. nidulans*.

Con un resultado positivo para ambas proteínas contra la sonda 5 se decidió fragmentarla en 2 sondas nuevas nombrándolas dwPta1 y upPta1 (Figura 20A) para un nuevo análisis, PcRsmA solo se unió a la sonda upPta1 (Figura 20B), en la secuencia de dicha sonda se encuentra el sitio de unión TTAGTAA de PcYap1.

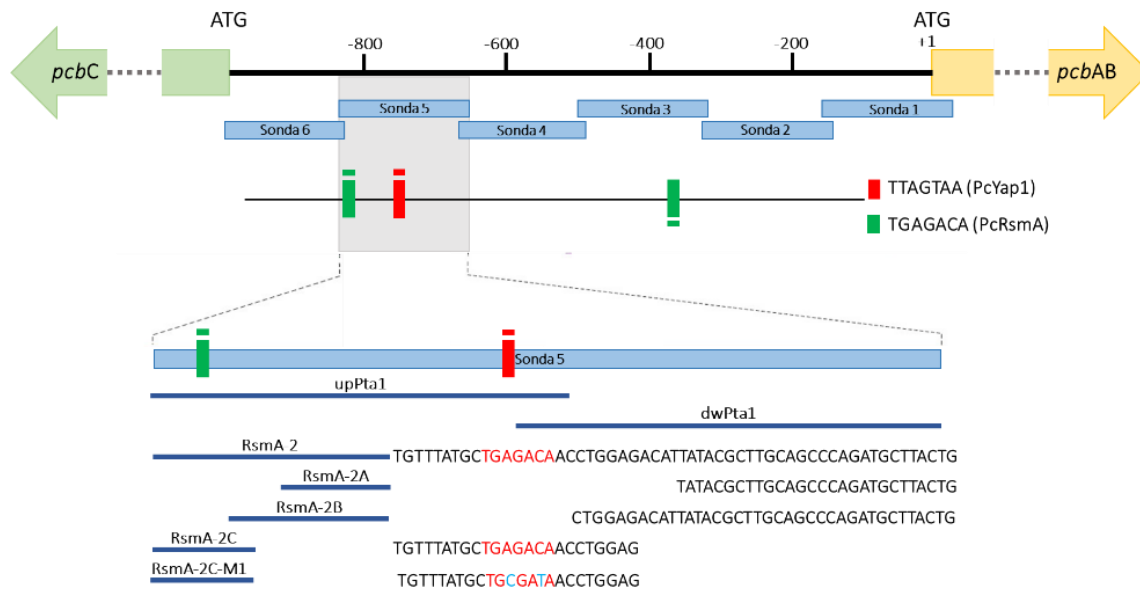


**Figura 20.** Identificación de posibles sitios de unión para PcRsmA. **A** Diseño de las sondas upPta1 y dwPta1 dentro de la sonda 5 ubicada en la región intergénica *pcbAB-pcbC*. **B** EMSA para PcRsmA contra las sondas dwPta1 y upPta1.

Analizando a detalle la secuencia de la sonda upPta1 se encontró la secuencia TGAGACA ubicada 68 pb corriente arriba de la secuencia TTAGTAA de PcYap1. TGAGACA es muy similar a TGACACA, sitio de unión presente en el promotor del gen *AflR* de *A. nidulans* para RsmA, y también es similar a las

secuencias de unión hipotéticas encontradas en un análisis MEME de promotores regulados positivamente en una cepa *OE::rsmA* de *A. nidulans* (Yin et al. 2012).

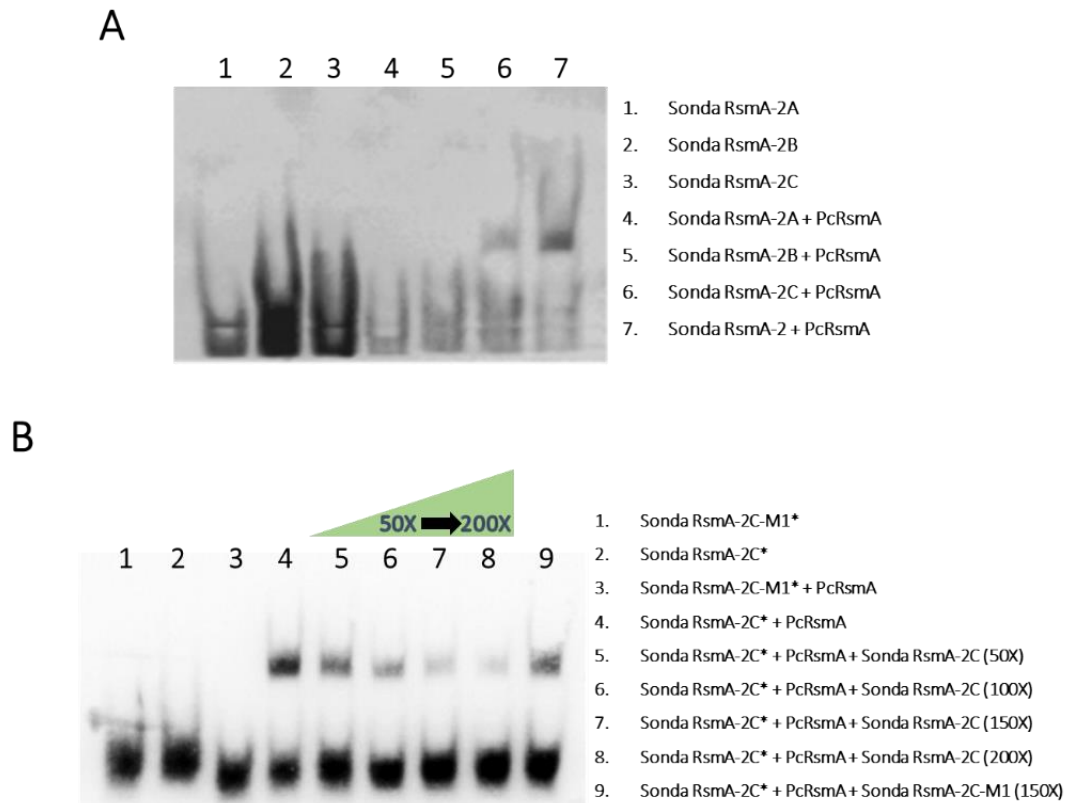
Siguiendo con la identificación de una secuencia de unión para PcRsmA, a partir de la sonda upPta1 se diseñaron nuevas sondas que incluyen o excluyen la secuencia TGAGACA (Figura 21).



**Figura 21.** Diseño de sondas para identificación del sitio de unión para PcRsmA en la región intergénica *pcbAB-pcbC*, se muestra la posición de las primeras 6 sondas, enseguida se indica la secuencia y posición de unión para PcYap1 y PcRsmA (barras de color rojo y verde) las pequeñas barras ubicadas en la parte superior o inferior indican la hebra en la que se ubica la secuencia de unión. Se indica también la posición de las sondas upPta1 y dwPta1 junto con el diseño de las nuevas sondas que incluyen o excluyen la secuencia TGAGACA a partir de la secuencia de la sonda upPta1.

El EMSA con las nuevas sondas arrojó un resultado positivo únicamente con las sondas RsmA-2 y RsmA-2C que contienen en su secuencia el sitio TGAGACA (Figura 22A). A continuación, se necesitaba confirmar la unión, así como su especificidad por lo que se diseñó una sonda con la modificación en las bases 3 y 6 convirtiendo el sitio en TGCGATA (sonda RsmA-2C-M1). A las reacciones de unión se les añadió un exceso de sonda RsmA-2C y RsmA-2C-M1 sin etiquetar (sondas frías). En la figura 22B se puede observar la competencia entre las sondas RsmA-2C\* (biotinilada) y RsmA-2C (sonda fría añadida en concentraciones excesivas) como una pérdida progresiva de señal en la unión proteína-DNA, mientras que la sonda RsmA-2C-M1 no compitió en la reacción ni se unió a PcRsmA. Lo que nos lleva a la conclusión de que la unión de PcRsmA a TGAGACA es específica.





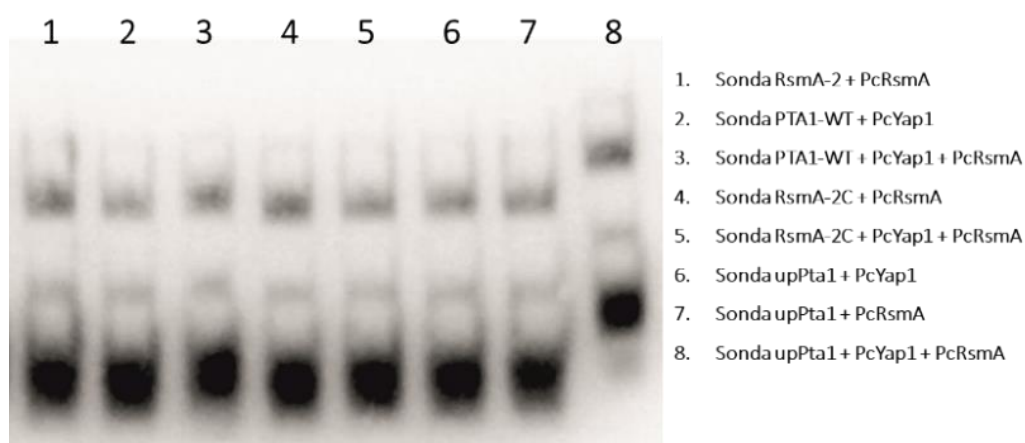
**Figura 22.** Identificación de posibles sitios de unión de PcRsmA en la región intergénica *pcbAB-pcbC*. **A** Ubicación de la secuencia de unión de PcRsmA; las sondas que contienen la secuencia TGAGACA (RsmA-2 y RsmA-2C) están unidas a PcRsmA, mientras que las sondas que carecen de esta secuencia (RsmA-2A y RsmA-2B) no lo están. **B** Ensayo de especificidad para la unión de PcRsmA a la secuencia TGAGACA presente en la sonda RsmA-2C-M1, donde RsmA-2C\* y RsmA-2C-M1\* se refiere a sondas etiquetadas con biotina; RsmA-2C y RsmA-2C-M1 son las “sondas frías” (sin etiquetado) que se adiciona en altas concentraciones que van de 50X a 200X como se indica en la parte superior del gel.

En la figura 21 se puede observar que la secuencia TGAGACA además de estar en la posición -835 también se encuentra en la posición -377 en orientación inversa, esta segunda secuencia se encuentra dentro de la sonda 3, con la cual se obtuvo un resultado negativo en el EMSA contra PcRsmA (Figura 19A). Si solo una de las secuencias TGAGACA da resultados positivos podemos inferir que el contexto de dicha secuencia en dos posiciones diferentes es importante y se necesitan nucleótidos específicos adicionales que favorezcan la unión.

El hecho de que el sitio de unión confirmado para PcYap1 (TTAGTAA) se encuentre tan cerca del sitio de unión confirmado para PcRsmA (TGAGACA) planteó la posibilidad de que ambas proteínas interactúen, de alguna manera, para poder unirse a sus respectivos sitios específicos en la región intergénica *pcbAB-pcbC*. Así que se diseñó un EMSA eligiendo las sondas ya probadas que contienen alguno de los sitios de unión, o ambos, y se pusieron a interactuar con las proteínas PcYap1 y PcRsmA de manera individual y en conjunto (Figura 23), suponiendo que en el caso de que hubiera

alguna interacción esta se vería en forma de super-retraso en el PAGE nativo provocado por la unión de cada proteína a su sitio específico.

De las sondas utilizadas la única que contiene ambos sitios de unión es upPta1 y al reaccionar con las proteínas PcYap1 y PcRsmA por separado se obtiene un retraso normal si se compara con las demás reacciones, pero al poner en la misma reacción de unión ambas proteínas aparece el super-retraso. Esto, probablemente se deba a que al formarse el complejo proteínas-DNA físicamente le resulta más difícil la migración dentro de la malla del gel y no necesariamente por una interacción entre proteínas.



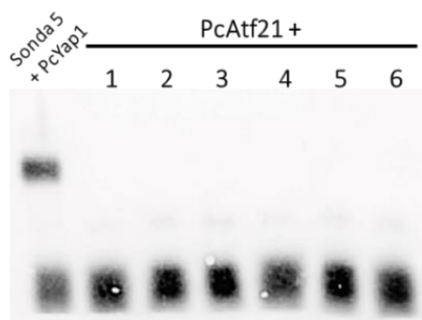
**Figura 23.** Análisis de una posible interacción entre PcYap1 y PcRsmA al unirse a sus respectivos sitios de unión. Todas las sondas elegidas contienen al menos uno de ambos sitios de unión: PcYap1 (PTA1-WT), PcRsmA (RsmA-2C) o ambos (upPta1), se probaron en reacciones independientes para cada proteína y en conjunto. Se puede observar que no se produce ningún super-retraso como producto de la interacción aparente entre las proteínas cuando una de ellas reconoce y se une a su sitio específico (carriles 3, 5), con la excepción de la reacción que incluye a la sonda upPta1 que contiene ambos sitios de unión (carril 8), sin embargo, esto no demuestra una interacción entre proteínas y se puede justificar por la formación del complejo PcYap1-upPta1-PcRsmA.

### CAPACIDAD DE UNIÓN DE UN SITIO CRE DENTRO DEL PROMOTOR DEL GEN *penDE* A PcRsmA, PERO NO A PcYap1 O PcAtf21

El factor de transcripción AtfB/Atf21, perteneciente a la familia de factores de transcripción ATF/CREB descrito en algunos *Aspergilli* (Hong et al. 2013, Fountain et al. 2016), se relaciona tanto a la respuesta a estrés oxidante como a la regulación del metabolismo secundario. Los factores de la familia ATF/CREB se unen como homo o heterodímeros a la secuencia consenso TKACGTMA (Hai y Curran. 1991), que coincide con la secuencia reguladora TTAGTAA en la región intergénica *pcbAB-pcbC* aunque con la presencia de una base S adicional. Por otro lado, la secuencia TTACGTAA está presente en la región promotora del gen *penDE* en la posición -697 desde el codón ATG de inicio,

por lo que se planteó analizar esta región promotora con la proteína PcAtf21 por considerarse un homólogo de AtfB.

Primero se corrió un EMSA de PcAtf21 contra las 6 sondas que cubren la región intergénica *pcbAB-pcbC* (Figura 24), sin que se detectara una unión proteína-DNA por lo que se descartó la posibilidad de que PcAtf21 reconozca la secuencia TTAGTAA (dentro de la sonda 5) como sitio de unión.

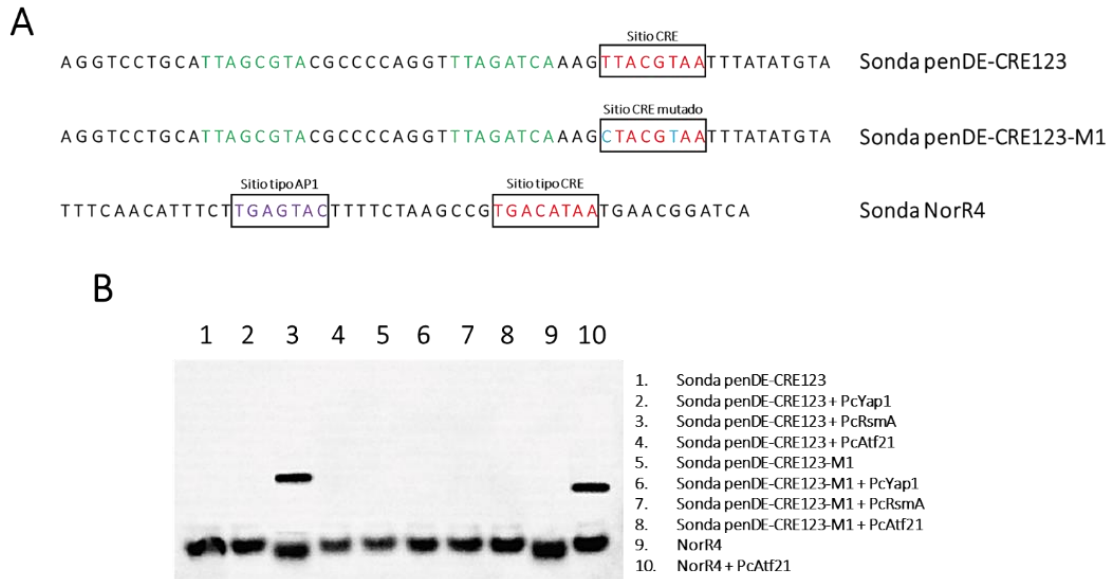


**Figura 24.** Análisis de la región intergénica *pcbAB-pcbC* para identificar posibles sitios de unión de PcAtf21 por EMSA, en el primer carril como control positivo se muestra la unión de PcYap1 a la sonda 5, los siguientes 6 carriles corresponden a reacciones de unión entre las sondas 1 a 6 con PcAtf21.

Partiendo del promotor del gen *penDE* (Figura 25A) se diseñó una sonda de 57 pb nombrada penDE-CRE123 que contiene el sitio CRE: TTACGTAA además de dos secuencias similares a CRE corriente arriba; para verificar especificidad de unión se diseñó la sonda penDE-CRE123-M1 con el sitio CRE mutado a CTACGTAA. También había que establecer la funcionalidad de la proteína PcAtf21 *in vitro* por lo que se usó la sonda control NorR4 (51 pb), cuya secuencia se encuentra dentro del promotor del gen *nor-1* de *A. parasiticus* y que contiene un sitio del tipo AP-1 (TGAGTAC) y un sitio del tipo CRE (TGACATAA) (Roze et al. 2011).

Las reacciones de unión se diseñaron para usar los tres factores de transcripción que estamos estudiando con el fin de verificar si tienen un sitio de unión dentro del promotor del gen *penDE*. En la figura 25B se puede observar el PAGE nativo de estas reacciones, donde solo PcRsmA se unió a la sonda penDE-CRE123 pero no a la sonda mutada, así que PcRsmA se une de manera específica al sitio TTACGTAA. En el caso de PcAtf21, al obtenerse un resultado positivo con la sonda de control NorR4 pero negativo con la sonda penDE-CRE123 se plantea la posibilidad del requerimiento de un sitio del tipo AP-1 que en conjunto con un sitio CRE o del tipo CRE favorece la unión. Esta idea se fortalece con la falta de unión de PcAtf21 dentro de la región intergénica *pcbAB-pcbC*, que no contiene un sitio del tipo CRE (Figura 24).

Roze et al. (2011) demostraron esta hipótesis para AtfB en *A. parasiticus* al confirmar la unión de AtfB a la sonda NorR4, estableciendo la necesidad de al menos un sitio del tipo AP-1 y de un sitio del tipo CRE para que esta unión tenga lugar.



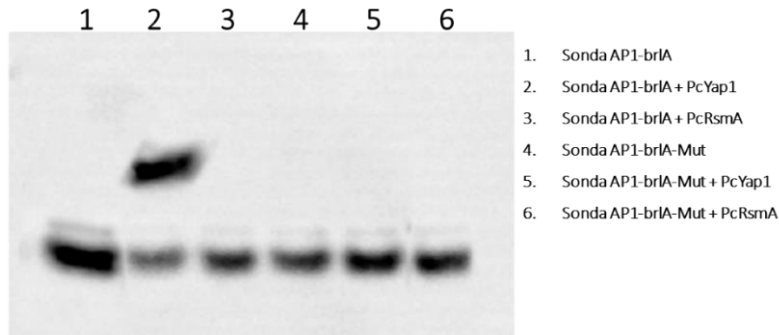
**Figura 25.** Identificación de posibles sitios de unión para PcAtf21 dentro del promotor de *penDE*. **A** Secuencias de las sondas diseñadas para el EMSA donde: penDE-CRE123 contiene un sitio CRE (resaltado en rojo) y dos sitios del tipo CRE (resaltados en verde), penDE-CRE123-M1 con la indicación de los cambios de nucleótidos para la mutación del sitio CRE (resaltado en azul), NorR4 como control con un sitio tipo CRE (resaltado en rojo) y un sitio tipo AP-1 (resaltado en morado). **B** EMSA de las reacciones de unión de PcYap1, PcRsmA y PcAtf21 contra las sondas del inciso **A**, NorR4 se usó como control positivo en el experimento.

## REGULACIÓN DE LA CONIDIACIÓN A TRAVÉS DE LA UNIÓN DE PcYap1 A LA SECUENCIA ESPECÍFICA: TTACTAA EN EL PROMOTOR DE *brlA*

Hemos podido confirmar que tanto PcYap1 como PcRsmA están involucrados en la regulación del proceso de conidiación de manera clara, por lo que investigamos de manera particular el promotor del primer gen en la vía central de la regulación de la conidiación: *brlA*. Este análisis reveló la presencia de un típico sitio AP-1: TTACTAA ubicado 71 pb corriente arriba del codón de inicio ATG.

Se diseñaron las sondas AP1-*brlA*, ubicada entre -58 y -90 pb corriente arriba del codón ATG de inicio de *brlA*, con la secuencia de unión TTACTAA, y la sonda AP1-*brlA*-Mut con el cambio en 2 nucleótidos para obtener el sitio mutado TGACTAG. Estas sondas se probaron contra las proteínas PcYap1 y PcRsmA, en el EMSA se puede observar que solo se obtuvo una unión positiva entre la sonda AP1-*brlA* con PcYap1, no así con la sonda mutada (Figura 26).

AAAACAATACAATTTACTAAAGTCCACTGGGCA Sonda AP1-brlA  
 AAAACAATACAATTTGACTAGAGTCCACTGGGCA Sonda AP1-brlA-Mut



**Figura 26.** Identificación de posibles sitios de unión para PcYap1 y PcRsmA en el promotor de *brlA*, se muestran las sondas de prueba para el EMSA: AP1-brlA y AP1-brlA-Mut, con el sitio AP1 resaltado en rojo y el cambio en dos nucleótidos para la sonda mutada resaltado en azul, así como el PAGE nativo de las reacciones de unión.

Con este resultado, sumado a los obtenidos por cinética de condición en diferentes fondos génicos y Northern blot (Ver: Análisis de Regulación de la Expresión Génica), podemos concluir que la conidiación en *P. chrysogenum* es regulada por PcYap1 y se ejerce a través de la regulación en la expresión del gen *brlA*, probablemente a través de la unión al sitio TTACTAA ubicado en su promotor, aunque no se debe descartar que PcYap1 regule otros genes a lo largo del proceso de conidiación. Además, *Pc-yap1* está regulado por PcRsmA, lo cual tiene también una incidencia en la regulación de la conidiación (Figura 14).

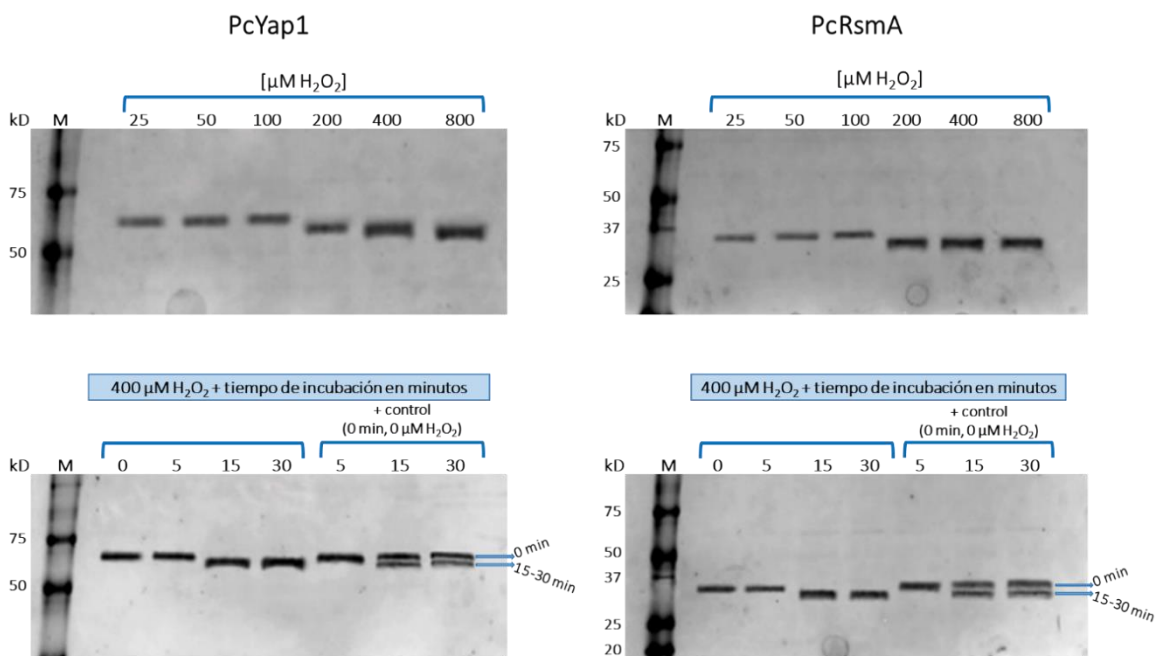
### ROS GENERADOS *IN VITRO* POR EXPOSICIÓN A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PROVOCAN CAMBIOS CONFORMACIONALES DE PcYap1 Y PcRsmA

Teníamos demostrada la participación de PcYap1 y PcRsmA en la defensa contra el estrés oxidante *in vivo*, así que se planteó la posibilidad de analizar *in vitro* una posible respuesta al uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para estudiar el posible papel como sensores de ROS de PcYap1 y PcRsmA.

Se utilizaron las proteínas PcYap1 y PcRsmA incubándolas con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 min cargándolas posteriormente en un gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras (ver Procedimientos Experimentales). En la parte superior de la figura 27 se puede observar que a partir de la concentración 200 μM se afecta la movilidad de las proteínas migrando más rápido en el gel, con esta información se decidió usar la concentración 400 μM con diferentes tiempos de incubación más un control correspondiente a 0 min de incubación, también se decidió mezclar

ambas condiciones para poder observar en el mismo carril un cambio de movilidad si es que este ocurriera, en estos geles se detectó un cambio con 15 y 30 min de incubación con respecto al control (0 min) logrando la ligera separación de las bandas por un diferencial de migración en la malla del gel (parte inferior Figura 27).

Este cambio en la movilidad se puede interpretar como un cambio conformacional en las proteínas inducido por la presencia de  $H_2O_2$  a partir de determinada concentración y tiempo de exposición, lo que generó la formación de enlaces disulfuro por condiciones oxidantes. Este fenómeno fue descrito anteriormente en Yap1 de *S. cerevisiae*, Wood et al. (2004) fusionaron a la proteína verde fluorescente (GFP) un fragmento de Yap1, en específico la región que contenía los dos dominios ricos en cisteínas, y se buscaron posibles cambios conformacionales al comparar células tratadas con  $H_2O_2$  y sin tratar, además los extractos de dichas células se procesaron en condiciones no reductoras en geles SDS-PAGE, la detección se realizó con un anticuerpo para GFP. Este experimento mostró que el tratamiento con  $H_2O_2$  provocaba que PcYap1 estuviera en una forma oxidada con enlaces disulfuro por lo que migraba más rápido en el SDS-PAGE.



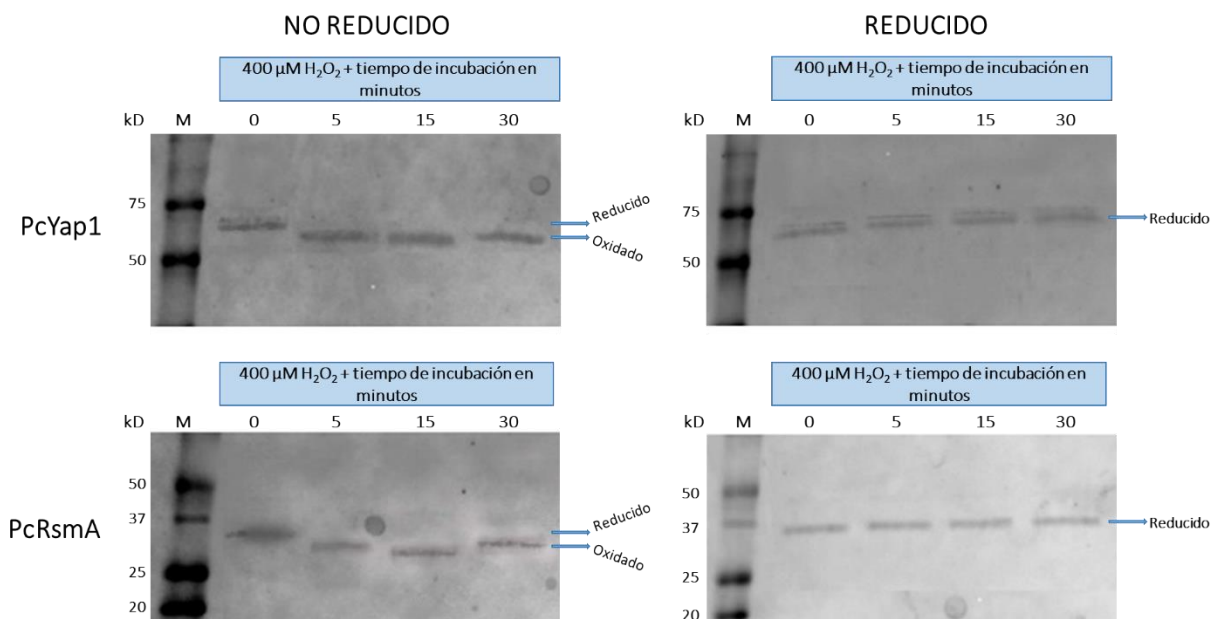
**Figura 27.** Cambios de movilidad en SDS-PAGE de PcYap1 y PcRsmA tratadas con un gradiente de  $H_2O_2$  antes de cargarlos en el gel, con el fin de determinar en 15 min de exposición la concentración adecuada para inducir un cambio de movilidad (paneles superiores). Además, se probaron diferentes tiempos de incubación (paneles inferiores), los tres carriles de la derecha se mezclaron con un control (sin  $H_2O_2$ ) para observar diferencia de movilidad. Los geles tenían una concentración de acrilamida del 10%, se usaron 25  $\mu$ g de proteína en cada reacción bajo condiciones reductoras, carril M: 2  $\mu$ L de marcador Precision Plus Protein 250 kD (BIO-RAD).

Para confirmar nuestros resultados que son análogos a los presentados por Wood et al. (2004) se corrieron nuevos SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 28) usando un

tratamiento con 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y diferentes tiempos de exposición (0 a 30 min), observando un cambio en la movilidad solo bajo condiciones no reductoras, al añadir  $\beta$ -mercaptoetanol y calor se rompen los enlaces disulfuro por reducción de los residuos de cisteína lo que provoca un cambio conformacional.

Bajo condiciones fisiológicas normales Yap1 en *S. cerevisiae* entra y sale del núcleo, los residuos C-303 (N-terminal) y C-598 (C-terminal) son esenciales para la activación de Yap1 por  $\text{H}_2\text{O}_2$  ya que forman un enlace disulfuro tras la oxidación que resulta en un cambio conformacional enmascarando el reconocimiento de la Señal de Exportación Nuclear (NES), ubicada en el C-terminal, por parte de la exportina Crm1 y como consecuencia no hay exportación desde el núcleo (Delaunay et al. 2000, Wood et al. 2004).

PcRsmA muestra la misma capacidad de detección de ROS con el correspondiente cambio conformacional *in vitro* que PcYap1. North et al. (2011) identificaron a Yap3 en *S. cerevisiae*, importante en la tolerancia a hidroquinona, inductor de estrés oxidante, localizándose en el núcleo como respuesta específica por adición de hidroquinona, sin embargo, queda por dilucidar si el mecanismo de localización es similar al de Yap1.



**Figura 28.** Cambios de movilidad en SDS-PAGE de PcYap1 y PcRsmA tratadas con 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y diferentes tiempos de exposición (0 a 30 min) antes de cargarlos en el gel, se compararon condiciones reductoras (paneles del lado izquierdo) y no reductoras (paneles del lado derecho). Los gels tenían una concentración de acrilamida del 8%, se usaron 15  $\mu\text{g}$  de proteína en cada reacción, carril M: 2  $\mu\text{L}$  de marcador Precision Plus Protein 250 kD (BIO-RAD).

## VIII. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

### PROCEDIMIENTOS

Se planteó realizar una serie de análisis bioinformáticos de PcYap1 y PcRsmA aprovechando diversas herramientas y plataformas informáticas para aportar información sobre el funcionamiento y comportamiento de nuestros factores de transcripción dentro de la célula, que además sirve de complemento a la información obtenida de manera experimental.

#### CONSERVACIÓN DE CISTEÍNAS

Determinar la posible conservación de cisteínas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas PcYap1 y PcRsmA es vital ya que se ha descubierto su importancia como sensores redox, que a su vez median los cambios conformacionales determinando la localización dentro de la célula (Mulford and Fassler 2011).

En el servidor clustal Omega primero se hizo un alineamiento de PcYap1 contra Yap1 de *S. cerevisiae* para encontrar la correspondencia de las cisteínas a lo largo de la cadena de aminoácidos, y ubicando posibles interacciones que correspondan con las interacciones que presenta Yap1 de *S. cerevisiae*.

Se ha reportado además que en el caso de Yap1 de *S. cerevisiae* el dominio C-terminal contiene 3 residuos de cisteínas que son necesarias para mantener a Yap1 en el citoplasma (Kuge et al. 1997), algo que también ocurre en Pap1 de *S. pombe* (Toda et al. 1992).

Por lo que, corriendo un segundo alineamiento ahora entre PcYap1 de *P. chrysogenum*, comparando contra Yap1 de *S. cerevisiae* y Pap1 de *S. pombe*, se concentró la búsqueda en el CRD para ubicar estos 3 posibles residuos de cisteínas conservados.

#### NLS (SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR) Y NES (SEÑAL DE EXPORTACIÓN NUCLEAR)

Muchos factores de transcripción se mantienen en un estado inactivo en el citoplasma hasta que se recibe una señal que promueve su translocación al núcleo, este transporte se lleva a cabo a través del complejo de poros nucleares (NPC) donde se reconocen secuencias de señal específicas que



detonan la difusión desde y hacia el núcleo. Estas señales, cuando hay importación se denominan señal de localización nuclear (NLS) y cuando hay exportación se denominan señal de exportación nuclear (NES) (Yan et al. 1998, Wood et al. 2004).

Así, en estado inactivo la localización es normalmente citoplasmática y se activan por translocación nuclear si las células se encuentran en un ambiente oxidante (Kuge et al. 1997).

Yap1 de *S. cerevisiae* tiene una NES incrustada dentro de su dominio rico en cisteína (CRD), los residuos de cisteínas sirven como sensores redox, formando puentes disulfuro, lo que determina la accesibilidad de la NES y por lo tanto la ubicación y actividad del factor de transcripción (Yan et al. 1998). De ahí la importancia de ubicar hipotéticas NES y NLS dentro de la secuencia de aminoácidos de PcYap1 y PcRsmA, identificarlas nos acerca más a conocer el comportamiento de estos factores de transcripción en la célula.

El servidor cNLS Mapper basado en T (Kosugi et al. 2009) permite la predicción de importinas  $\alpha$ -dependientes de NLS, este método predictivo permite resultados precisos, sensibles y específicos por sobre cualquier otro método.

Un score de 8, 9 o 10 habla de localización exclusivamente en el núcleo, un score de 7 u 8 es localización parcial en el núcleo, mientras que un score de 3 a 6 se refiere a localización tanto en el núcleo como en el citoplasma, y aquellos con un score de 1 o 2 es localización exclusiva en el citoplasma.

LocNES es una herramienta de Support Vector Machine (SVM) que localiza señales clásicas de exportación nuclear en cargas Crm1. El exportador carioferina  $\beta$  Crm1 reconoce cientos de proteínas de funcionamiento amplio, la mayoría de las cargas de Crm1 contienen las NES clásicas (también conocidas como NES ricas en leucina), un péptido con 8-15 aminoácidos, espaciados regularmente con residuos hidrófobos conservados (Xu et al. 2015). LocNES predice hipotéticos NES en una secuencia de aminoácidos y cuando esos NES tienen un score mayor a 0.1 es más probable que esos NES hipotéticos sean NES reales.

Además, se ha observado que el dominio rico en cisteínas orientado al carboxilo terminal (C-CRD) se conserva para Yap1, Pap1 y PcYap1. En el caso de Yap1 se ha localizado una NES dentro del C-CRD, que se conserva también para Pap1, por lo que haciendo un alineamiento se buscó la NES correspondiente para PcYap1.

## RED DE ASOCIACIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

Las proteínas y sus interacciones funcionales forman la columna vertebral de la maquinaria celular (Szkarczyk et al. 2019) y la red que se forma con estas interacciones permite comprender los fenómenos biológicos que ocurren. Con la base de datos STRING (v 11.0) se recopila de manera integral todas las fuentes de información para predecir computacionalmente la interacción proteína-proteína, las interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales).

Se realizó la búsqueda con los identificadores de la proteína PcYap1 (Pc20g15280) y PcRsmA (Pc12g16510) registrados en el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information) contra el microorganismo *P. chrysogenum* para obtener la red de asociación proteína-proteína vinculada a estos factores de transcripción.

## MODELADO DE PROTEÍNAS: PcYap1 Y PcRsmA

Modelar una proteína permite tener una predicción del arreglo molecular a través del ensamblaje de una secuencia de aminoácidos y su comparativa con otras estructuras similares, este contexto permite estudiar su estructura tridimensional, función molecular y comportamiento (Singh and Dominy 2010). Con este propósito se planteó la siguiente estrategia, partiendo de la secuencia de aminoácidos subida en el servidor del NCBI con los identificadores Pc20g15280 para PcYap1 y Pc12g16510 para PcRsmA.

Para la determinación de la estructura de PcYap1 se usó el servidor I-Tasser (Iterative Threading ASSEmbly Refinement), el cual hace uso de la biblioteca LOMETS del PDB (Protein Data Bank), para ubicar modelos de proteínas con estructuras secundarias o supersecundarias. Para el ensamblaje se utilizó el método de simulación de intercambio de réplica de MonteCarlo para obtener modelos completos. En caso de no encontrar información suficiente, la construcción se realizó identificando estados de baja energía libre, seguido de un perfeccionamiento a nivel atómico del modelo.

La calidad del modelo se determinó con puntaje de confianza (C-score) que se calcula en función de las alineaciones y el ensamblaje de la estructura, con un intervalo de [-5,2]. Cuanto mayor sea el valor C-score se considera que la confiabilidad del modelo es mayor. El modelo resultante se descargó en formato .pdb y se visualizó con el software Chimera 1-15 rc. I-Tasser utilizó diez

modelos diferentes que fueron previamente cristalizados para resolver la estructura asociada a la secuencia proporcionada de PcYap1. Al correr un blast en el NCBI se encontró que dos estructuras relacionadas ya fueron cristalizadas de manera parcial, Yap1 de *S. cerevisiae* y Pap1 de *S. pombe*, dichas estructuras fueron utilizadas por I-Tasser para la elaboración del modelo.

Con la proteína PcRsmA se siguieron dos estrategias diferentes para la obtención de un modelo confiable; en la primera estrategia se usó el software Modeller 9.25. A través del entorno gráfico que proporciona Chimera 1.15 rc, se corrió un blast para encontrar en el PDB alguna proteína similar, de la cual ya existiera una estructura resuelta. Se obtuvo sólo una proteína cristalizada candidata: Pap1 de *S. pombe*, después se hizo un alineamiento de secuencia y finalmente se generaron tres probables modelos seleccionando el que mejor se ajustara a los parámetros elegidos.

En la segunda estrategia se usó el servidor de Swiss-Model, se corrió un blast utilizando la base de datos del NCBI buscando únicamente aquellas proteínas que tuvieran una estructura resuelta en el PDB, encontrando coincidencias con Pap1 de *S. pombe*. Para seleccionar el mejor modelo se consideró la calidad del gráfico, el cual, muestra la similitud de cada residuo con respecto a la estructura nativa (valores mayores a 0.6 y cercanos a 1 se consideran buenos modelos), así como también los modelos que fueron empleados por el servidor como referencia (en este caso se usó el molde de la proteína MAF-B -familia AP-1 en humanos-).

Se descargaron los archivos .pdb del modelo generado y de los modelos con estructura resuelta en el PDB, estos fueron superpuestos y alineados en secuencia para ver su similitud.

### SITIOS CONSERVADOS IMPORTANTES PARA FUNCIONALIDAD DE PcYap1 Y PcRsmA

#### PcYap1

En Yap1 de *S. cerevisiae* la interacción cys303-cys598 es importante ya que bajo condiciones oxidantes causadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se forma el enlace disulfuro de dicha interacción lo que provoca un cambio conformacional que esconde la NES ubicada en el C-terminal. Esto provoca que la exportina Crm1 no reconozca a Yap1 y por lo tanto la exportación desde el núcleo no sucede (Yan et al. 1998, Wood et al. 2004, Delaunay et al. 2000).

Corriendo los alineamientos pertinentes en Clustal Omega (Figura 29) se encontró que la interacción cys303-cys598 de Yap1 corresponde con la interacción cys394-cys529 en PcYap1 y se encontró una segunda correspondencia en la interacción cys310-cys629 en Yap1 con la interacción cys401-cys562 en PcYap1, además se identificaron dos residuos de cisteínas libres en las posiciones 381 y 553.

Analizando de manera más específica la región correspondiente al C-CRD de PcYap1 (*P. chrysogenum*) contra Yap1 (*S. cerevisiae*) y Pap1 (*S. pombe*), se encontró la correspondencia en la conservación de las cisteínas en las posiciones 529, 553 y 562, estas cisteínas son importantes porque confieren regulación mediada por estrés oxidante a través del control de la localización celular (Kuge et al. 1997); se ha demostrado que bajo estrés oxidante se forman enlaces disulfuro en dos o más cisteínas del C-terminal y del N-terminal de Yap (Mulford and Fassler. 2011) sufriendo una oxidación directa. Esta forma oxidada es transcripcionalmente activa permaneciendo en el núcleo debido a los cambios conformacionales que hacen imposible su interacción con el receptor de exportación Crm1 y esto desencadena la activación de un conjunto de genes importantes implicados en la resistencia a oxidantes.

Como hemos visto, la entrada y salida del núcleo por el complejo de poros nucleares depende de la disponibilidad de la NES o NLS para la translocación hacia y desde el citoplasma. Muchos factores de transcripción presentan esta característica, por ejemplo, Yap1 regula su localización en gran medida a nivel de exportación nuclear (Yan et al. 1998).

En el análisis de PcYap1 de *P. chrysogenum* (Figura 30) con un score de 6.0 se encontró la secuencia EPTTKRKAQNR en la posición 147, dentro del dominio bZIP, correspondiente a una señal de

localización nuclear (NLS), el score nos indica localización tanto en el núcleo como en el citoplasma. Esto se puede interpretar, al menos hipotéticamente, como que PcYap1 tiene la capacidad de translocarse libremente entre el citoplasma y el núcleo.

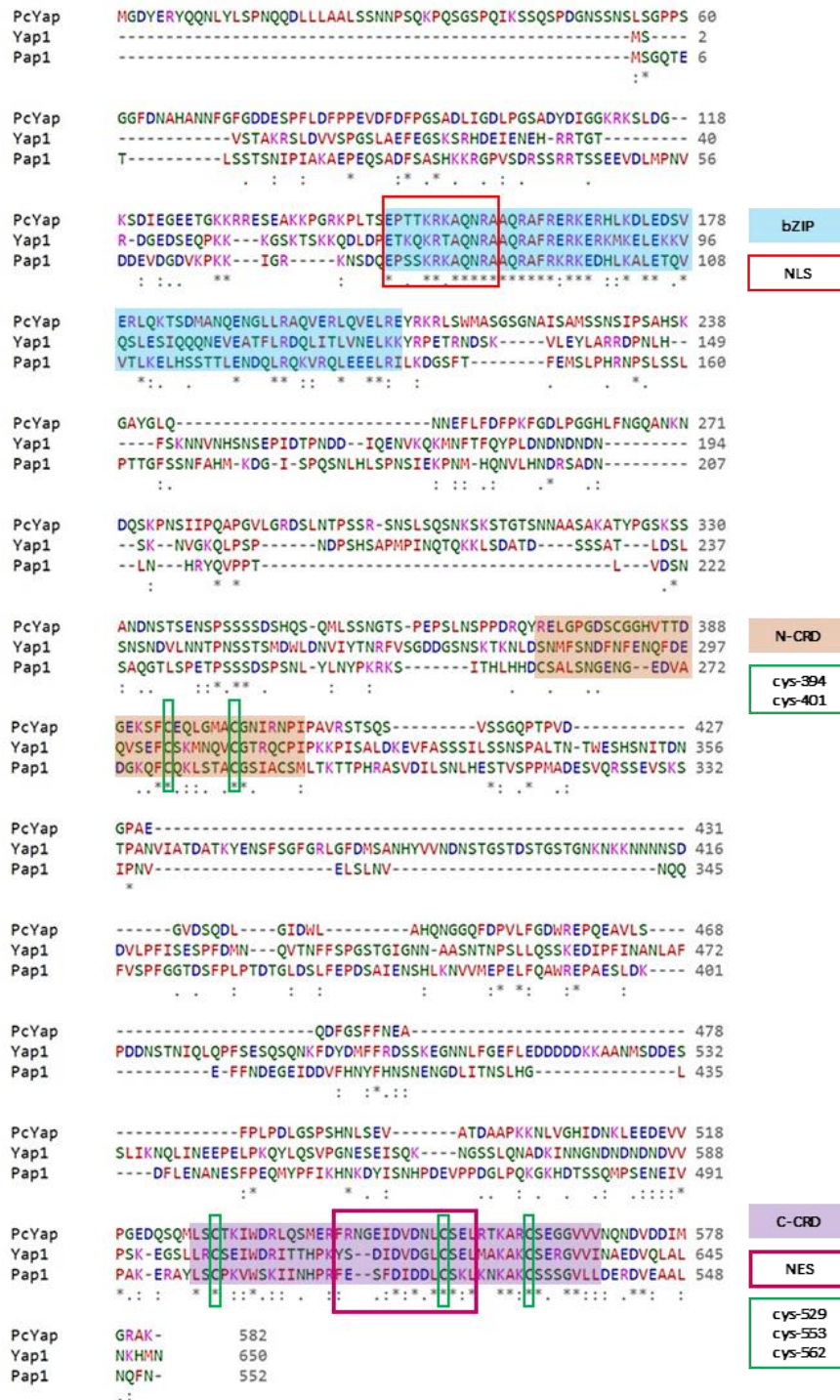
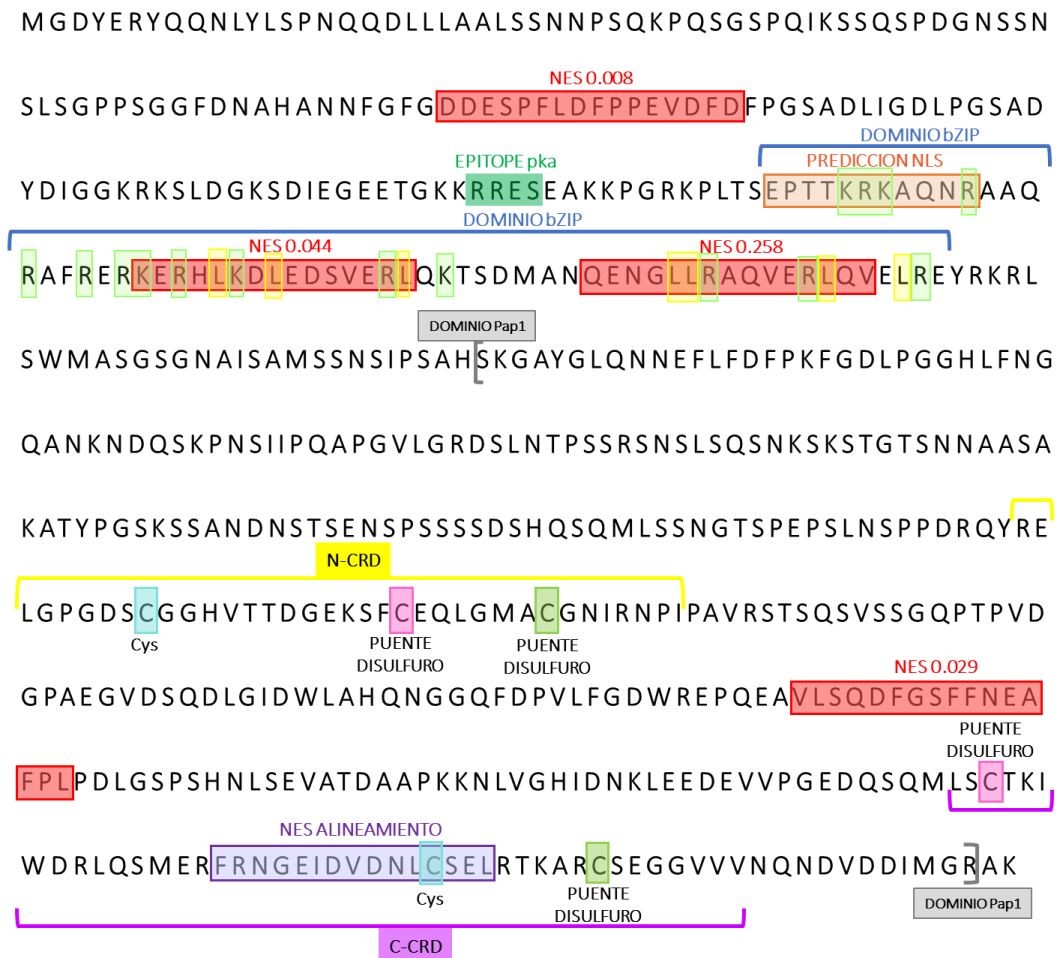


Figura 29. Alineamiento en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) de PcYap1 de *P. chrysogenum* contra Yap1 de *S. cerevisiae* y Pap1 de *S. pombe*. Se muestra la conservación de las siguientes regiones: dominio bZIP (azul), secuencia de importación

nuclear NLS (rojo), secuencia de exportación nuclear NES (rosa), dominios ricos en cisteínas N-CRD y C-CRD (naranja y lila) y en verde los residuos de cisteína clave para la formación de enlaces disulfuro descritos en Yap1.

Por medio de LocNES se encontraron 4 señales de exportación nuclear hipotéticas y de acuerdo con el score la NES en la posición 190-204 con la secuencia QENGLLRAQVERLQV, dentro del dominio bZIP, es la que tiene mayor probabilidad de ser una NES funcional. Haciendo la búsqueda por alineamiento en el C-CRD se encontró una NES putativa en la posición 542-556, con la secuencia FRNGEIDVDNLCSEL, conservada con respecto a la que se identifica como NES funcional en *S. cerevisiae*.

PcYap1 muestra alta identidad con Yap1 de *S. cerevisiae* y con Pap1 de *S. pombe*, se ha identificado la conservación de dominios que le pueden conferir funcionalidad a PcYap1: NES, NLS, bZIP, N-CRD y C-CRD, esto se detalla en la figura 30.



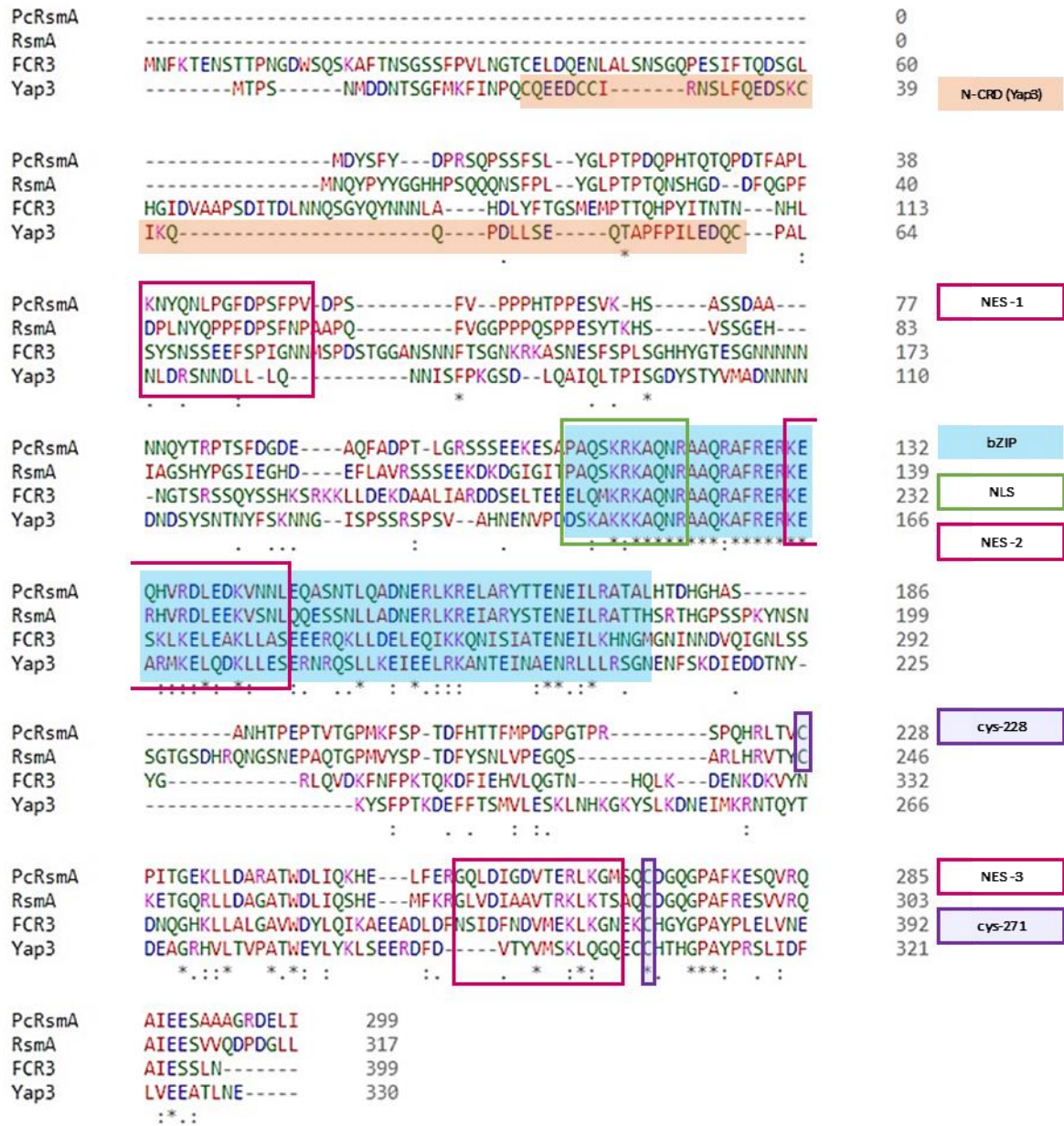
**Figura 30.** Secuencia de aminoácidos de PcYap1 resaltando: en rojo las NES con sus respectivos valores de score identificadas por LocNES; en morado NES identificada en el alineamiento contra Yap1 (*S. cerevisiae*) y Pap1 (*S. Pombe*) en clustal Omega; en naranja la NLS identificada *in silico* por cNLS Mapper, en azul la región del dominio bZIP, dentro del dominio en recuadros verde fluorescente se resaltan las lisinas y argininas de la región de unión a DNA y en recuadros amarillos fluorescentes las leucinas que permiten la dimerización

(zipper); en celeste los residuos de cisteínas libre conservados, en verde claro y rosa las cisteínas conservadas que forman puentes disulfuro (c394-c529 y c401-c562 respectivamente), entre corchetes grises el dominio Pap1, en amarillo el N-CRD conservado y en fucsia el C-CRD conservado.

## **PcRsmA**

Analizando el alineamiento de aminoácidos de PcRsmA contra RsmA de *A. nidulans*, FCR3 de *C. albicans* y Yap3 de *S. cerevisiae* (Figura 31), se encontraron dos residuos de cisteína conservados en el extremo C-terminal, la cisteína de la posición 228 se conserva en RsmA de *A. nidulans* y la cisteína de la posición 271 se conserva en RsmA de *A. nidulans* y Yap3 de *S. cerevisiae*.

En Yap3 de *S. cerevisiae* está identificada una CRD en el extremo N-terminal de la proteína, sin embargo, visto el alineamiento, no se conserva para hongos filamentosos.

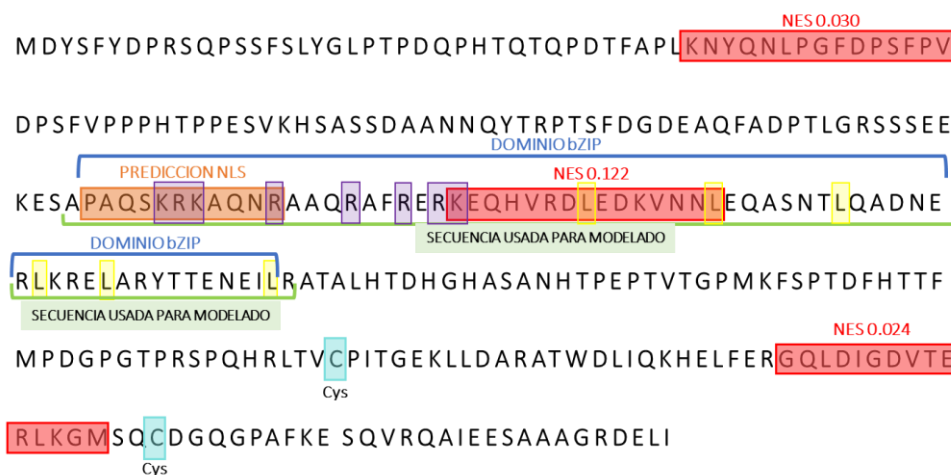


**Figura 31.** Alineamiento en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) de PcRsmA de *P. chrysogenum* contra RsmA de *A. nidulans*, FCR3 de *C. albicans* y Yap3 de *S. cerevisiae*. Se muestra la conservación de las siguientes regiones: dominio bZIP (azul), secuencia de importación nuclear NLS (verde); en rosa las secuencias de exportación nuclear NES hipotéticas predichas por LocNES en PcRsmA, dominio rico en cisteínas N-CRD de *S. cerevisiae* (naranja) que no se conserva en las demás proteínas del alineamiento y en morado residuos de cisteína libres.

Con LocNES se encontraron 3 señales de exportación nuclear hipotéticas, considerando el score, la NES de la posición 131-145 con la secuencia KEQHVRDLEDKVNNL tendría posibilidades de ser una NES funcional. Sin embargo, la NES de la posición 254-268 con la secuencia GQLDIGDVTERLKGM es la que se encuentra entre los dos residuos de cisteína conservados y que probablemente se podrían ver afectados por la formación de un enlace disulfuro.



Con un score de 4.0 se encontró una NLS hipotética con la secuencia PAQSKRKAQNR en la posición 111, el score nos indica localización tanto en el núcleo como en el citoplasma, sin embargo, no podemos proponer un mecanismo específico para la ubicación y movilidad en el núcleo de PcRsmA con la información recabada. En la figura 32 se detallan los dominios identificados para PcRsmA.



**Figura 32.** Secuencia de aminoácidos de PcRsmA resaltando: en rojo las NES con sus respectivos valores de score identificadas por LocNES; en naranja la NLS identificada *in silico* por cNLS Mapper, en azul la región del dominio bZIP, dentro del dominio en recuadros morados se resaltan las lisinas y argininas de la región de unión a DNA y en recuadros amarillos fluorescentes las leucinas que permiten la dimerización (zipper); en celeste los residuos de cisteína conservados y en verde claro la región utilizada para el desarrollo del modelo de la proteína.

## INTERACCIONES HIPOTÉTICAS DE PcYap1 CON OTRAS PROTEÍNAS

Por medio de la herramienta STRING se obtuvo la red de asociación de proteínas vinculada a PcYap1. En la figura 33 se pueden ver las diez proteínas involucradas que, de manera directa e indirecta, basados en información experimental previa y métodos de predicción computacional, tienen potencial de interactuar con PcYap1.

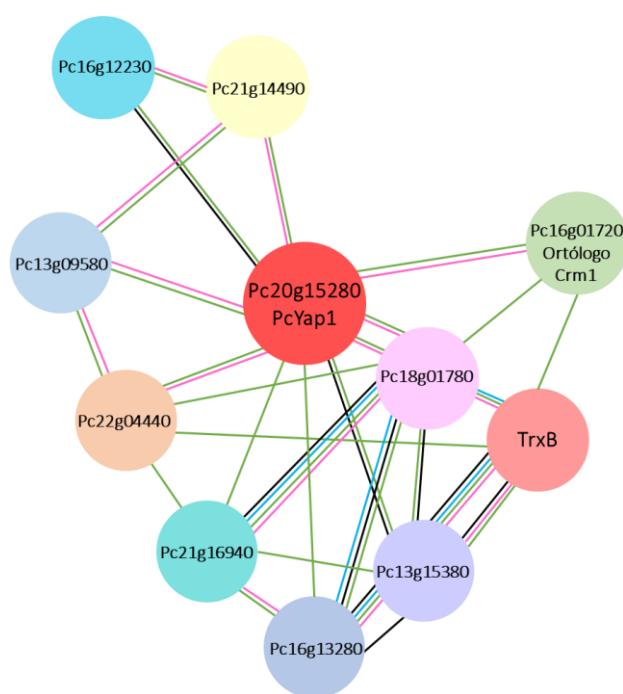
La interacción que se destaca por sobre las demás es la que sucede con la proteína Pc16g01720 ortólogo en *P. chrysogenum* de una exportina Crm1, esta interacción apoya nuestra idea de que PcYap1 muy probablemente sigue un patrón de activación/localización nuclear similar a los descritos para otros hongos.

Aunque en el ensayo de oxidación (Figuras 27 y 28) se pudo demostrar que PcYap1 tiene la capacidad de detectar condiciones oxidantes y en consecuencia cambiar su conformación, esto se puede deber a las condiciones *in vitro* propias del experimento. Otra posibilidad es que además de esta capacidad de detección directa, su activación en la célula también se puede lograr a través de

otros mecanismos como la oxidación mediada por Gpx3, fenómeno descrito para Yap1 en *S. cerevisiae* (Delaunay et al. 2000), o por otras peroxiredoxinas como es el caso de Asp3 de *A. fumigatus*, sensor de ROS y que se requiere para la activación y retención nuclear de Afyap1 (Boysen et al. 2021).

El listado completo de proteínas que interaccionan con sus características y dominios principales se puede consultar en el Suplemento 10.

En el caso de la proteína PcRsmA la base de datos de STRING no encontró interacciones que cumplan con la configuración de rigurosidad.



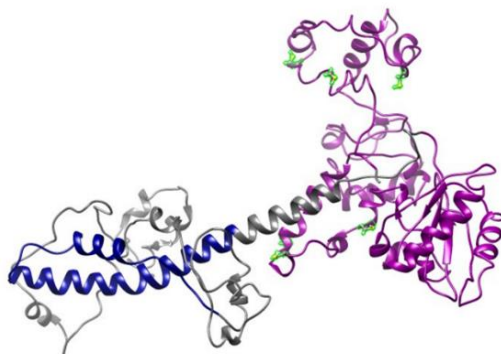
**Figura 33.** Red de asociación proteína-proteína de PcYap1 dada por la base de datos STRING (v11.0) con los identificadores de cada una de las proteínas asociadas.

## CONSTRUCCIÓN DE MODELOS

### PcYap1

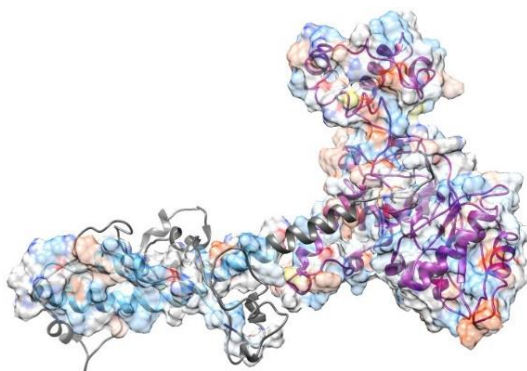
Después de evaluar los archivos generados se seleccionó el modelo con el mejor C-score=-0.5. Como se muestra en la figura 34, el modelo consta de 2 zonas importantes que dictan la estructura tridimensional: el dominio bZIP marcado en color azul con la típica estructura de  $\alpha$ -hélice debido a la presencia de leucinas que forman un núcleo hidrofóbico de una superhélice y el dominio Pap1

resaltado en color rosa, la zona gris es la región interdominio que completa la secuencia de aminoácidos total.



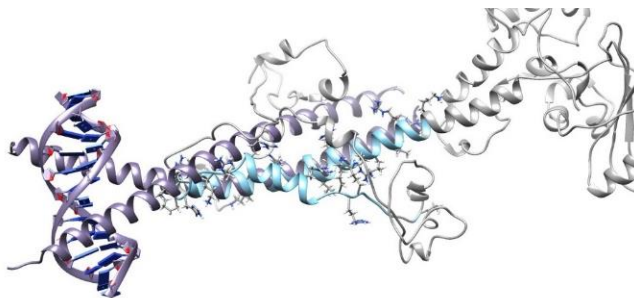
**Figura 34.** Modelo tridimensional de la proteína PcYap1 resaltando en color azul el dominio bZIP y en rosa el dominio Pap1 que le confieren funcionalidad.

En la figura 35 se muestra además la distribución de los aminoácidos por su carga, resaltando en particular las cisteínas presentes en la secuencia.



**Figura 35.** Modelo PcYap1 en listones donde se indican en azul aminoácidos básicos (+), en rojo aminoácidos ácidos (-), en gris aminoácidos neutros y en amarillo las cisteínas.

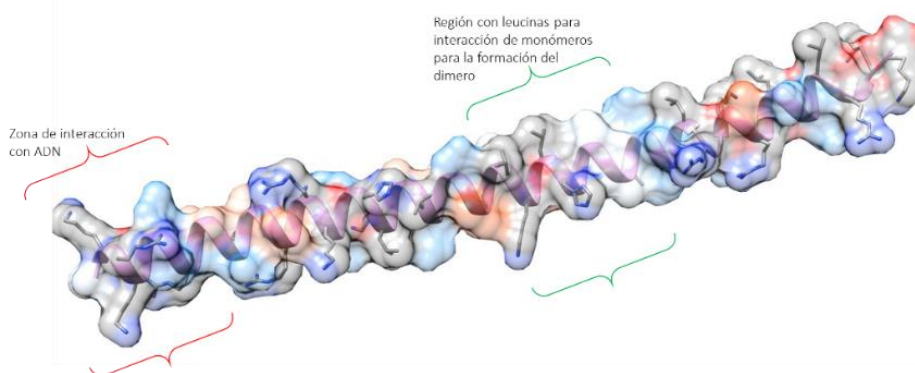
Resultaba importante evaluar la funcionalidad del modelo contra las estructuras tridimensionales que se usaron de referencia para el alineamiento y creación de la configuración tridimensional con el fin de determinar la capacidad de interacción de nuestro modelo con un surco de ADN, que al final es una de las características que le atribuimos a PcYap1. Con la figura 36 de referencia podemos considerar a PcYap1 un factor de transcripción de la familia bZIP que en su estructura tridimensional cuenta con una región básica que interacciona con el surco mayor del ADN a través de enlaces de hidrogeno y una región hidrofóbica de cierre que es el responsable de la dimerización.



**Figura 36.** Alineamiento de Pap1 de *S. pombe* contra PcYap1; en color morado se muestra el cristal cargado en el PDB de Pap1 interactuando con su respectivo surco de ADN y en celeste el dominio bZIP de PcYap1.

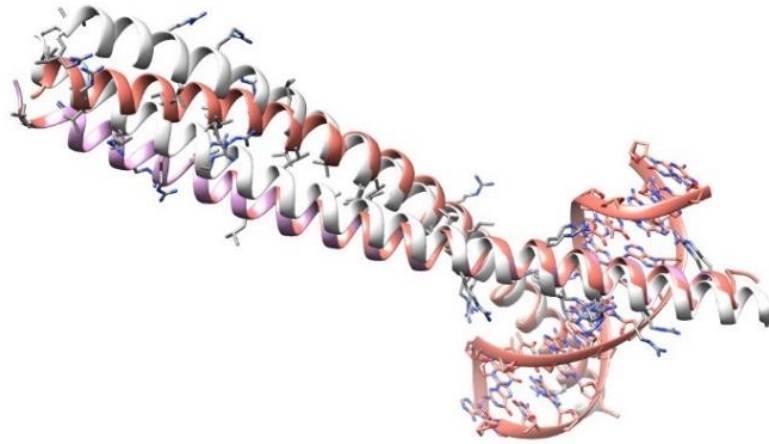
### PcRsmA

En el caso de la proteína PcRsmA, para la construcción del modelo se trabajó únicamente con la secuencia correspondiente al dominio bZIP, al no contar con información suficiente acerca del comportamiento de las secuencias de aminoácidos que flanquean este dominio es imposible construir un modelo completo válido. Sin embargo, y a pesar de esta restricción, con un valor cercano a 1 en la comparación de la estimación de la calidad, se logró una buena suposición de la estructura tridimensional para esta región de la proteína.



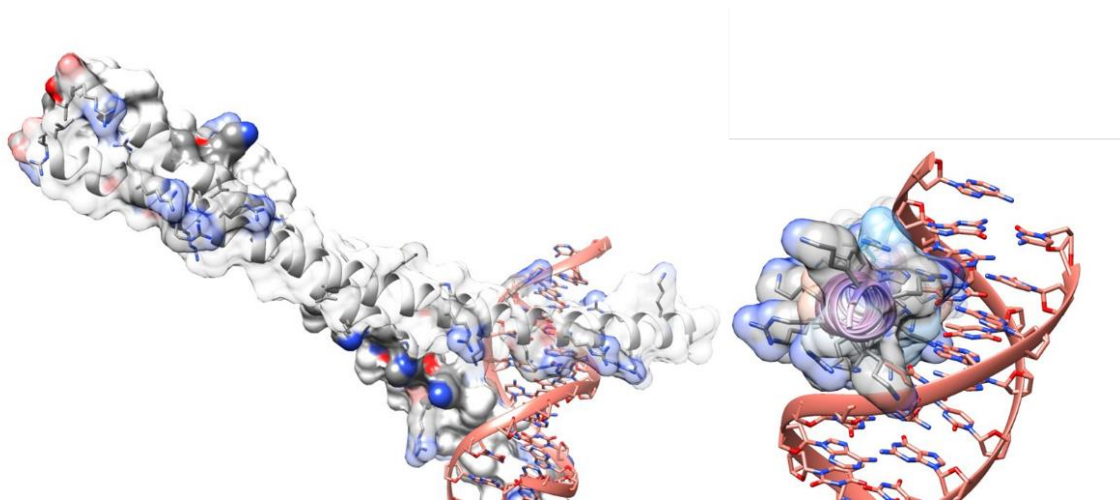
**Figura 37.** Modelo del monómero de PcRsmA en listones donde se muestra en azul aminoácidos básicos (+), en rojo aminoácidos ácidos (-) y en gris aminoácidos neutros; se resalta además la región rica en leucinas y la zona de unión a DNA.

En la figura 37 se muestra el monómero del bZIP con todas sus características, al igual que con la proteína PcYap1, este dominio es el que le confiere la capacidad de unión a ADN a la proteína. Cuando se diseñó la construcción del dímero que consta de dos segmentos peptídicos en hélice alfa, que a su vez se arrollan ligeramente entre sí (formando una superhélice), se logró que, en un extremo, estas hélices interactuaran entre sí y en el otro lo hagan con secuencias específicas de bases en el surco mayor del DNA por medio de un alineamiento contra la estructura de Pap1 de *S. pombe* que es la estructura de referencia (Figura 38).



**Figura 38.** Alineamiento: En color naranja el cristal cargado en el PDB de Pap1 de *S. pombe*, en blanco el dímero generado para PcRsmA con Swiss-Model y en color rosa el monómero generado para PcRsmA con Chimera 1.15 rc.

Como complemento de los resultados también se presentan en la figura 39 dos nuevas perspectivas de como interacciona el dímero de PcRsmA con el surco de DNA extraído del modelo de Pap1 de *S. pombe*.



**Figura 39.** Modelo tridimensional de PcRsmA, se muestra la interacción de PcRsmA con el surco de ADN del modelo cristalizado de pap1 de *S. pombe*.

## IX. DISCUSIÓN

Al término de este trabajo se puede afirmar con bastante certeza que el factor de transcripción descrito por Kosalková et al. (2000) es PcYap1, y que se une de manera altamente específica a la secuencia TTAGTAA, al menos cuando se estudia como una proteína expresada de manera heteróloga y purificada. Kosalková et al. (2007) planteó la hipótesis de que PTA1 (ahora PcYap1) podría ser un complejo de proteínas, cosa que no podemos descartar que suceda *in vivo*, así que el nombre PTA1 podría usarse para referirse a este hipotético complejo de proteínas que se une a la secuencia TTAGTAA. PcYap1, ortólogo de Yap1 en levaduras, tiene características de los factores de transcripción del tipo AP-1: bZIP, NES, NLS, N-CRD y C-CRD (Figura 29), y regula de manera positiva la producción de penicilina por su unión al promotor del gen *pcbAB*, ya que al silenciar este gen observamos una disminución de hasta el 65% en la cuantificación de penicilina en un cultivo sumergido, en comparación a las cepas de control a las 96 horas (tiempo máximo de producción).

A pesar de las condiciones prooxidantes de la vida aeróbica y de los distintos retos ambientales, los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido. Sin embargo, si la concentración de las ROS sobrepasa la capacidad celular para eliminarlas, se produce un estado de estrés oxidante. Existe mucha información sobre el daño a lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos mediado por los intermediarios reactivos del  $O_2$ , daños que eventualmente pueden conducir a la muerte celular (Folch-Mallol et al. 2004). La regulación de los genes de la respuesta antioxidante mediada por Yap1 depende de la acumulación nuclear del factor. En presencia de  $H_2O_2$ , las cisteínas presentes en el C-CRD son de importancia ya que confieren regulación mediada por estrés oxidante a través del control de la localización celular (Kuge et al. 1997). Estos residuos de cisteína forman un enlace disulfuro intramolecular provocando un cambio conformacional que enmascara el sitio de reconocimiento del factor por un sistema de exportación nuclear (mediado por Crm1p/Xpo1p). Esta oxidación directa promueve la acumulación nuclear desencadenando la activación de un conjunto de genes importantes implicados en la resistencia a oxidantes. Una tiorredoxina nuclear, también controlada por Yap1, reduce al factor de transcripción y permite su devolución al citoplasma (Kuge et al. 1997 y 1998, Mulford and Fassler. 2011). Por análisis bioinformático logramos determinar las características físicas que la proteína PcYap1 requiere para poder cumplir su función de regulador de respuesta antioxidante (Figura 30 y 34), mientras que para PcRsmA esto no está del todo claro, pero la poca información recabada apunta en esa misma dirección (Figura 32 y 37).

En *P. chrysogenum* Wis54-1255 (cepa de control para este trabajo) la producción de penicilina se estimula con la adición de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al inicio del cultivo (Gráfica 1). Al silenciar a *Pc-yap1* la producción de penicilina se ve disminuida e incluso con el estímulo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no logra alcanzar los niveles de las cepas de control (Gráfica 7). La producción de penicilina en silenciadas de *Pc-rsmA* no se ve tan afectada como en el caso de *Pc-yap1*, aunque resulta evidente el efecto si se compara con las cepas de control (Gráfica 7).

Ya había ciertos indicios de una relación entre el estrés oxidante y la biosíntesis de penicilina. Jami et al. (2010) observaron en un análisis proteómico el incremento en la expresión de varias proteínas involucradas en la defensa de estrés oxidante al estudiar una cepa alta productora de penicilina y la comparación con productoras de menor rendimiento. Liu et al. (2013) en un medio de fermentación definido suplementado con DL-metionina observaron un crecimiento normal pero un incremento en la producción de cefalosporina C en mutantes interrumpidas en el gen *ActrxR1*, que codifica para la tiorredoxina reductasa, en su comparación con la cepa silvestre.

En este trabajo se ha demostrado la capacidad de unión de PcYap1 a la secuencia específica TTAGTAA, siendo un regulador importante para estimular la expresión del gen *pcbAB* (Kosalková et al. 2000), esto más los resultados obtenidos de producción de penicilina en silenciadas de *Pc-yap1*, son indicativo de que PcYap1 regula de manera directa y positiva la biosíntesis de penicilina por su unión a la secuencia TTAGTAA en el promotor de *pcbAB* como respuesta al estrés oxidante.

La participación de RsmA en la regulación del metabolismo secundario se ha establecido para varias especies de hongos como *A. nidulans* (Shaaban et al. 2010), *A. fumigatus* (Sekonyela et al. 2013), *P. fici* (Wang et al. 2015) y *A. flavus* (Wang et al. 2020). PcRsmA se une específicamente a la secuencia TGAGACA (Figura 22), que se encuentra a 68 pb de distancia de la secuencia de unión de PcYap1 y además se une a una segunda secuencia dentro del promotor del gen *penDE* (TTACGTAA) (Figura 25B). Cuando Kosalková et al. (2000) delecionaron la región donde se localiza la secuencia TGAGACA la actividad del promotor de *pcbAB* se vio mermada, por lo que, podemos suponer el papel de PcRsmA como regulador de la biosíntesis de penicilina en respuesta al estrés oxidante por su unión a las dos secuencias mencionadas.

Diversos reportes han hablado de la relación de las ROS con el inicio del metabolismo secundario (Reverberi et al. 2006), incluida la biosíntesis de  $\beta$ -lactámicos (Liu et al. 2013), además existen múltiples ejemplos de factores de transcripción específicos que, en respuesta a la presencia de ROS podrían regular la generación de metabolitos secundarios (Hong et al. 2013, Montibus et al. 2015).

Miranda et al. (2013) encontraron en *A. terreus* una acumulación de ROS durante toda la idiofase que es la fase de producción de lovastatina, esto coincidió con el inicio de la expresión del gen *lovE* (factor transcripcional específico del cluster de lovastatina). Mas adelante quedo demostrado que esta acumulación de ROS regulaba positivamente los genes del cluster de la biosíntesis de lovastatina (Miranda et al. 2014).

Bibián et al. (2020) probaron que tanto la biosíntesis de penicilina como de cefalosporina C, se regulan por ROS. Además, se demostró que estos antibióticos no tienen propiedades antioxidantes; esto es importante de mencionar ya que se proponía que las aflatoxinas, por tener propiedades antioxidantes, formaban parte de la respuesta (defensa) al estrés oxidante, y por eso eran reguladas por ROS.

El incremento en las ROS se reconoce como un desencadenante de diferentes eventos metabólicos en todos los organismos, funcionando como un segundo mensajero (Reverberi et al. 2008). Niveles basales de transcrito de *PcYap1* y *PcRsmA* parecen ser suficientes para responder al estímulo generado por el estado oxidante y así regular de manera positiva la biosíntesis de penicilina ya que demostramos que la sobreexpresión de cualquiera de estos dos genes no representa un cambio significativo en la producción, salvo en momentos específicos como al inicio de la producción (Gráfica 12). Los factores de transcripción requieren estar activos para ejercer su función reguladora, entonces, cuando a las cepas OE de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA* no se les adiciona  $H_2O_2$  en el cultivo no se observan incremento o adelanto en la producción en comparación con las cepas de control, pero sí se observó un adelanto en la producción en las cepas de control y sobreexpresadas al incrementar el estado oxidante por adición de 100 mM de  $H_2O_2$ . De esta manera, si la activación de *PcYap1* y *PcRsmA* requiere de la inducción por ROS, esto explicaría que al sobreexpresar una mayor cantidad de proteína no refleja un mayor efecto al no estar activadas.

El estado oxidante es un importante inductor de la diferenciación en los hongos filamentosos (Aguirre et al. 2005) Se han observado efectos sobre la conidiación en cepas mutantes que carecen de *Yap1*, por ejemplo, en *A. nidulans* una mutante  $\Delta napA$  disminuyó la conidiación a la mitad cuando se comparó con la cepa silvestre (Mendoza-Martínez et al. 2017), una mutante  $\Delta Aoyap1$ , de *Aspergillus ochraceus*, generó poco conidios morfológicamente más grandes cuando se comparó con la cepa silvestre (Reverberi et al. 2012), mientras que en *Talaromyces marneffe* una mutante  $\Delta yapA$  tuvo una radical baja de producción de conidios en comparación con la cepa silvestre (Dankai et al. 2016). Una respuesta totalmente diferente se dio en *A. parasiticus*, donde una cepa



$\Delta ApYapA$  mostró un adelanto en el inicio de la conidiación e incremento en el número de conidios en las primeras 96 h de crecimiento (Reverberi et al. 2008).

Lejeune et al. (2022) observaron en un análisis proteómico en *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans* y una mutante *pptA* (delección de una fosina que posee un módulo de unión polifosfato con un dominio CHAD) de *S. lividans*, que bajo condiciones de estrés oxidante se potencia la biosíntesis del antibiótico actinorrodina (ACT) por una serie de procesos totalmente diferentes. El estudio se realizó bajo dos condiciones, limitación y competencia de fosfato inorgánico (Pi), y se encontró que, en *S. coelicolor* el estrés oxidante elevado y la mayor producción de ACT detectada en competencia de Pi en comparación a la condición limitante de Pi, se debe a la alta abundancia de subunidades del complejo I de la cadena respiratoria y a la estequiometría alterada entre esta y otras enzimas, como la ATP sintasa, también una actividad glucolítica débil que da como resultado una baja generación de NADPH, necesario para combatir el estrés oxidante. En la mutante *pptA* de *S. lividans*, con limitación de Pi, y por lo tanto de ATP, la ineficiencia de la fosforilación de NAD a NADP, por su dependencia del polifosfato, desencadena una síntesis insuficiente de NADPH.

Resulta interesante que la concentración de  $H_2O_2$  (100 mM) que provoca una importante inducción de la producción de penicilina también provoque un aumento en la generación de conidios (Gráfica 5). Esto nos habla de la coordinación entre la regulación del metabolismo secundario y procesos de diferenciación por presencia de ROS, teniendo un papel importante PcYap1 y PcRsmA, como los responsables de vincular el estrés oxidante con la producción de metabolitos secundarios y la conidiación.

El papel de PcYap1 en la conidiación en *P. chrysogenum* se evidenció cuando atenuamos la expresión de PcYap1, pues se observó una baja en la producción de conidios a un 25% de lo que producen las cepas de control (Figura 12). Guo et al. (2011) establecieron una clara relación entre la actividad de Yap1 y el desarrollo/conidiación en *Magnaporthe oryzae*, la disrupción génica de *MoAP1* provocó la reducción de 30 a 40 veces en la conidiación, anomalías morfológicas de los conidios, reducción del crecimiento de hifas aéreas y pérdida de patogenicidad, además de la acumulación excesiva de ROS, lo que le confiere una función de regulador específico del desarrollo e infección en la planta a MoAP1.

La regulación de la conidiación mediada por ortólogos de Yap1 puede ser de manera directa, regulando la expresión de genes involucrados en el inicio y que coordinan el desarrollo o

indirectamente modificando la cantidad de ROS en la célula. Así que si se atenúa o elimina la expresión de *yap1* esto afecta de manera negativa la conidiación por control directo de Yap1 sobre los genes involucrados en conidiación. En *M. oryzae* Guo et al. (2011), encontraron que la alteración de MoAP1 provoca una regulación negativa de MoCOS1, clave para la formación de conidióforos, y otros genes involucrados en la conidiación.

Cuando se trata de la regulación de genes involucrados en la conidiación por estrés oxidante, se ha visto que en *A. nidulans* el factor de transcripción *flbC* activa la transcripción de *brlA*, primer gen en la vía reguladora central de la conidiación (Kwon et al. 2010). En *T. marneffeii* se observó la regulación de *SakA*, parte de la vía MAPK activada por estrés (SAPK), sobre *brlA*, *abaA* y *wetA* (Nimmanee et al. 2016). En *A. nidulans* se analizó la respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un fosfoproteoma, y se encontró que *StuA*, necesaria para expresión de *brlA*, se fosforila específicamente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así, se plantea la importancia de la fosforilación en la regulación de la conidiación mediada por estrés oxidante (Carrasco-Navarro and Aguirre. 2021). Nuestros resultados demuestran la regulación directa positiva sobre *brlA* por una proteína de defensa a estrés oxidante, PcYap1, por unión a la secuencia TTAATA en el promotor del gen *brlA*, estimulando la conidiación.

Las cepas silenciadas de *Pc-rsmA* muestran evidencia de la regulación positiva sobre la conidiación al observarse una clara disminución de la esporulación, en contraste con las cepas de control (Gráfica 5), con resultados muy parecidos a las cepas silenciadas de *Pc-yap1*. Todavía falta recopilar más evidencia para determinar el papel de RsmA sobre la conidiación, hasta ahora en *A. fumigatus*, en la comparativa entre cepas delecionadas y sobreexpresadas de *rsmA*, no se observó diferencia significativa en la producción de conidios (Sekonyela et al. 2013). En *A. nidulans* una cepa *OE::RsmA* y la comparativa con la cepa silvestre bajo las mismas condiciones no mostraron diferencias representativas en la formación de conidios (Yin et al. 2013).

La regulación sobre la producción de metabolitos secundarios por factores de transcripción del tipo bZIP se puede dar de dos maneras: por unión directa a secuencias específicas ubicadas en los promotores de genes estructurales o a través de reguladores de un grupo, como ha sido descrito para AtfB en especies de *Aspergilli*, con ensayos de movilidad electroforética e inmunoprecipitación de cromatina (Roze et al. 2011, Hong et al. 2013) y RsmA en *A. nidulans* al estudiar una cepa *OE::rsmA* (Yin et al. 2012) o por la modificación en los niveles de ROS intracelulares por medio de la respuesta del sistema de defensa antioxidante. Esta respuesta se ha descrito para los ortólogos de Yap1; en *A. parasiticus* se encontró que el incremento en los niveles de ROS se correlacionaba con

el incremento en los niveles de biosíntesis de aflatoxinas al comparar una cepa  $\Delta ApYapA$  con el tipo silvestre (Reverberi et al. 2008). En *A. ochraceus* se observó algo similar con el estudio de una cepa  $\Delta Aoyap1$  (Reverberi et al. 2012), y en *F. graminearum* al estudiar una cepa  $\Delta Fgap1$  y una cepa que expresaba una forma constitutivamente truncada de *Fgap1*, homólogo de *Yap1*, (Montibus et al. 2013).

Este trabajo confirma la participación de PcRsmA como factor de transcripción que se une a los promotores de los genes involucrados en metabolismo secundario para la regulación de la producción, y establece por primera vez un papel directo de un ortólogo de *Yap1* en la regulación de la transcripción de un gen de metabolismo secundario por unión específica a un sitio de unión dentro del promotor.

*Yap1* estimula directamente la transcripción del gen *pcbAB* por unión a la secuencia reguladora TTAGTAA, provocando un aumento en los niveles de penicilina. Mientras que, en la biosíntesis de toxinas como aflatoxina y tricoteceno, el estímulo es indirecto, controlando la cantidad de ROS por inducción del sistema de defensa antioxidante, resultando en una baja producción de toxina. Esto se demostró cuando se observó una mayor acumulación de toxina en mutantes  $\Delta yap1$  (Reverberi et al. 2008 y 2012, Montibus et al. 2013) y pérdida en la producción con cepas *OE::yap1* (Montibus et al. 2013, Yin et al. 2013).

En un análisis transcriptómico con una mutante  $\Delta napA$  (ortólogo de *Yap1*) de *A. nidulans* en comparación a la cepa del tipo silvestre, en la conidiación se observó un bajo nivel de transcrito, 3.5 veces menor, del gen biosintético de penicilina *ipnA* (=pcbC) y algunos otros genes relacionados con el metabolismo secundario. Esto apunta a una regulación positiva de la biosíntesis de penicilina, entre otros metabolitos secundarios, dado por NapA (Mendoza-Martínez et al. 2017). Aún queda por determinar si el efecto de la delección del gen *napA* sobre la expresión del gen *ipnA* es directo o indirecto, por otro mecanismo regulador, pues no se ha determinado la producción de penicilina en mutantes *napA* de *A. nidulans* y no se han encontrado sitios de unión hipotéticos para *napA* dentro del promotor de *ipnA*.

El factor de transcripción bZIP AtfB/Atf21 se consideró como candidato para la regulación por estrés oxidante de los genes de penicilina. Existen reportes que mencionan su papel como regulador de la respuesta al estrés oxidante y el metabolismo secundario en algunas especies de *Aspergillus* (Hong et al. 2013, Roze et al. 2011, Fountain et al. 2016, Sakamoto et al. 2008). AtfB forma parte de la familia de factores de transcripción ATF/CREB y se identificó por primera vez en *A. oryzae* como

factor de transcripción del tipo bZIP con dominios básicos característicos de la familia de proteínas de unión a elementos de respuesta al AMP cíclico (CREB) (Sakamoto et al. 2008) cuya secuencia de unión consenso es TKACGTMA a la cual se unen como homo o heterodímeros (Hai and Curran. 1991). Con un porcentaje de identidad del 96% en la secuencia de aminoácidos con AtfB de *A. oryzae* y *A. flavus* se caracterizó el AtfB de *A. parasiticus* (Roze et al. 2011), en *P. chrysogenum* la mayor identidad con AtfB se encontró en el gen Pc21g08330 (45.8% de identidad) y que nombramos Atf21.

AtfB de *A. parasiticus* se une a una región en el promotor del gen *nor-1* de aflatoxina, esta unión requiere un sitio tipo AP-1 (TGAGTAC) y un sitio tipo CRE, denominado CRE1 (TGACATAA), adyacentes y separados por 12 pb, también se encontró una secuencia consenso (AGCCS) corriente arriba del sitio CRE1 en 5 promotores de aflatoxina que mostraron unión a DNA (Roze et al. 2011). Atf21 no se unió *in vitro* al promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum*, lo que se puede explicar ya que si bien existe el sitio CRE (TTACGTAA) hay ausencia de un sitio de unión del tipo AP1 o de secuencias similares a AGCCS, sin embargo, se unió a la sonda control NorR4 que contiene los sitios antes mencionados (Figura 25B), falta profundizar en el análisis y caracterización de Atf21 para determinar su participación en respuesta a estrés oxidante y/o regulación del metabolismo secundario.

Por otro lado, PcRsmA sí pudo unirse a la sonda que contenía el sitio de unión para CRE (TTACGTAA) y demostró su especificidad al perder capacidad de unión en la sonda mutada en las posiciones 1 y 6. Así descubrimos al menos dos sitios de unión diferentes para PcRsmA en promotores de genes de biosíntesis de penicilina (*pcbAB* y *penDE*): TGAGACA y TTACGTAA. Finalmente se probó su unión con una sonda control que contiene la secuencia de unión TGACACA del promotor del gen *AflR* de *A. nidulans*, esto nos habla de la versatilidad para unirse a diferentes secuencias consenso de las proteínas RsmA.

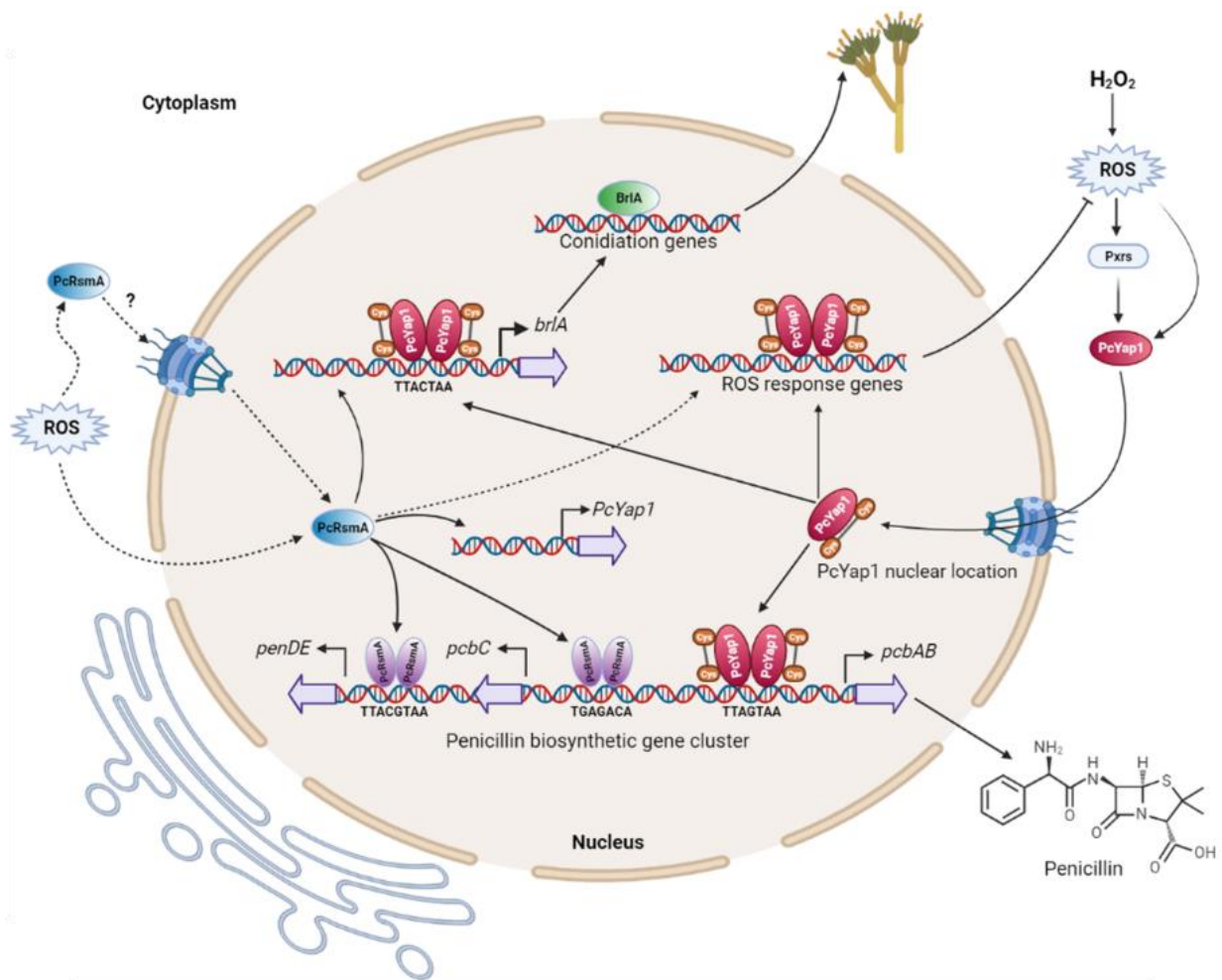
Una respuesta defensiva rápida depende de la percepción eficaz del estrés por parte de la célula, así como de la transducción de señales oxidativas. En los hongos algunos factores de transcripción pueden actuar como sensores oxidantes en la célula (Reverberi et al. 2008). El papel de los ortólogos de Yap1 como mediadores en la defensa contra ROS ha sido establecida ampliamente en levaduras (Toone and Jones. 1998, Cuéllar-Cruz et al. 2008) y en hongos filamentosos (Montibus et al. 2015, Mendoza-Martínez et al. 2020). Mutaciones en Yap1 revelan alteración en la generación de ROS y expresión de genes involucrados en la respuesta/defensa al estrés oxidante. PcYap1, como

hemos probado, no es la excepción (Gráfica 8). Con los ortólogos de RsmA está menos claro el papel que desempeñan en la defensa contra el estrés oxidante. PcRsmA tiene su mayor identidad en las levaduras con Yap3 de *S. cerevisiae* y con FCR3 de *C. albicans*. Yap3 prácticamente no responde a retos ambientales y estrés celular (Rodríguez-Pousada et al. 2010) y la transcripción dependiente de Yap3 responde al herbicida aminotriazol (inhibidor competitivo de la biosíntesis de histidina) pero no al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o al cadmio (Fernandes et al. 1997). También se ha descrito el papel de Yap3 en la respuesta celular a la hidroquinona (North et al. 2011), mientras que la sobreexpresión de FCR3 confiere resistencia al fluconazol y al 4-nitroquinolina 1-óxido (Yang et al. 2001). Las proteínas RsmA no tienen una respuesta consistente al estrés en hongos filamentosos, por ejemplo, una cepa *OE::rsmA* no respondió a antifúngicos, desencadenantes de estrés oxidante o metales pesados en *A. nidulans* cuando se comparó con la cepa de tipo silvestre (Yin et al. 2012 y 2013). Sin embargo, en *A. fumigatus*, las cepas con un alelo *OE::rsmA* se desarrollaron mejor que los controles en medio con menadiona, por lo que RsmA cumple un papel de defensor contra ROS generadas inducidas por menadiona (Sekonyela et al. 2013). En contraste, la sobreexpresión de *AflrsmA* en *A. flavus* desencadenó una mayor sensibilidad al bisulfito sódico de menadiona y la delección del mismo gen provocó menos sensibilidad al hidroperóxido de terbutilo (Wang et al. 2020); y en *P. fici* la delección de *PfzipA* (ortólogo de *rsmA*) provocó resistencia al hidroperóxido de terbutilo, diamida y bisulfito sódico de menadiona, pero incrementó la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wang et al. 2015).

Hemos demostrado la participación de PcRsmA en la respuesta a estrés oxidante cuando es inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* (Gráfica 4 y 8) lo que genera un cambio en su conformación estructural visto en geles SDS-PAGE (Figura 27 y 28). En *A. nidulans*, cuando se usa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se induce la expresión de *rsmA*, también se observó que *rsmA* y *napA*, ortólogos de *yap1*, son parte de los genes COSR (Core Oxidative Stress Response) lo que podría vincular la regulación de la respuesta al estrés y la producción de metabolitos secundarios en *A. nidulans* (Emri et al. 2015, Thieme et al. 2018). Esto está en concordancia con los resultados obtenidos para *Pc-rsmA* en *P. chrysogenum*; en ambos casos se observa la defensa contra el estrés oxidante cuando se induce por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sensores de ROS), lo que provoca la regulación positiva de la expresión de genes de biosíntesis de penicilina por unión a secuencias específicas en los promotores.

En procesos como la conidiación, producción de penicilina y respuesta a estrés oxidante, PcYap1 y PcRsmA, parecen trabajar en conjunto con respuestas similares en la célula, y en condiciones *in*

*in vitro* responden de manera similar a la misma concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así que hemos elaborado un modelo que indica los procesos celulares que regulan PcYap1 y PcRsmA (Figura 40).



**Figura 40.** Modelo propuesto para la regulación de la biosíntesis de penicilina y conidiación en respuesta al estrés oxidante mediado por PcYap1 y PcRsmA, este modelo compila todos los resultados obtenidos en este trabajo, complementados con información reportada en la literatura consultada. Creado con BioRender-com.

En resumen, el modelo presentado en la figura 40 representa lo siguiente: PcYap1 sufre cambios conformacionales provocados por la presencia de ROS, generadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o de origen natural. Las ROS se detectan de manera directa o por mediación de peroxiredoxinas (Prxs) y esto vuelve a PcYap1 de localización nuclear. Por otro lado, PcRsmA al detectar ROS es probable que sufra un cambio conformacional y se transloque al núcleo por un mecanismo desconocido.

PcYap1 se une a la secuencia reguladora TTAGTAA en el promotor del gen *pcbAB* y PcRsmA se une al sitio TGACACA ubicado a 68 pb corriente arriba del sitio de unión de PcYap1 y al sitio TTACGTAA

en el promotor del gen *penDE*. Ambos factores de transcripción regulan positivamente la biosíntesis de penicilina.

PcRsmA regula positivamente la transcripción de *Pc-yap1*, PcYap1 se une a la secuencia TTAATA, sitio AP-1, en el promotor del gen *brlA* de la vía central que regula la conidiación e induce su transcripción. En el caso de PcRsmA, aunque nos falta evidencia podrían suceder dos cosas, induce la transcripción de *brlA* por unión directa a su promotor y/o a través de la regulación de la transcripción de *Pc-yap1*. Estos fenómenos desencadenan, por regulación positiva de *brlA*, la conidiación en el hongo.

PcYap1 y PcRsmA están involucrados en la defensa contra el estrés oxidante, disminuyendo la presencia de ROS en la célula. PcYap1 de manera directa por control de la transcripción de varios genes de respuesta a estrés oxidante y PcRsmA por la hipotética regulación de la expresión de genes de respuesta al estrés oxidante y/o regulando la transcripción de *Pc-yap1*.

Nuestros resultados aportan nueva información y aumentan el conocimiento sobre la regulación en la biosíntesis de penicilina, su relación con el estrés oxidante y construyen un modelo de regulación de procesos celulares mediado por PcYap1 y PcRsmA.

## X. CONCLUSIONES

PcYap1 y PcRsmA, factores de transcripción del tipo bZIP, responden a la presencia de ROS generada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, regulando la respuesta al estrés oxidante en la célula. También participan en la regulación de biosíntesis de penicilina y conidiación por unión a elementos reguladores específicos en los promotores de genes clave.

La proteína PTA1 de unión a DNA descrita por Kosalková et al. (2000) se identifica como PcYap1. Esta proteína se une a la secuencia TTAGTAA dentro del promotor del gen de biosíntesis de penicilina *pcbAB*. Este es el primer trabajo que identifica una proteína Yap1 como regulador directo de la transcripción de un gen de metabolismo secundario.

PcYap1 regula la expresión de *brlA*, primer gen de la vía central de regulación de la conidiación, por unión a la secuencia TTACTAA ubicada en el promotor, regulando el proceso de condición.

PcRsmA regula la transcripción de los genes *brlA* y *Pc-yap1*, además regula la biosíntesis de penicilina y se une a las secuencias TGAGACA y TTACGTAA (motivo CRE), secuencias que encuentran en los promotores de los genes *pcbAB* y *penDE*, respectivamente.



## XI. LITERATURA CONSULTADA

1. Adams TH and Yu JH. Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Current Opinion in Microbiology*. 1998; 1 (6): 674-677.
2. Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*. 2005; 13 (3): 111-118.
3. Aguirre J, Hansberg W, Navarro R. Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology*. 2006; 44 (Supplement\_1): S101-S107.
4. Alvarez E, Cantoral JM, Barredo JL, Diez B, Martin JF. Purification to Homogeneity and Characterization of Acyl Coenzyme A: 6-Aminopenicillanic Acid Acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987; 31 (11): 1675-1682.
5. Bernardes NE, Takeda AAS, Dreyer TR, Cupertino FB, Virgilio S, Pante N, Bertolini MC, Fontes MRM. Nuclear transport of the *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor is mediated by importin- $\alpha$ . *The Biochemical Journal*. 2017; 474 (24): 4091-4104.
6. Bibian MA, Pérez-Sánchez A, Mejía A, Barrios-González J. Penicillin and cephalosporin biosyntheses are also regulated by reactive oxygen species. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 2020; 104 (4): 1773-1783.
7. Bills GF and Gloer JB. Biologically active secondary metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum*. 2016; 4 (6).
8. Bossier P, Fernandes L, Rocha D, Rodriguez-Pousada D. Overexpression of YAP2, coding for a new yAP protein, and YAP1 in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268 (31): 23640-23645.
9. Boysen JM, Saeed N, Wolf T, Panagiotou G, Hillmann F. The peroxiredoxin Asp f3 acts as redox sensor in *Aspergillus fumigatus*. *Genes*. 2021; 12: 668.
10. Brakhage AA and Schroeckh V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*. 2011; 48 (1): 15-22.
11. Brakhage AA, Spröte P, Al-Abdallah Q, Gehrke A, Plattner H, Tüncher A. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. (eds) *Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*. *Advances in Biochemical Engineering*. 2004; 88: 45-90.
12. Brakhage AA, Thön M, Spröte P, Scharf DH, Al-Abdallah Q, Wolke SM, Hortschansky P. Aspects on evolution of fungal beta-lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*. 2009; 70 (15-16): 1801-1811.
13. Brown T, Mackey K, Du T. Analysis of RNA by Northern and Slot Blot hybridization. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2004; 4 (4.9)
14. Bürglin TR and Affolter M. Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*. 2016; 125 (3): 497-521.
15. Calvo IA, Boronat S, Doménech A, Garcia-Santamarina S, Ayté J, Hidalgo E. Dissection of a redox relay: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent activation of the transcription factor Pap1 through the peroxidatic Tpx1-Thioredoxin cycle. *Cell Reports*. 2013; 5 (5): 1413-1424.

16. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004; 25 (9): 1327-1333.
17. Cantoral JM, Díez B, Barredo JL, Alvarez E, Martín JF. High-Frequency Transformation of *Penicillium Chrysogenum*. *Nature Biotechnology*. 1987; 5 (5): 494-497.
18. Carrasco-Navarro U and Aguirre J. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces major phosphorylation changes in critical regulators of signal transduction, gene expression, metabolism and developmental networks in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Fungi*. 2021; 7: 624.
19. Caruso ML, Litzka O, Martić G, Lottspeich F, Brakhage AA. Novel basic-region helix-loop-helix transcription factor (AnBH1) of *Aspergillus nidulans* counteracts the CCAAT-binding Complex AnCF in the promoter of a penicillin biosynthesis gene. *Journal of Molecular Biology*. 2002; 323 (3): 425-439.
20. Cepeda-García C, Domínguez-Santos R, García-Rico RO, García-Estrada C, Cajiao A, Fierro F, Martín JF. Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the pcbAB gene in *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014; 98 (16): 7113-7124.
21. Cuéllar-Cruz M, Briones-Martín-del-Campo M, Cañas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castaño I, De Las Peñas A. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p and Msn4p. *Eukaryotic Cell*. 2008; 7: 814–825.
22. Chu VW, Renno D, Saunders G. Extracellular pH affects regulation of the pcbAB gene in *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997; 47: 250-254.
23. Dankai W, Pongpom M, Youngchim S, Cooper CR Jr, Vanittanakom N. The *yapA* encodes bZIP transcription factor involved in stress tolerance in pathogenic fungus *Talaromyces marneffeii*. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0163778.
24. Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*. 2002; 111 (4): 471-481.
25. Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal*. 2000; 19 (19): 5157-5166.
26. Díez B, Alvarez E, Cantoral JM, Barredo JL, Martín JF. Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Current Genetics*. 1987; 12: 277–282.
27. Díez B, Gutiérrez S, Barredo JL, van Solingen P, van der Voort LH, Martín JF. The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the pcbAB gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the pcbC and penDE genes. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265 (27): 16358-16365.
28. Domínguez-Santos R, Martín JF, Kosalková K, Prieto C, Ullán RV, García-Estrada C. The regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes of  $\beta$ -lactam biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology*. 2012; 49: 866–81.
29. Elander R.P. Strain Improvement and Preservation of  $\beta$ -Lactam-Producing Microorganisms. *Antibiotics. Handbook of Experimental Pharmacology (Continuation of*

- Handbuch der experimentellen Pharmakologie). Springer, Berlin, Heidelberg. 1983; 67 (1).
30. Emri T, Szarvas V, Orosz E, Antal K, Park HS, Han K-H, Jae-Hyuk Y, Pócsi I. Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. BMC Genomics. 2015; 16: 1–19.
  31. Espeso EA, Tilburn J, Arst Jr HN, Peñalva MA. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. The EMBO Journal. 1993; 12 (10): 3947-3956.
  32. Feng B, Friedlin E, Marzluf GA. 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. 1994; 60 (12): 4432-4439.
  33. Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. Molecular and Cellular Biology. 1997; 17 (12): 6982-6993.
  34. Fierro F, Vaca I, Castillo N, García-Rico RO, Chávez R. *Penicillium chrysogenum*, a vintage model with a cutting-edge profile in biotechnology. Microorganisms. 2022; 10(3):573.
  35. Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias Robles AA. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamérica de Microbiología. 2004; 46(1-2): 24-46.
  36. Fountain JC, Bajaj P, Nayak SN, Yang L, Pandey MK, Kumar V, Jayale AS, Chitkineni A, Lee RD, Kemerait RC, Varshney R, Guo B. Responses of *Aspergillus flavus* to oxidative stress are related to fungal development regulator, antioxidant enzyme, and secondary metabolite biosynthetic gene expression. Frontiers in Microbiology. 2016; 7: 2048.
  37. Fujii Y, Shimizu T, Toda T, Yanagida M, Hakoshima T. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. Nature Structural Biology. 2000; 7 (10): 889-893.
  38. García-Estrada C, Vaca I, Fierro F, Sjollem K, Veenhuis M, Martín JF. The unprocessed preprotein form IATC103S of the isopenicillin N acyltransferase is transported inside peroxisomes and regulates its self-processing. Fungal Genetics and Biology. 2008; 45 (6): 1043-1052.
  39. García-Rico RO, Fierro F, Martín JF. Heterotrimeric Galpha protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. Biochemistry and Cell Biology. 2008; 86 (1): 57-69.
  40. García-Rico RO, Fierro F, Mauriz E, Gómez A, Fernández-Bodega MA, Martín JF. The heterotrimeric Galpha protein pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. Microbiology. 2008b; 154 (11): 3567-3578.
  41. Guo M, Chen Y, Du Y, Dong Y, Guo W, Zhai S, Zhang H, Dong S, Zhang Z. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. PLoS Pathogens. 2011; 7: e1001302.
  42. Haas H and Marzluf GA. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate

- assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Current Genetics*. 1995; 28 (2): 177-183.
43. Hai T and Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 3720–4.
  44. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of Molecular Biology*. 1983; 166 (4): 557-580.
  45. Hellman LM and Fried MG. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for detecting Protein-Nucleic Acid interactions. *Nature Protocols*. 2007; 2 (8): 1849–1861.
  46. Hengen PN. Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences*. 1996; 21 (2): 75-76.
  47. Hertle K, Haase E, Brendel M. The SNQ3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Current genetics*. 1991; 19 (6): 429-433.
  48. Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Mitterbauer R, Zadra I, Kürnsteiner H, Kück U. Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell*. 2010; 9 (8): 1236-1250.
  49. Hong SY, Roze LV, Linz JE. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins*. 2013; 5: 683–702.
  50. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*. 2011; 2 (1): 87-95.
  51. Ikner A and Shiozaki K. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research*. 2005; 569 (1-2): 13-27.
  52. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990; 96 (1): 23-28.
  53. Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martin JF. Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2010; 9 (6): 1182-1198.
  54. Karwehl S and Stadler M. Review: Exploitation of fungal biodiversity for discovery of novel antibiotics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2016; 398: 303-338.
  55. Keller NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17 (3):167-180.
  56. Kosalková K, Marcos AT, Fierro F, Hernando-Rico V, Gutierrez S, Martin JF. A novel heptameric sequence (TTAGTAA) is the binding site for a protein required for high level expression of *pcbAB*, the first gene of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275 (4): 2423-2430.
  57. Kosalková K, Rodríguez-Saiz M, Barredo JL, Martín JF. Binding of the PTA1 transcriptional activator to the divergent promoter region of the first two genes of the penicillin pathway in different *Penicillium* species. *Current Genetics*. 2007; 52: 229–37.
  58. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2009; 106 (25): 10171-10176.

59. Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Molecular and Cellular Biology*. 2001; 21 (18): 6139-6150.
60. Kuge S, Jones N, Nomoto A. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO Journal*. 1997; 16 (7): 1710-1720.
61. Kuge S, Toda T, Iizuka N, Nomoto A. Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes to Cells*. 1998; 3 (8): 521-532.
62. Kuge S. and Jones N. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *The EMBO Journal*. 1994; 13 (3): 655–664.
63. Kwon N-J, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U, Yu J-H. FlbC is a putative nuclear C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 2010; 77: 1203–19.
64. Lejeune C, Sago L, Cornu D, Redeker V, Virole M-J. A Proteomic Analysis Indicates That Oxidative Stress Is the Common Feature Triggering Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* and in the *pptA* Mutant of *Streptomyces lividans*. *Frontiers in Microbiology*. 2022; 12: 813993
65. Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell*. 2007; 6 (12): 2290-2302.
66. Liras P and Martin JF. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate?. *International Microbiology*. 2006; 9 (1): 9-19.
67. Litzka O, Papagiannopoulos P, Davis MA, Hynes MJ, Brakhage AA. The penicillin regulator PENR1 of *Aspergillus nidulans* is a HAP-like transcriptional complex. *European Journal of Biochemistry*. 1998; 251 (3): 758-767.
68. Liu L, Long L-K, An Y, Yang J, Xu X, Hu C, Liu G. The thioredoxin reductase-encoding gene *ActrxR1* is involved in the cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum* in methionine-supplemented medium. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97: 2551–62.
69. Macios M, Caddick MX, Weglenski P, Scazzocchio C, Dzikowska A. The GATA factors AREA and AREB together with the co-repressor NMRA, negatively regulate arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* in response to nitrogen and carbon source. *Fungal Genetics and Biology*. 2012; 49 (3): 189-198.
70. Maeta K, Izawa S, Okazaki S, Kuge S, Inoue Y. Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24 (19): 8753-8764.
71. Martin JF.  $\alpha$ -Amino adipyl-cysteinyl-valine Synthetases in  $\beta$ -Lactam Producing Organisms. *The Journal of Antibiotics*. 2000; 53 (10): 1008-1021.
72. Martin JF, Ullan RV, Garcia-Estrada C. Regulation and compartmentalization of  $\beta$ -lactam biosynthesis. *Microbial Biotechnology*. 2010; 3 (3): 285-99.

73. Mello CC and Conte Jr D. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004; 431 (7006): 338-42.
74. Mendoza-Martínez AE, Lara-Rojas F, Sánchez O, Aguirre J. NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers and Microbiology*. 2017; 8: 516.
75. Mendoza-Martínez AE, Cano-Domínguez N, Aguirre J. Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi. *Fungal Biology*. 2020; 124 (5): 253-262.
76. Miller L, Shuman JD, Sebastian T, Dauter Z, Johnson PF. Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/Enhancer-binding protein  $\alpha^*$ . *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (17): 15178-15184.
77. Miranda RU, Gómez-Quiroz LE, Mejia A, Barrios-González J. Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged- and solid-state fermentations. *Fungal Biology*. 2013; 117 (2): 85-93.
78. Miranda RU, Gómez-Quiroz LE, Mendoza M, Pérez-Sánchez A, Fierro F, Barrios-González J. Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology*. 2014; 118 (12): 979-989.
79. Monteiro PT, Mendes ND, Teixeira MC, d'Orey S, Tenreiro S, Mira NP, Pais H, Francisco AP, Carvalho AM, Lourenço AB, Sá-Correia I, Oliveira AL, Freitas AT. YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36(Database issue): D132-136.
80. Montibus M, Ducos C, Bonnin-Verdal M-N, Bormann J, Ponts N, Richard-Forget F, Barreau C. The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*. 2013; 8: e83377.
81. Montibus M, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F, Barreau C, Ponts N. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews i Microbiology*. 2015; 41 (3): 295-308.
82. Mulford KE and Fassler JS. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic cell*. 2011; 10 (6): 761-769.
83. Nesbitt BF, O'Kelly J, Sargeant K, Sheridan A. *Aspergillus flavus* and turkey X disease: Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*. 1962; 195: 1062-1063.
84. Nimmanee P, Tam EWT, Woo PCY, Vanittanakom P, Vanittanakom N. Role of the *Talaromyces marneffe* (*Penicillium marneffe*) *sakA* gene in nitrosative stress response, conidiation and red pigment production. *FEMS Microbiology Letters*. 2016; 364: fnw292.
85. North M, Tandon VJ, Thomas R, Loguinov A, Gerlovina I, Hubbard AE, Zhang L, Smith MT, Vulpe CD. Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. *PLoS ONE*. 2011; 6: e24205.
86. Pan YY and Liu G. Research advances on molecular regulation of filamentous fungal secondary metabolism in China. *Yi Chuan*. 2018; 40 (10): 874-887.

87. Peñalva MA, Moya A, Dopazo J, Ramon D. Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*. 1990; 241 (1302): 164-169.
88. Qiao J, Kontoyiannis DP, Calderone R, Li D, Ma Y, Wan Z, Li R, Liu W. Afyap1, encoding a bZip transcriptional factor of *Aspergillus fumigatus*, contributes to oxidative stress response but is not essential to the virulence of this pathogen in mice immunosuppressed by cyclophosphamide and triamcinolone. *Medical Mycology*. 2008; 46 (8): 773-782.
89. Quinn R. Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. *American Public Health Association*. 2013; 103 (3): 426-434.
90. Razin SV, Borunova VV, Maksimenko OG, Kantidze OL. Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 77 (3): 217-226.
91. Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, Fabbri AA, Fanelli C. Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis. *Mycotoxin Research*. 2006; 22: 39–47.
92. Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Camera E, Fabbri C, Picardo M, Fanelli C, Fabbri AA. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryotic Cell*. 2008; 7: 988–1000.
93. Reverberi M, Gazzetti K, Punelli F, Scarpari M, Zjalic S, Ricelli A, Fabbri AA, Fanelli C. *Aoyap1* regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 95: 1293–1304.
94. Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (15): 12507-12515.
95. Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*. 2010; 27 (5): 245-258.
96. Rodrigues-Pousada C, Devaux F, Caetano SM, Pimentel C, da Silva S, Cordeiro AC, Amaral C. Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview. *Microbial Cell*. 2019; 6 (6): 267-285.
97. Roze LV, Chanda A, Wee J, Awad D, Linz JE. Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with the oxidative stress response in *Aspergilli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286 (40): 35137-35148.
98. Rowe LA, Degtyareva N, Doetsch PW. Yap1: A DNA damage responder in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2012; 133 (4): 147-156.
99. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
100. Sakamoto K, Arima T-H, Iwashita K, Yamada O, Gomi K, Akita O. *Aspergillus oryzae atfB* encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genetics and Biology*. 2008; 45: 922–32.
101. Schnell N and Entian KD. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators. *European Journal of Biochemistry*. 1991; 200 (2): 487-493.
102. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG. The Structure of a CREB bZIP-Somatostatin CRE Complex reveals the basis for selective dimerization and divalent

- cation-enhanced DNA binding\*. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 275 (45): 35242-35247.
103. Sekonyela R, Palmer JM, Bok J-W, Jain S, Berthier E, Forseth R, Schroeder F, Keller NP. RsmA regulates *Aspergillus fumigatus* gliotoxin cluster metabolites including cyclo(L-Phe-L-Ser), a potential new diagnostic marker for invasive aspergillosis. PLoS ONE. 2013; 8: e62591.
  104. Shaaban MI, Bok JW, Lauer C, Keller NP. Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. Eukaryotic Cell. 2010; 9: 1816–1824.
  105. Sigl C, Haas H, Specht T, Pfaller K, Kürnsteiner H, Zadra I. Among Developmental Regulators, StuA but Not BrlA Is Essential for Penicillin V Production in *Penicillium chrysogenum*. Applied and Environmental Microbiology. 2011; 77 (3): 972-982.
  106. Singh MK and Dominy BN. Thermodynamic resolution: how do errors in modeled protein structures affect binding affinity predictions?. Proteins. 2010; 78 (7): 1613-1617.
  107. Steidl S, Hynes MJ, Brakhage AA. The *Aspergillus nidulans* multimeric CCAAT binding complex AnCF is negatively autoregulated via its hapB subunit gene. Journal of Molecular Biology. 2001; 306 (4): 643-653.
  108. Suarez C and Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009; 27 (2): 116-129.
  109. Suarez T and Peñalva MA. 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. 1996; 20 (3): 529-540.
  110. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Research. 2019; 47 (D1): D607:D613.
  111. Theilgaard HA, van den Berg MA, Mulder CA, Bovenberg RAL, Nielsen J. Quantitative analysis of *Penicillium chrysogenum* Wis54-1255 transformants overexpressing the penicillin biosynthetic genes. Biotechnology Bioengineering. 2001; 72 (4): 379-388.
  112. Thieman WJ and Palladino MA. Introducción a la Biotecnología. Pearson Educación, S.A. 2010.
  113. Thieme KG, Gerke J, Sasse C, Valerius O, Thieme S, Karimi R, Heinrich AK, Finkernagel F, Smith K, Bode HB, Freitag M, Ram AFJ and Braus GH. Velvet domain protein VosA represses the zinc cluster transcription factor SclB regulatory network for *Aspergillus nidulans* asexual development, oxidative stress response and secondary metabolism. PLoS Genetics. 2018; 14: e1007511.
  114. Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst Jr HN. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. The EMBO Journal. 1995; 14 (4): 779-790.



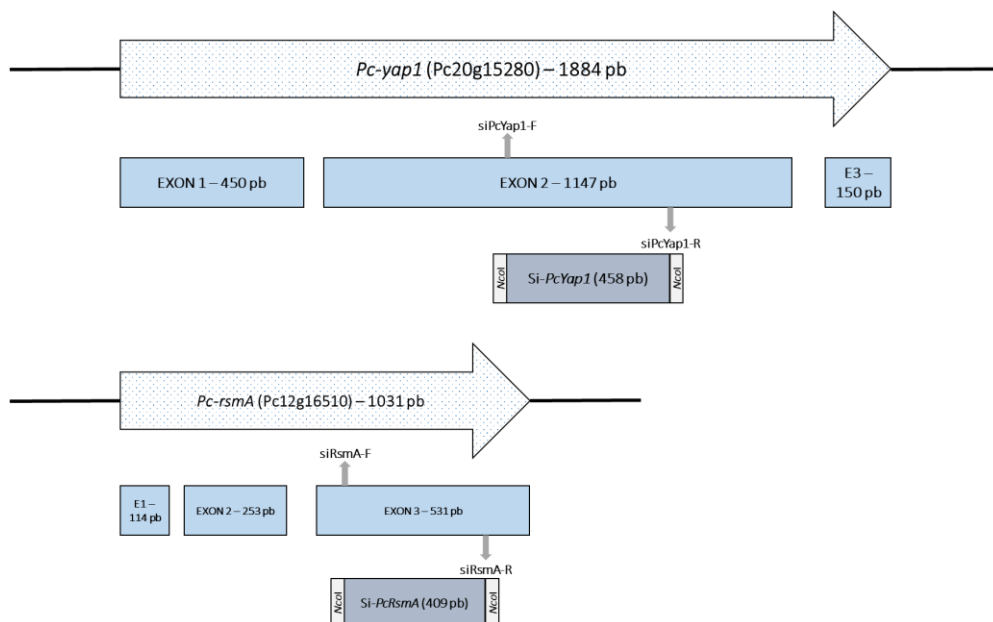
115. Toda T, Shimanuki M, Saka Y, Yamano H, Adachi Y, Shirakawa M, Kyogoku Y, Yanagida M. Fission yeast pap1-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crm1. *Molecular and Cellular Biology*. 1992; 12 (12): 5474-5484.
116. Toone WM, Kuge S, Samuels S, Morgan BA, Toda T, Jones N. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes and Development*. 1998; 12 (10): 1453-1463.
117. Toone WM and Jones N. Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes Cells*. 1998; 3: 485–98.
118. Toone WM and Jones N. AP-1 Transcription factors in yeast. *Current Opinion Genetics and Development*. 1999; 9 (1): 55-61.
119. Toone WM, Morgan BA, Jones N. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene*. 2001; 20: 2336-2346.
120. Ullán RV, Godio RP, Teijeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltrer R, Kosalková K, Martín F. RNA silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. *Journal of Microbiological Methods*. 2008; 75: 209–18.
121. van der Lende TR, van de Kamp M, van den Berg M, Sjollema K, Bovenberg RAL, Veenhuis M, Konings WN, Driessen AJM.  $\delta$ -(L-  $\alpha$ -Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal Genetics and Biology*. 2002; 37 (1): 49-55.
122. Wang X, Wub F, Liu L, Liu X, Che Y, Keller NP, Guo L, Yin WB. The bZIP transcription factor PfZipA regulates secondary metabolism and oxidative stress response in the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Fungal Genetics and Biology*. 2015; 81: 221–228.
123. Wang X, Zha W, Liang L, Fasoyin OE, Wu L, Wang S. The bZIP transcription factor AflRsmA regulates aflatoxin B1 biosynthesis, oxidative stress response and sclerotium formation in *Aspergillus flavus*. *Toxins*. 2020; 12: 271.
124. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 2018; 46 (W1): W296-W303.
125. Webb B and Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2016; 54: 5.6.1–5.6.37.
126. Wee J, Hong S, Roze LV, Day DM, Chanda A, Linz JE. The Fungal bZIP Transcription Factor AtfB Controls Virulence-Associated Processes in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins*. 2017; 9 (9): 287.
127. Wood MJ, Storz G, Tjandra N. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature*. 2004; 430 (7002): 917-921.
128. Wu X, Garcia-Estrada C, Vaca I, Martin JF. Motifs in the C-terminal region of the *Penicillium chrysogenum* ACV synthetase are essential for valine epimerization and processivity of tripeptide formation. *Biochimie*. 2012; 94 (2): 354-364.

129. Xu D, Marquis K, Pei J, Fu SC, Cağatay T, Grishin NV, Chook YM. LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics*. 2015; 31 (9): 1357-1365.
130. Yan C, Lee LH, Davis LI. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO Journal*. 1998; 17 (24): 7416-7429.
131. Yang X, Talibi D, Weber S, Poisson G, Raymond M. Functional isolation of the *Candida albicans* FCR3 gene encoding a bZip transcription factor homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p. *Yeast*. 2001; 18: 1217–1225.
132. Yesudhas D, Batool M, Anwar MA, Panneerselvam S, Choi S. Proteins recognizing DNA: Structural uniqueness and versatility of DNA-Binding domains in stem cell transcription factors. *Genes*, 2017; 8 (8): 192.
133. Yin WB, Amaike S, Wohlbach DJ, Gasch AP, Chiang Y, Wang CC, Bok J, Rohlfs M, Keller NP. An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through *afIR*. *Molecular Microbiology*. 2012; 83 (5): 1024-1034.
134. Yin WB, Reinke AW, Szilágyi M, Emri T, Chiang Y, Keating AE, Pócsi I, Wang CCC, Keller NP. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading)*. 2013; 159 (1): 77-88.
135. Zheng W, Zhang C, Bell EW, Zhang Y. I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE. *Future Generation Computer Systems*. 2019; 99: 73-85.
136. Zúñiga León JE. Identificación y caracterización de efectores de la vía de las proteínas G heterotriméricas mediada por Pga1 en *Penicillium chrysogenum*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 2021.

## XII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

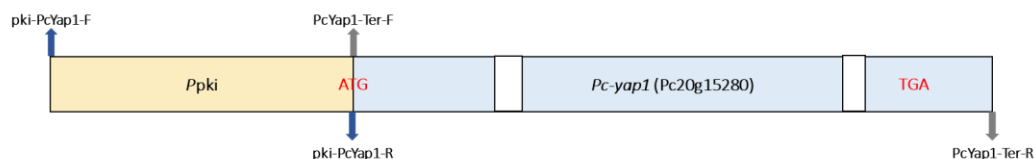
### CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

#### FRAGMENTOS OBTENIDOS POR PCR

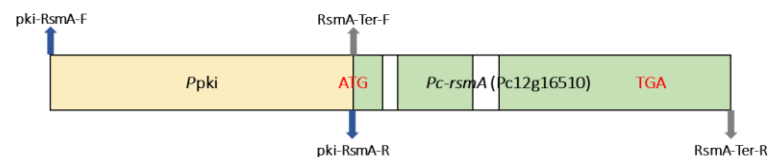


**Suplemento 1.** Fragmentos amplificados por PCR y digeridos con NcoI para ser insertados en el plásmido pGpdPki-RNAi, para el gen *Pc-yap1* se amplificó un fragmento de 458 pb con el que se obtuvo el plásmido pGpdPki-RNAi/PcYap1 y con el gen *Pc-rsmA* se amplificó un fragmento de 409 pb con el que se obtuvo el plásmido pGpdPki-RNAi/PcRsmA. Se indica la posición de los oligonucleótidos usados para la PCR.

#### pPyrG-*pki::Pc-yap1*

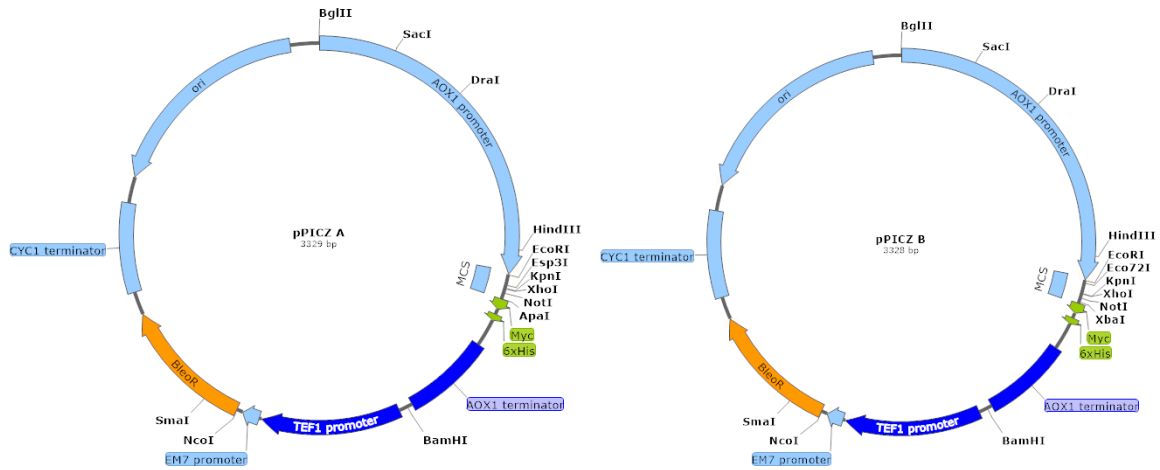


#### pPyrG-*pki::Pc-rsmA*



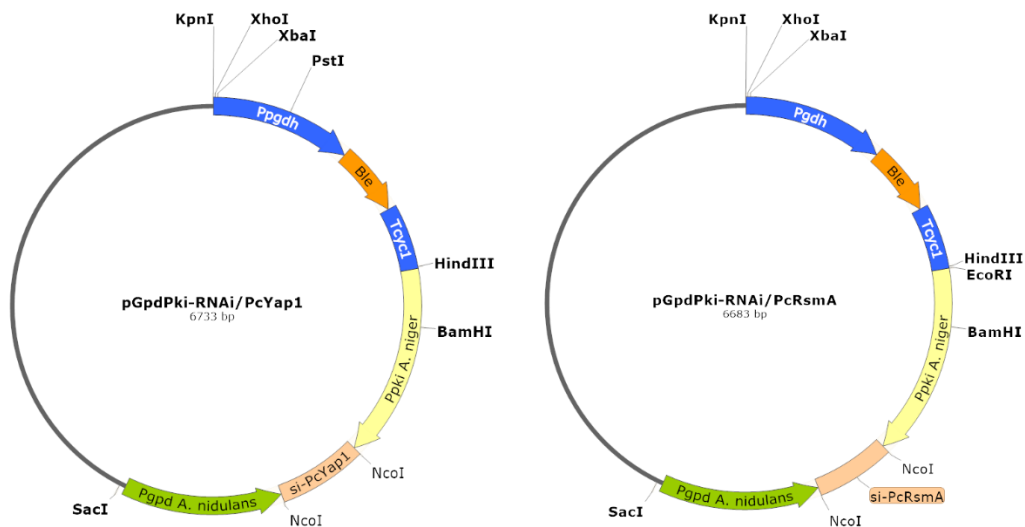
**Suplemento 2.** PCR recombinante para la sobreexpresión de los genes *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*, el promotor del gen *pki* de *A. niger* se fusionó con fragmento que incluyen los genes desde el ATG de inicio hasta alrededor de 300 pb corriente abajo del codón de paro TGA con el propósito de asegurar la presencia del terminador transcripcional. Se indica la posición de los oligonucleótidos usados para las PCR.





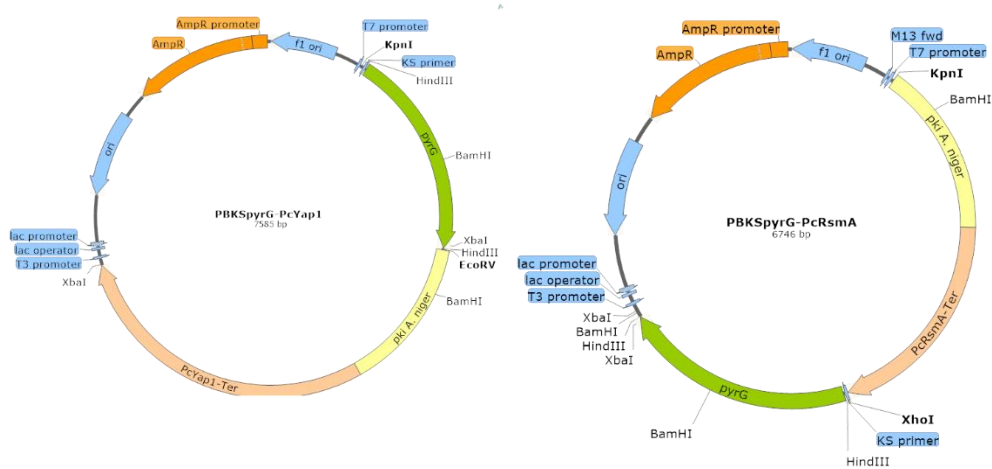
**Suplemento 5.** pPICZ-A, pPICZ-B (Invitrogen), plásmido de 3.3 kb utilizado para expresar proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. Las proteínas se expresan como fusiones a un péptido C-terminal que contiene el epítipo *c-myc* y una cola de poli-histidinas (6xHis) también denominada His-tag. Este vector permite un alto nivel en la expresión del gen de interés gracias a la presencia del promotor AOX1, inducible por metanol. Contiene: un promotor 5'AOX1 inducible por metanol, un gen de resistencia para selección por zeocina (fleomicina), secuencias que codifican el epítipo *c-myc* unido a una cola de 6 histidinas (His-tag), tres versiones diferentes (A, B y C) con un sitio múltiple de clonación diferente en cada una de ellas, lo que facilita la clonación en el marco de lectura correcto para la fusión del epítipo *c-myc* y la cola His-tag en el extremo C-terminal de la proteína expresada. Este plásmido se usó para la expresión de proteínas recombinantes: PcYap1::*c-myc*-6xHis, PcRsmA::*c-myc*-6xHis y PcAtf21::*c-myc*-6xHis.

### PLÁSMIDOS PARA EL SILENCIAMIENTO MEDIADO POR RNAi DE LOS GENES *Pc-yap1* Y *Pc-rsmA*



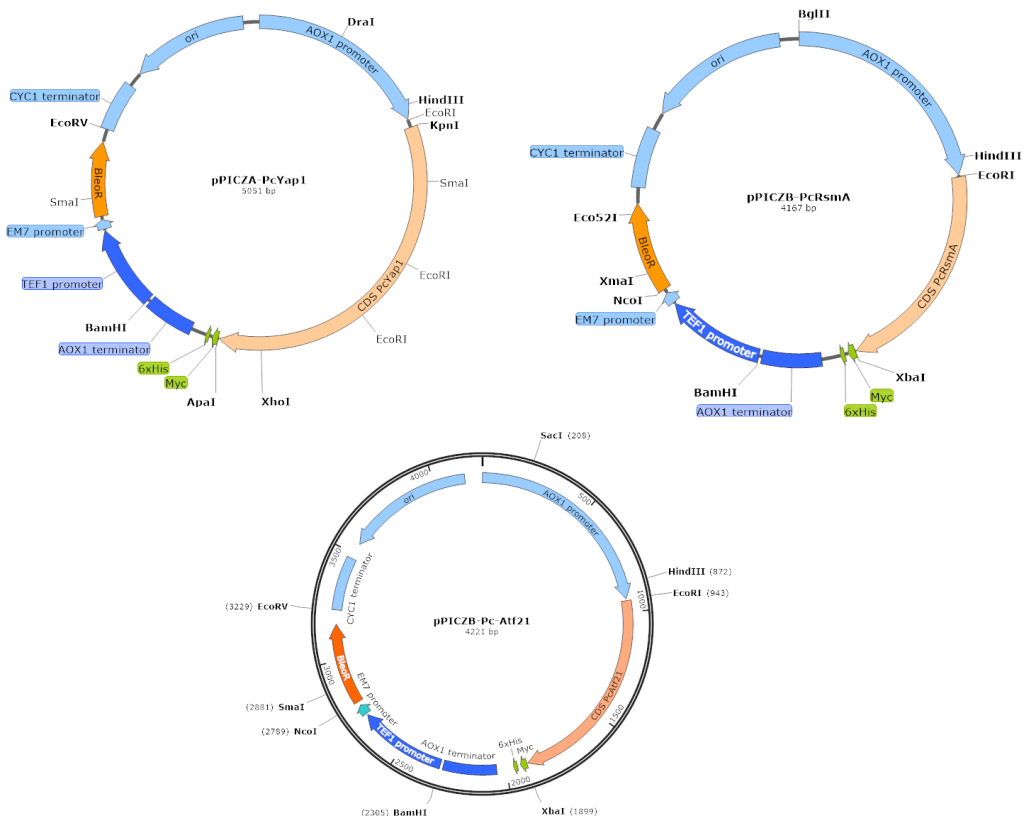
**Suplemento 6.** Construcciones obtenidas al insertar en el sitio *NcoI* los fragmentos correspondientes de *Pc-yap1* y *Pc-rsmA*, utilizados en la transformación por protoplastos de *P. chrysogenum* Wis54-1255.

## PLÁSMIDOS PARA LA SOBREENPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN



**Suplemento 7.** Construcciones obtenidas después de la fusión del *Ppki* a los genes *Pc-yap1* o *Pc-rsmA*, con su correspondiente terminador. Como plásmido base se usó el plásmido pBKs+ al que se le agregó el gen *pyrG* para tener una forma de seleccionar mutantes en la transformación por protoplastos de la cepa *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG* (auxótrofa de uridina).

## PLÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA HETERÓLOGA



**Suplemento 8.** Construcciones obtenidas para la expresión heteróloga de *PcYap1::c-myc-6xHis*, *PcRsmA::c-myc-6xHis* y *PcAtf21::c-myc-6xHis* en *P. pastoris* a partir de un cultivo líquido donde la inducción de la expresión se da por la adición de metanol al medio.

## TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	PROPÓSITO
pcbAB-pcbC-1F	ATCGGCGTGGTTCCGTTTC	PCR para Sonda 1 EMSA
pcbAB-pcbC-1R	ATGGAGATTGGCCAGGTCAG	PCR para Sonda 1 EMSA
pcbAB-pcbC-2F	CTGGCCAATCTCCATCG	PCR para Sonda 2 EMSA
pcbAB-pcbC-2R	TTGCCCACTGCCAAGTC	PCR para Sonda 2 EMSA
pcbAB-pcbC-3F	CTTGGCAGTGGGCAAAC	PCR para Sonda 3 EMSA
pcbAB-pcbC-3R	AACGACGGCGATGTTCC	PCR para Sonda 3 EMSA
pcbAB-pcbC-4F	AACATCGCCGTCGTTGAG	PCR para Sonda 4 EMSA
pcbAB-pcbC-4R	TCAGGCCAATCGTTGATG	PCR para Sonda 4 EMSA
pcbAB-pcbC-5F	CCGAGCATCAACGATTGG	PCR para Sonda 5 EMSA
pcbAB-pcbC-5R	TGTTTATGCTGAGACAACCTG	PCR para Sonda 5 EMSA
pcbAB-pcbC-6F	ATGTCTCCAGGTTGTCTC	PCR para Sonda 6 EMSA
pcbAB-pcbC-6R	GGAAGCCATGGTGTCTAG	PCR para Sonda 6 EMSA
AflR-RsmA-F	CGACTGACACAAGAAATAACAATTC	sonda AflR-RsmA para EMSA
AflR-RsmA-R	GAATTGTTATTTCTTGTCAGTCG	sonda AflR-RsmA para EMSA
upPta1-RsmA-F	GAGATACGGTTACTAATT	PCR para Sonda upPta1 EMSA
upPta1-RsmA-R	TGTTTATGCTGAGACAACCT	PCR para Sonda upPta1 EMSA
dwPta1-F	CCGAGCATCAACGATTGGC	PCR para Sonda dwPta1 EMSA
dwPta1-R	CCGTATCTCGAAGTCGGAG	PCR para Sonda dwPta1 EMSA
RsmA-2-F	CAGTAAGCATCTGGGCTGCAAGCGTATAATGTCTCCAGGTTGTCTCAGCATAAACA	Sonda RsmA-2 para EMSA
RsmA-2-R	TGTTTATGCTGAGACAACCTGGAGACATTATACGCTTGCCAGCCAGATGCTTACTG	Sonda RsmA-2 para EMSA
RsmA-2A-F	CAGTAAGCATCTGGGCTGCAAGCGTATA	Sonda RsmA-2A para EMSA
RsmA-2A-R	TATACGCTTGCCAGCCAGATGCTTACTG	Sonda RsmA-2A para EMSA
RsmA-2B-F	CAGTAAGCATCTGGGCTGCAAGCGTATAATGTCTCCAG	Sonda RsmA-2B para EMSA
RsmA-2B-R	CTGGAGACATTATACGCTTGCCAGCCAGATGCTTACTG	Sonda RsmA-2B para EMSA
RsmA-2C-F	CTCCAGGTTGTCTCAGCATAAACA	Sonda RsmA-2C para EMSA
RsmA-2C-R	TGTTTATGCTGAGACAACCTGGAG	Sonda RsmA-2C para EMSA
PTA1-WT-F	GCCAGTGTAATAATTAGTAACCGTATCTC	Sonda PTA1-WT para EMSA
PTA1-WT-R	GAGATACGGTTACTAATTTTACACTGGC	Sonda PTA1-WT para EMSA
PTA1-M1-F	GCCAGTGTAATAACTAGTACCGTATCTC	Sonda PTA1-M1 para EMSA
PTA1-M1-R	GAGATACGGTGACTAGTTTTACACTGGC	Sonda PTA1-M1 para EMSA
NorR_4-F	TTTCAACATTTCTTGAGTACTTTTCTAAGCCGTGACATAATGAACGGATCA	Sonda NorR4 para EMSA
NorR_4-R	TGATCCGTTTATTATGTACGGCTTAGAAAAGTACTCAAGAAATGTTGAAA	Sonda NorR4 para EMSA
penDE-CRE123-F	AGGTCCTGCATTAGCGTACGCCCCAGGTTTAGATCAAAGTTACGTAATTTATATGTA	Sonda penDE-CRE123 para EMSA
penDE-CRE123-R	TACATATAAATTACGTAACCTTTGATCTAAACCTGGGGCGTACGCTAATGCAGGACCT	Sonda penDE-CRE123 para EMSA
penDE-CRE123-M1-F	AGGTCCTGCATTAGCGTACGCCCCAGGTTTAGATCAAAGTACGAAATTTATATGTA	Sonda penDE-CRE123-M1 para EMSA
penDE-CRE123-M1-R	TACATATAAATTCGTAGCTTTGATCTAAACCTGGGGCGTACGCTAATGCAGGACCT	Sonda penDE-CRE123-M1 para EMSA

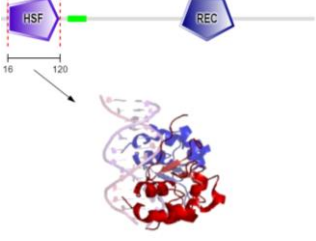
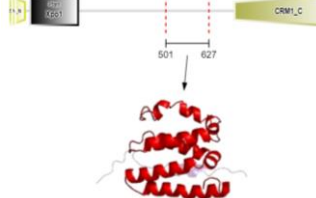

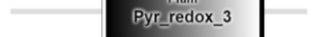
AP1-brlA-F	AAAACAATACAATTTACTAAAGTCCACTGGGCA	Sonda AP1-brlA para EMSA
AP1-brlA-R	TGCCCAGTGGACTTTAGTAAATTGTATTGTTTT	Sonda AP1-brlA para EMSA
AP1-brlA-MutF	AAAACAATACAATTGACTAGAGTCCACTGGGCA	Sonda AP1-brlA-Mut para EMSA
AP1-brlA-MutR	TGCCCAGTGGACTCTAGTCAATTGTATTGTTTT	Sonda AP1-brlA-Mut para EMSA
Yap1-F	TAGGATCCATAGACCTGCGATAAGCACACCC	Clonación de <i>Pc-yap1</i>
Yap1-R	AATCTAGACCCTTACAGCTTTCTTCTGGAGT	Clonación de <i>Pc-yap1</i>
RsmA-F	ACGGATCCATGACGTTTCGGATTCTGTACC	Clonación de <i>Pc-rsmA</i>
RsmA-R	CATAAGCTTGACGAGGACGACTACAAGAAAGA	Clonación de <i>Pc-rsmA</i>
AtfB-F	TCGGATCCATCTGTTCCGGTATTTGGGCTACT	Clonación de <i>Pc-atfB</i>
AtfB-R	AGAATTCGGAGTTTCTCAACCCCGTATATC	Clonación de <i>Pc-atfB</i>
RsmA-1	TCGAATCCGTAATGGATTACTTTCTATGATCCC	Inserción en pPICZ-B
RsmA-2	AGCCAGGGAGGTTTTGGTAATCTTCAAAGGGCGAATGTATCTGGTT	Fusión de exones en <i>Pc-rsmA</i>
RsmA-3	AACCAGATACATTCGCCCTTTGAAGAATTACAAAACCTCCCTGGCT	Fusión de exones en <i>Pc-rsmA</i>
RsmA-4	CTCCCGGAACGCTCGTTGAGCTGCTCGGTTCTGTGCCTT	Fusión de exones en <i>Pc-rsmA</i>
RsmA-5	AAGGCACAGAACCGAGCAGCTCAACGAGCGTTCCGGGAG	Fusión de exones en <i>Pc-rsmA</i>
RsmA-6	AGTCTAGATCAACTCATCAGACCAGCAGC	Inserción en pPICZ-B
Yap-1	AAAGTACCAATGGGTGATTACGAACGATAC	Inserción en pPICZ-A
Yap-6	TCGGGCCCTTGGCTCGCCCATAAATGTCGTC	Inserción en pPICZ-A
AtfB-1	TCGAATTCGACATGTCTACCAACCTCAAATC	Inserción en pPICZ-B
AtfB-2	TCTCTAGATTGATCAAGTCATCAAGGATGC	Inserción en pPICZ-B
siYAP1-F	TAAACCATGGACTCCTTCGTCTCGATCCAACCTC	Inserción en pGpdPki-RNAi, PCR sonda <i>Pc-yap1</i> para Northern
siYAP1-R	TACCCATGGTGGTGAGCCAACCAATCAATCC	Inserción en pGpdPki-RNAi, PCR sonda <i>Pc-yap1</i> para Northern
siRSM-A-F	TAAACCATGGCGCGACCTGGAAGACAAAGTAAA	Inserción en pGpdPki-RNAi
siRSM-A-R	TACCCATGGACACTGCGACATACCCTTCAAAC	Inserción en pGpdPki-RNAi
Pki1(gp1)F	TCTCTTCTCTCGCTCAC	Confirmación de transformantes silenciadas
Gpd1(pki1)R	TACTCCATCCTCCCATCC	Confirmación de transformantes silenciadas
qPcYap1-F	ACAATGCCATGCCAACAAATTTCC	qRT-PCR para <i>Pc-yap1</i>
qPcYap1-R	GAAGAGATGACCACCAGGCAAATC	qRT-PCR para <i>Pc-yap1</i>
qRsmA-F	TTCGCTATACGGGCTGCCTAC	qRT-PCR for <i>Pc-rsmA</i>
qRsmA-R	CATCGGGCATGAAGGTGGTAT	qRT-PCR para <i>Pc-rsmA</i>
qactA-F	AGAAGTTGCTGCTCTCGTCA	qRT-PCR para $\gamma$ -actina
qactA-R	CGACAATGGAAG GGAACA	qRT-PCR para $\gamma$ -actina
pki-PcYap1-F	AAGGATATCAATGGAAGAGAAAACCTC	Fusión para <i>OE::PcYap1</i>
PcYap1-Ter-F	CAGTAGAGATCAATCATCCGTCAGATGGGTGATTACGAACGATAC	Fusión para <i>OE::PcYap1</i>
pki-PcYap1-R	GTATCGTTCGTAATCACCCATCTTGACGGATGATTGATCTACTG	Fusión para <i>OE::PcYap1</i>
PcYap1-Ter-R	TCACTAGTGGGACCCTGATAGATTGCCAC	Fusión para <i>OE::PcYap1</i>
pki-RsmA-F	AGGGTACCAATGGAAGAGAAAACCTC	Fusión para <i>OE::PcRsmA</i>
RsmA-Ter-F	CAGTAGAGATCAATCATCCGTCAGATGGATTACTTTCTATGATC	Fusión para <i>OE::PcRsmA</i>
pki-RsmA-R	GATCATAGAAGAGTAATCCATCTTGACGGATGATTGATCTACTG	Fusión para <i>OE::PcRsmA</i>



RsmA-Ter-R	ATC <b>CTCGAG</b> TGCACAGTCTCGTCAGATATG	Fusión para <i>OE::PcRsmA</i>
OE-PcYap1-R	CGTAGTAGGCTCTGAAGTCAGTGG	Confirmación de transformantes <i>OE::PcYap1</i>
OE-RsmA-R	GCTGCTCGGTTCTGTGCCTT	Confirmación de transformantes <i>OE::PcRsmA</i>
N-brlA-1F	TCTTCCTGGATACGACGAGAATGT	PCR sonda <i>brlA</i> para Northern blot
N-brlA-1R	AGGAGCTGTTTCTGGAGGATTTG	PCR sonda <i>brlA</i> para Northern blot
N-actA-1F	CACCACGAGCTGTTTTCCCTT	PCR sonda <i>γ-actina</i> para Northern blot
N-actA-1R	TCAGCGAGGATCTTCATCAGGTAGT	PCR sonda <i>γ-actina</i> para Northern blot

**Suplemento 9.** Listado de las secuencias de oligonucleótidos utilizados para el trabajo experimental indicando nombre, orientación y propósito, las secuencias que tienen zonas resaltadas en rojo se refiere a sitios de corte para determinadas enzimas de restricción que eran necesarias para su uso en experimentos en específico.

## RED DE ASOCIACIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA DE PcYap1

ESTRUCTURA	DESCRIPCIÓN
	<p>Pc22g04440 (626 aa)</p> <p>Score: 0.958</p> <p>Estructura PDB: 5d5x, identidad del 84.8%</p> <p>HSF: Factor de choque térmico, activador transcripcional de genes de choque térmico.</p> <p>REC: Dominio del receptor homólogo de cheY, regula la rotación en sentido horario de los motores flagelares de <i>E. coli</i>. Este dominio contiene un sitio fosfoceptor que es fosforilado por homólogos de histidina quinasa.</p>
	<p><b>Pc16g01720 (1072 aa)</b></p> <p>Estructura PDB: 2I1I, identidad del 81.9%</p> <p>Score: 0.930</p> <p>IBN_N: Dominio N-terminal de importación <math>\beta</math>.</p> <p>Xpol: Dominio Pfam, complejo de poro para transporte activo de moléculas grandes.</p> <p>CRM1_C: Exportina I, media la exportación nuclear de proteínas que llevan una señal de exportación nuclear rica en leucinas (NES). CRM1 forma un complejo con la proteína que contiene NES y la pequeña GTPasa Ran, esta región forma una estructura alfa helicoidal formada por seis motivos de horquilla helicoidales que son estructuralmente similares a la repetición HEAT.</p>
	<p><b>Pc21g14490 (775 aa)</b></p> <p>Score: 0.890</p> <p>HSF: Factor de choque térmico, activador transcripcional de genes de choque térmico.</p>
	<p><b>Pc22g02940 (334 aa)</b></p> <p>Score: 0.855</p> <p>Tiorredoxina reductasa TrxB, Pertenece a la familia de la piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa de clase II.</p>

	<p>Dominio Pfam, Pyr_redox_3, Piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasa.</p>
	<p><b>Pc18g01780 (189 aa)</b>  Score: 0.843  Glutación peroxidasa  Dominio Pfam: GSHPx glutación peroxidasa, es el nombre general de una familia de enzimas con actividad peroxidasa cuya función biológica principal es proteger al organismo del daño oxidante. La función bioquímica de la glutación peroxidasa es reducir los hidroperóxidos de lípidos a sus correspondientes alcoholes y reducir el peróxido de hidrógeno libre a agua.</p>
	<p><b>Pc16g12230 (668 aa)</b>  Score: 0.842  Dominios SMART: ZnF_C2H2, dedos de zinc de tipo C2H2 (clásico), contienen una horquilla beta corta y una hélice alfa, donde un solo átomo de zinc se mantiene en su lugar por sus residuos de cisteína (Cys)</p>
	<p><b>Pc16g13280 (474 aa)</b>  Score: 0.827  Pertenece a la familia de la piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasa de clase I  Dominios Pfam: Pyr_redox_3 y Pyr_redox_dim, Piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasa, dominio de dimerización.</p>
	<p><b>Pc13g15380 (670 aa)</b>  Score: 0.822  Dominio Pfam: GCS, Esta familia representa la subunidad catalítica de glutamato-cisteína ligasa, también conocida como gamma-glutamilcisteína sintetasa (GCS). Esta enzima cataliza el paso limitante de la velocidad en la biosíntesis del glutatión. La enzima eucariota es un dímero de cadena pesada y cadena ligera con toda la actividad catalítica exhibida por la cadena pesada.</p>



### Pc13g09580 (460 aa)

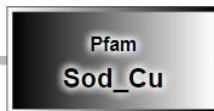
Score: 0.819

Dominio Pfam: Aft1\_OSA, dominio de respuesta osmótica al estrés.

Dominio Pfam: Aft1\_HRA, dominio involucrado en la recombinación melótica, necesario y suficiente para activar la recombinación.

Dominio Pfam: Aft1\_HRR, dominio involucrado en la recombinación melótica, necesario y suficiente para reprimir la recombinación.

Dominio SMART: BRLZ, dominio de cremallera de leucina básica (bZIP).



### Pc21g16940 (154 aa)

Score: 0.671

Superóxido dismutasa [Cu-Zn]. Destruye los radicales que normalmente se producen dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos, pertenece a la familia de la superóxido dismutasa de Cu-Zn.

Dominio Pfam: Sod\_Cu, las superóxido dismutasas (SOD) son metaloproteínas ubicuas que previenen el daño de los radicales libres mediados por oxígeno al catalizar la dismutación del superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.

**Suplemento 10.** Listado de los dominios presentes en cada proteína en la red de interacción de PcYap1 (interacciones directas e indirectas) obtenida por STRING y la descripción de cada uno de ellos

## MEDIOS DE CULTIVO

### CZAPEK

Componentes (g/L):  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , 30;  $NaNO_3$ , 2;  $K_2HPO_4$ , 0.5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01; Agar bacteriológico, 10. Aforar con agua destilada.

Medio de cultivo para regeneración y mantenimiento de *P. chrysogenum*. Para la regeneración de protoplastos se añade sorbitol 1M como estabilizador osmótico, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C.

### Luria-Bertani (LB)

Componentes (g/L): Bactotripton, 10; NaCl, 10; Extracto de levadura, 5. Aforar con agua destilada.

Medio de cultivo para *E. coli*. Se ajusta el pH a 7.5 con NaOH; para su uso como medio sólido se añade 20 g/L de agar bacteriológico, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C. Para transformaciones de *E. coli* con el plásmido pPICZ se usa una versión baja en sales añadiendo solo el 50% de NaCl a la formulación.

### MCFP

Componentes (g/L): Lactosa, 55; Sólidos de maceración de maíz, 35;  $CaCO_3$ , 10;  $KH_2PO_4$ , 7;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3. Añadir 10 mL de fenilacetato potásico al 40% (p/v)\* y aforar con agua destilada.

\* Fenilacetato potásico al 40% (p/v): Ácido fenilacético, 20 g; KOH al 40%, 25 mL; Agua destilada hasta 50 mL; pH resultante: 8-8.2; almacenar protegido de la luz a temperatura ambiente.

Medio complejo de producción de penicilina de *P. chrysogenum*. Se ajusta el pH a 6.8 con el 90% del volumen final y enseguida se afora, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C.

### MCIP

Componentes (g/L):  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , 20; Sólidos de maceración de maíz, 20; Extracto de levadura, 10;  $CaCO_3$ , 5. Aforar con agua destilada.

Medio de inóculo de *P. chrysogenum* para inducción de estrés oxidante y medición de producción de penicilina. Se ajusta el pH a 5.7 con el 90% del volumen final y enseguida se afora, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C (antes de su uso resuspender los sólidos sedimentados).

## PMMY

Componentes (g/L): C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 40; NaNO<sub>3</sub>, 3; Extracto de levadura, 2; KCl, 0.5; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.5; FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.01. Aforar con agua destilada.

Medio de cultivo para desarrollo de micelio de *P. chrysogenum*. Se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C.

## POWER

Componentes (g/L): Lactosa, 5; Peptona de caseína, 2.5; Sólidos de maceración de maíz, 0.5; KCl, 1; NaCl, 2; NaNO<sub>3</sub>, 1.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.25; Agar bacteriológico, 20. Sales Power\*, 1000 µL y aforar con agua destilada.

\*Sales Power (g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6; FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 1; FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 0.4; CuSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.2. Aforar con agua destilada a un volumen final de 200 mL, se mezcla perfectamente y se conserva en un frasco limpio a temperatura ambiente (antes de cada uso agitar para resuspender los sedimentos).

Medio de cultivo para esporulación y mantenimiento de *P. chrysogenum*. Se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C.

## YPD

Componentes (g/L): Extracto de levadura, 10; Bactopeptona, 20. Aforar con agua destilada a un volumen final de 900 mL.

Medio de cultivo para mantenimiento y crecimiento de *P. pastoris*. En medio sólido se añade agar bacteriológico a una concentración de 20g/L, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C, una vez estéril se añade en condiciones de esterilidad 10% de D10X (200 g/L de dextrosa filtrada por membrana de 0.22 µm).

## YP-Metanol

Componentes (g/L): Extracto de levadura, 10; Bactopeptona, 20. Aforar con agua destilada a un volumen final de 990 mL.

Para inducción de la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C, una vez estéril y a temperatura ambiente se añade justo antes de inocular 1% de metanol puro y se mezcla perfectamente.

### YPD- 2% Glicerol

Componentes (g/L): Extracto de levadura, 10; Bactopeptona, 20. Añadir 20 mL de glicerol y aforar con agua destilada a un volumen final de 900 mL.

Medio de cultivo para crecimiento de transformantes de *P. pastoris*. Se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C, una vez estéril se añade en campana 10% de D10X.

## SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES

### **Amortiguador de carga para DNA 6X (migración nominal 300 pb)**

Componentes: Xilencianol (migración nominal 4 Kb), 25 mg; Azul de bromofenol (migración nominal 300 pb), 25 mg; Glicerol, 3 mL. Aforar con agua miliQ filtrada en membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro a un volumen final de 10 mL.

Se homogeneiza con vortex y se conserva a 4 °C protegido de la luz, por cada mililitro añadir 2  $\mu\text{L}$  de Gel Red; usar 1  $\mu\text{L}$  por cada  $\mu\text{L}$  de muestra en electroforesis en gel de agarosa.

### **Amortiguador de carga para RNA**

Componentes: Formamida, 550  $\mu\text{L}$ ; Formaldehído, 200  $\mu\text{L}$ ; MAE 10X, 125  $\mu\text{L}$ ; Glicerol 80%, 100  $\mu\text{L}$ ; Azul de bromofenol 25 mg, GelRed, 1  $\mu\text{L}$ .

Se homogeneiza con vortex y se conserva a 4 °C protegido de la luz.

### **Amortiguador de carga para SDS-PAGE**

Componentes (mL): Agua miliQ filtrada, 3.55; Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 1.25; Glicerol, 2.5; SDS 10%, 2; Azul de bromofenol 0.5%, 0.2.

Se mezclan los componentes con vortex y se conserva a 4 °C en alícuotas de 1 mL.

### **Amortiguador de corrida 10 X, pH 8.3 para SDS-PAGE**

Componentes (g/L): Tris base, 30.3; Glicina, 144; SDS, 10. Aforar con agua miliQ filtrada en membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Se conserva a 4 °C, para cada electroforesis se requiere una concentración 1X por lo que se disuelve en agua miliQ filtrada en membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se enfría para su uso.

### **Amortiguador de rotura pH 7.4**

Componentes:  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 50 mM; EDTA, 1 mM; Glicerol, 5%.

Para extracción de proteína, se disuelve en agua miliQ, se ajusta el pH con NaOH con el 90% del volumen final y enseguida se afora, se esteriliza por filtración con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se conserva a 4 °C en un frasco lavado con agua miliQ filtrada, SDS al 10% en agua y etanol.



### **Amortiguador de unión pH 8**

Componentes: NaCl, 500 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM.

Para purificación de proteína, se mezcla perfectamente en agua miliQ y se ajusta a pH 8 con un stock de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM en agua miliQ con el 90% del volumen final y enseguida se afora, se esteriliza por filtración con una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro y se conserva a 4 °C en un frasco lavado con agua miliQ filtrada, SDS al 10% en agua y etanol.

### **Amortiguador TB**

Componentes: PIPES, 10 mM; CaCl<sub>2</sub>, 15 mM; KCl, 250 mM.

Para obtención de células ultracompetentes de *E. coli*, se mezclan los componentes y se ajusta el pH a 6.7, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C y se añade 55 mM de MnCl<sub>2</sub> previamente esterilizado.

### **Blue Silver Coomassie (solución de tinción)**

Componentes (%): H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10; Metanol, 20; Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD), 0.12.

Para tinción de geles de poliacrilamida, se mezclan los componentes y se lleva a un volumen de 1000 mL de agua miliQ filtrada con una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro, se conserva a temperatura ambiente en un frasco ámbar, agitar vigorosamente antes de cada uso para disolver sedimentos.

### **KCM**

Componentes: CaCl<sub>2</sub>, 50 mM; KCl, 0.7 M; MES, 10 M.

Para obtención de protoplastos de *P. chrysogenum*, se mezclan los componentes con agua destilada y se ajusta el pH a 5.8, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C.

### **MAE 10X**

Componentes: MOPS, 0.2 M; EDTA, 50 mM.

Para geles de agarosa con RNA, se mezclan los componentes con agua miliQ, se ajusta el pH a 7, se esteriliza por filtración con una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro y se almacena en un frasco ámbar a 4 °C.

## **PBS**

Componentes (mM/L): NaCl, 137; KCl, 2.7; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.

Para cuantificación de ROS, se mezclan todos los componentes con agua destilada y se ajusta el pH a 7.4, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C y se almacena a 4 °C.

## **PCM**

Componentes: CaCl<sub>2</sub>, 50 mM; MES, 10 mM; Polietilenglicol 6000, 50%.

Para obtención de protoplastos de *P. chrysogenum*, se mezclan todos los componentes con agua destilada, se ajusta el pH a 5.8 y se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C.

## **Solución de hibridación Northern blot**

Componentes: SSC 10X, 6X; SDS 1%, 0.1%; Formamida, 40%; Denhart 50X (Sigma-Aldrich), 1X.

Se mezclan los componentes con agua miliQ filtrada con una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro en un frasco de vidrio lavado con SDS 10% en agua, agua miliQ y etanol y se conserva a temperatura ambiente.

## **Solución de lavado I Northern blot**

Componentes: SSC 10X, 2X; SDS 0.1%.

Se mezclan los componentes con agua miliQ filtrada con una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro en un frasco de vidrio lavado con SDS 10% en agua, agua miliQ y etanol y se conserva a temperatura ambiente.

## **Solución de lavado II Northern blot**

Componentes: SSC 10X, 0.1X; SDS 0.1%.

Se mezclan los componentes con agua miliQ filtrada con una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro en un frasco de vidrio lavado con SDS 10% en agua, agua miliQ y etanol y se conserva a temperatura ambiente.

## **Solución fijadora**

Componentes (%): Ácido acético glaciado, 10; Etanol absoluto, 40; Agua miliQ filtrada, 50.

Para geles de poliacrilamida, se prepara en campana de extracción el volumen justo al momento de usar, al finalizar los vasos y probetas usados se mantiene en campana de extracción para la evaporación de los residuos antes del lavado.

### **SSC 10X**

Componentes (M): NaCl, 1.5;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 0.15.

Para Northern blot, se disuelven los componentes con agua miliQ, se ajusta el pH a 7 con HCl 0.1 N, se esteriliza por filtración con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se conserva a temperatura ambiente.

### **TAE 50X**

Componentes: Tris base, 242 g; EDTA, 18.61 g; Ácido acético glacial, 57.1 mL.

Para geles de agarosa con DNA, se mezclan el Tris base y EDTA con el 70% de agua miliQ filtrada con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro hasta disolverse, enseguida se agrega el ácido acético y se afora a 1L, se almacena en un frasco de vidrio limpio a temperatura ambiente.

### **TBE 5X**

Componentes (mM): Tris base, 450;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 450; EDTA, 10.

Para EMSA, se disuelven los componentes con agua miliQ, se ajusta el pH a 8.3, se esteriliza por filtración con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se conserva a 4 °C, para su uso se diluye a una concentración de 0.5X en agua miliQ filtrada.

### **TPP**

Componentes (M): KCl, 0.7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50.

Para obtención de protoplastos de *P. chrysogenum*, se mezclan todos los componentes con agua destilada, se ajusta el pH a 5.8 y se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00269

Matrícula: 2133805868

Regulación de la respuesta al estrés oxidante, el metabolismo secundario y la diferenciación mediante factores transcripcionales del tipo AP-1 en *Penicillium chrysogenum*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 18 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL  
DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO  
DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: WYLMA DOLORES PEREZ PEREZ

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

**APROBAR**

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



WYLMA DOLORES PEREZ PEREZ  
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL

VOCAL

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

SECRETARIO

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO