

**Identificación y caracterización de efectores de la vía de las
proteínas G heterotriméricas mediada por
Pga1 en *Penicillium chrysogenum***

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Tesis para obtener el grado de:
Doctor en Biotecnología

Presenta:

Q. F. B. Zúñiga León Jesús Eduardo

Matrícula: 2151800129

Director de Tesis:

Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesores:

Dr. Francisco José Fernández Perrino¹

Dra. Rosario Vera Estrella²

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

²Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de Microorganismos Industriales del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco Fierro Fierro. El trabajo fue financiado por CONACyT con el número de registro CB 2013-222207-B.

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Fierro, por su confianza, paciencia, y sobre todo por compartir de manera extraordinaria su conocimiento.

A mi familia, porque han estado conmigo en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio, principalmente a Ulises, María Fernanda, Wylma y Omar, por compartir experiencias, apoyarme y crear un clima de trabajo agradable.

Mamá “hoy soy el que soy porque de ti tomé gran parte”.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00235

Matrícula: 2151800129

Identificación y caracterización de efectores de la vía de las proteínas G heterotriméricas mediada por Pgal en *Penicillium chrysogenum*



JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 20 del mes de enero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DR. MIGUEL ANGEL DEL RIO PORTILLA
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:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON

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 al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

VOCAL

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL

DR. MIGUEL ANGEL DEL RIO PORTILLA

SECRETARIO

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

Resumen

Las vías de señalización controlan todos los procesos intracelulares que ocurren en los organismos. La vía de las proteínas G heterotriméricas es una de estas vías, y ha sido ampliamente estudiada en varios hongos filamentosos, incluyendo *Penicillium chrysogenum*. Se ha demostrado que estas proteínas regulan procesos como la respuesta a estrés oxidativo y osmótico, germinación, crecimiento vegetativo, conidiación y producción de metabolitos secundarios. En un estudio proteómico previo de esta vía de transducción de señales en *P. chrysogenum* se identificaron efectores implicados en el metabolismo primario, plegamiento de proteínas, respuesta a estrés y morfogénesis; estos efectores variaron su abundancia como consecuencia de la actividad de la subunidad Gα Pga1 de las proteínas G heterotriméricas. Partiendo de este antecedente, en el presente trabajo se ha realizado un análisis fosfoproteómico (mediante la técnica “*shotgun phosphoproteomics*”, con el fin de identificar posibles efectores directos e indirectos regulados por la subunidad Gα Pga1 mediante fosforilación), orientado de manera primordial a la caracterización del proceso de conidiación del hongo. A partir de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Wis54-1255) y dos cepas mutantes (44_Pga1Q204L y Δ pga1), se identificaron 1165 proteínas fosforiladas, las cuales, fueron sometidas a un análisis por homología y arquitectura de secuencias usando una base de datos curada a partir de proteínas implicadas en la conidiación en *A. nidulans*. Un total de 87 proteínas resultaron implicadas directamente en la conidiación y desarrollo de conidióforos, entre ellas se incluyen sensores de membrana, adaptadores, transportadores, factores de transcripción y cinasas. Las 87 fosfoproteínas están implicadas en vías de señalización bien conservadas en hongos filamentosos. Aunque la vía de las proteínas G heterotriméricas está activa durante la conidiación, se identificaron otras vías reguladas por fosforilación que impactan en la septación, integridad de la pared celular, respuesta a estrés oxidativo y osmótico, y regulación del desarrollo asexual, todas reguladas por “*crosstalk*”, es decir, compartiendo componentes entre ellas de tal forma que la actividad de cada una se ve influida por la de otras. Este estudio fosfoproteómico permitió identificar varios efectores indirectos de Pga1 implicados en la conidiación y desarrollo de conidióforos y, además, logró identificar cuatro posibles efectores directos de Pga1 (Pc21g07090/PkcA, Pc21g05940/RasA, Pc16g04070/SCP160 y Pc21g17500/SteC) regulados por fosforilación y con posibles interacciones a nivel de membrana.

Abstract

Signaling pathways control all intracellular processes that occur in all organisms. The heterotrimeric G protein pathway is one of these pathways, and has been extensively studied in several filamentous fungi, including *Penicillium chrysogenum*. These proteins have been shown to regulate processes such as the response to oxidative and osmotic stress, germination, vegetative growth, conidia, and production of secondary metabolites. In a previous proteomic study, of this transduction pathway in *P. chrysogenum*, effectors of the pathway involved in primary metabolism, protein folding, stress response and morphogenesis were identified; these effectors varied in abundance as a consequence of the activity of the Gα Pga1 subunit of the heterotrimeric G proteins. Based on this background, in this study a phosphoproteomic analysis was carried out, using the "shotgun phosphoproteomics" technique, to identify possible direct and indirect effectors regulated by the Gα Pga1 subunit by phosphorylation, primarily aimed at characterizing conidia process of the fungus. From the strain *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Wis54-1255) and two mutant strains (44_Pga1Q204L and $\Delta pga1$), 1165 phosphorylated proteins were identified, which were subjected to an analysis by homology and sequence architecture using a database curated from proteins involved in conidia in *A. nidulans*. A total of 87 proteins were directly involved in conidiation and development of conidiophores, including membrane sensors, adapters, transporters, transcription factors, and kinases. All 87 phosphoproteins are involved in well conserved signaling pathways in filamentous fungi. Although the heterotrimeric G protein pathway is active during conidiation, other phosphorylation-regulated pathways have been identified that impact septation, cell wall integrity, response to oxidative and osmotic stress, and regulation of asexual development, all regulated by "crosstalk", that is, sharing components between them in such a way that the activity of each one is influenced by that of others. This phosphoproteomic study made it possible to identify several indirect effectors of Pga1 involved in conidiation and development of conidiophores, and in addition, it was possible to identify 4 possible direct effectors of Pga1 (Pc21g07090 / PkcA, Pc21g05940 / RasA, Pc16g04070 / SCP160 and Pc21g17500) regulated by phosphorylation and with possible interactions at the membrane level.

Tabla de contenido

Capítulo 1 Marco teórico.....	1
1.1. Transducción de señales mediada por proteínas G heterotriméricas.....	2
1.1.1. Subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas.....	4
1.1.2. Proteínas G heterotriméricas en hongos filamentosos.....	6
1.2. Mutación Q204L en la subunidad G α I: su origen.....	9
1.3. Revisión: Subunidad G α I en hongos filamentosos de la división Ascomycota.....	10
1.3.1. <i>Neurospora crassa</i>	11
1.3.2. <i>Aspergillus</i> spp.....	12
1.3.3. <i>Fusarium</i> spp.....	15
1.3.4. <i>Trichoderma</i> spp.....	16
1.3.5. <i>Penicillium</i> spp.....	18
1.3.6. <i>Magnaporthe</i> spp.....	20
1.3.7. Otros hongos filamentosos de importancia mundial.....	21
1.3.7.1. <i>Botrytis cinerea</i>	22
1.3.7.2. <i>Colletotrichum</i> spp.....	23
1.3.7.3. <i>Stagonospora nodorum</i>	23
1.3.7.4. <i>Rosellinia necatrix</i>	24
1.3.7.5. <i>Septoria tritici</i>	25
1.3.7.6. <i>Monascus ruber</i>	25
1.3.7.7. <i>Chaetomium globosum</i>	25
1.3.7.8. <i>Sporothrix schenckii</i>	26
1.4. Conidiación en hongos filamentosos: regulación y vía central.....	27
1.5. Proteínas cinasas.....	28
1.6. Proteómica y Fosfoproteómica.....	30
1.7. Bioinformática en proteómica.....	33
1.8. Justificación.....	35
1.9. Hipótesis.....	36
1.10. Objetivos generales.....	36
Capítulo 2 Obtención de una cepa mutante Pga1 ^{Q204L} y caracterización de su fenotipo.....	37
2.1. Introducción.....	38
2.2. Objetivos.....	39
2.2.1. Objetivo general.....	39
2.2.2. Objetivos específicos.....	39
2.3. Materiales y métodos.....	40
2.3.1. Microorganismos.....	40
2.3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	40
2.3.1.2. <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255.....	40
2.3.1.3. <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255 pyrG ⁻	40
2.3.1.4. <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255 Δ pga1.....	40
2.3.1.5. <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255 Pga1Q204L.....	40
2.3.2. Medios de cultivo para <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255.....	41
2.3.3. Vectores de clonación y plásmidos.....	41
2.3.4. Oligonucleótidos.....	41
2.3.5. Digestiones enzimáticas y ligación de fragmentos de ADN.....	41
2.3.6. Extracción de ADN plasmídico.....	42
2.3.7. ADN genómico de <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255.....	42
2.3.8. Mutagénesis dirigida.....	42
2.3.9. Preparación y transformación de células Ultracompetentes de <i>E. coli</i>	42
2.3.10. Preparación de protoplastos de <i>P. chrysogenum</i>	42
2.3.11. Transformación de <i>P. chrysogenum</i> Wis54-1255 pyrG ⁻	43
2.3.12. Producción de biomasa (por peso seco).....	43

2.3.13.	Conidiación.....	43
2.3.14.	Extensión radial.....	43
2.3.15.	Cuantificación de cAMP intracelular.....	44
2.3.16.	Análisis estadísticos.....	44
2.4.	Resultados y discusión.....	45
2.4.1.	Clonación de <i>pga1</i> y construcción del plásmido pPgaQ204Lp.....	45
2.4.2.	Selección y confirmación de cepas transformantes.....	48
2.4.3.	Producción de biomasa.....	50
2.4.4.	Crecimiento radial.....	51
2.4.5.	Efecto de Pga1 en la conidiación.....	54
2.4.6.	Efecto de Pga1 sobre los niveles intracelulares de cAMP.....	58
2.5.	Conclusiones.....	60
Capítulo 3	“Shotgun phosphoproteomics”.....	61
3.1.	Introducción: fosfoproteómica en hongos filamentosos.....	62
3.2.	Objetivos.....	63
3.2.1.	Objetivo general.....	63
3.2.2.	Objetivos específicos.....	63
3.3.	Materiales y métodos.....	64
3.3.1.	Microorganismos.....	64
3.3.2.	Condiciones de cultivo y recolección de micelio.....	64
3.3.3.	Obtención, cuantificación y digestión de proteínas intracelulares.....	64
3.3.4.	Enriquecimiento de fosfopéptidos.....	65
3.3.5.	Análisis de fosfopéptidos por espectrometría de masas.....	65
3.3.6.	Análisis y procesamiento de datos.....	65
3.3.6.1.	Programas informáticos, bioinformáticos y módulos.....	65
3.3.6.2.	Construcción de una base de datos <i>target-decoy</i>	66
3.3.6.3.	Identificación de fosfopéptidos y fosfoproteínas.....	66
3.3.7.	Análisis de residuos de aminoácidos que flanquean el sitio de fosforilación.....	66
3.3.8.	Anotaciones funcionales.....	67
3.4.	Resultados y discusión.....	68
3.4.1.	Estrategia para el análisis fosfoproteómico.....	68
3.4.2.	Asignación de péptidos a espectros.....	69
3.4.3.	Análisis global de calidad de los fosfopéptidos.....	70
3.4.3.1.	Análisis de datos crudos.....	70
3.4.3.2.	Análisis global de los péptidos fosforilados.....	73
3.4.3.3.	Análisis de residuos de aminoácidos flanqueando el sitio fosforilado.....	79
3.4.3.4.	Jerarquías funcionales de las fosfoproteínas.....	82
3.4.4.	Enriquecimiento funcional de fosfoproteínas.....	84
3.4.5.	Fosfoproteínas relacionadas a la conidiación.....	87
3.4.5.1.	Fosfoproteínas ortólogas de la conidiación en <i>P. chrysogenum</i>	87
3.4.5.2.	Análisis funcional de fosfoproteínas reguladoras de la conidiación.....	91
3.4.5.3.	Vías de señalización implicadas en la conidiación.....	94
3.4.5.3.1.	Integridad de la pared celular.....	95
3.4.5.3.2.	Septación.....	98
3.4.5.3.3.	Estrés osmótico y oxidativo.....	100
3.4.5.3.4.	Regulación del desarrollo.....	102
3.4.5.3.5.	Otras fosfoproteínas implicadas en la conidiación.....	106
3.4.5.3.6.	Efectores de Pga1 y fosforilación diferencial.....	109
3.5.	Conclusiones.....	114
Capítulo 4	“Software” Bioinformático.....	115
4.1.	NeVOMics: An Enrichment Tool for Gene Ontology and Functional Network Analysis and Visualization of Data from OMICs Technologies.....	116
5	Trabajos derivados de esta tesis:.....	133

6 ANEXO 1.....	133
7 Referencias.....	135

Lista de figuras

Fig. 1. Modelo del sistema de señalización de las proteínas G heterotriméricas.....	4
Fig. 2. Estructura de la subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas.....	6
Fig. 3. Identidad entre subunidades G α I en hongos filamentosos.....	8
Fig. 4. Tecnologías “Ómicas” y sus enfoques.....	32
Fig. 5. Aplicaciones de la bioinformática y análisis de datos.....	34
Fig. 6. Construcción del plásmido pPga1Q204Lp con la mutación Q204L en el gen <i>pga1</i>	47
Fig. 7. Fenotipos y selección de transformantes.....	49
Fig. 8. Efecto de Pga1 sobre la producción de biomasa en medio sólido.....	51
Fig. 9. Tasa de crecimiento radial en diferentes medios de cultivo.....	53
Fig. 10. Conidiación en <i>P. chrysogenum</i>	57
Fig. 11. Regulación de los niveles intracelulares de cAMP en <i>P. chrysogenum</i>	59
Fig. 12. Flujo de trabajo general del análisis fosfoproteómico.....	69
Fig. 13. Evaluación global de la calidad de los datos MS1 y MS2.....	72
Fig. 14. Depuración y calidad de los datos después de aplicar un FDR del 1%.....	75
Fig. 15. Fosforilación global en <i>P. chrysogenum</i>	78
Fig. 16. Identificación de motivos de fosforilación.....	81
Fig. 17. Identificación de jerarquías funcionales.....	84
Fig. 18. Análisis global de enriquecimiento funcional.....	86
Fig. 19. Identificación de proteínas ortólogas implicadas en la conidiación.....	90
Fig. 20. Análisis funcional de fosfoproteínas implicadas en la conidiación.....	94
Fig. 21. Vías de señalización implicadas en la conidiación de <i>P. chrysogenum</i>	108
Fig. 22. Efectores de Pga1.....	113
Fig. 23. Interfaz gráfica del programa bioinformático NeVOmics.....	117

Capítulo 1

Marco teórico

1.1. Transducción de señales mediada por proteínas G heterotriméricas

Todas las células poseen vías complejas de señalización que les permiten responder eficazmente a diferentes condiciones ambientales y preservar su supervivencia. Estas vías de señalización comprenden dos principales grupos dependiendo de cómo son activadas. En el primer grupo la mayoría de las señales se activan por estímulos externos de tal forma que transfieren información desde la superficie hacia el interior de la célula activando múltiples mecanismos de respuesta. Por otra parte, en el segundo grupo la señalización ocurre dentro de la célula, y se refleja en la biosíntesis de mensajeros metabólicos formados como consecuencia de respuestas intracelulares. Toda esta información extracelular es interpretada, descodificada y transmitida hacia el interior de la célula ya sea por múltiples interacciones macromoleculares o por elementos difusibles conocidos como mensajeros secundarios, por ejemplo, el adenosin monofosfato cíclico ("*Adenosine-3'5'-cyclic monophosphate: cAMP*") y el calcio (Ca^{2+}), entre otros [1].

Se han propuesto varios mecanismos que intentan explicar con detalle aspectos moleculares sobre las respuestas asociadas a las condiciones ambientales, y uno de estos mecanismos es la vía de señalización regulada por proteínas G heterotriméricas ("*Heterotrimeric G proteins*"). Este tipo de proteínas, por su localización en la cara interna de las membranas permite procesar señales provenientes del exterior y desencadenar respuestas específicas en la célula.

Existe un gran número de proteínas de unión a guanosin trifosfato ("*Guanosine Triphosphate: GTP*") implicadas en la señalización celular, las cuales usualmente son denominadas proteínas G ("*G proteins*") por su capacidad para unir GTP. Estas proteínas G poseen una actividad enzimática intrínseca denominada GTPasa por su capacidad de hidrolizar GTP y convertirlo en guanosin difosfato ("*Guanosine diphosphate: GDP*") [2]. Las proteínas G se inactivan cuando tienen unido GDP, pero se activan cuando intercambian GDP por GTP y son capaces de transferir señales hasta que su actividad endógena GTPasa hidroliza GTP a GDP y se reestablece el ciclo inactivo [3].

Hay dos grupos de proteínas G, las proteínas G monoméricas ("*Small G proteins*") y las proteínas G heterotriméricas. Las proteínas G monoméricas consisten en una única unidad polipeptídica de alrededor de 200 residuos de aminoácidos, y entre sus funciones están la regulación del tráfico vesicular, la reorganización del citoesqueleto y el transporte núcleo-citoplasma, entre otras [4]. Por otro lado, las proteínas G heterotriméricas regulan

gran parte de la comunicación intracelular en conjunto con receptores acoplados a proteínas G (“*G-protein-coupled receptors: GPCRs*”). Las proteínas G heterotriméricas se componen de tres subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, las cuales presentan varias modificaciones postraduccionales, principalmente lipídicas (palmitoilación, miristilación y prenilación), permitiendo el anclaje a las membranas e interacción entre los monómeros [4, 5].

El ciclo funcional de las proteínas G heterotriméricas presenta dos estados importantes, uno cuando el heterotrímero se encuentra asociado (estado inactivo) y el otro cuando está disociado (estado activo) [6]. Este ciclo es regulado por dos tipos de factores, los primeros son agonistas llamados factores de intercambio de nucleótidos de guanina (“*guanine nucleotide exchange factors: GEFs*”) incluyendo a los receptores GPCR, los cuales provocan el intercambio de GTP por GDP en la subunidad $G\alpha$, y a las proteínas RIC8, las cuales regulan positivamente a la subunidad $G\alpha$ [7]. Los segundos son antagonistas, llamados proteínas activadoras de GTPasas (“*GTPase-activating proteins: GAPs*”) incluyendo a las proteínas reguladoras de señal de proteína G (“*Regulator of G Protein Signaling: RGS*”), las cuales estimulan la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$ y de esta forma inactivan la vía de señalización [8].

El ciclo funcional empieza cuando se activa un receptor GPCR, provocando un cambio conformacional de la subunidad $G\alpha$ que ocasiona un intercambio de GDP por GTP, a consecuencia del cual se disocia la subunidad $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$ [6], quedando de esta forma ambos componentes activos para regular la actividad de enzimas efectoras, incluyendo la adenilato ciclasa, fosfolipasa C y canales iónicos, entre otros. Este proceso de señalización se detiene por una actividad GTPasa endógena de la subunidad $G\alpha$ (**Fig. 1**). Sin embargo, esta actividad GTPasa puede ser acelerada por proteínas RGS, provocando la hidrólisis de GTP y la formación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ inactivo [3].

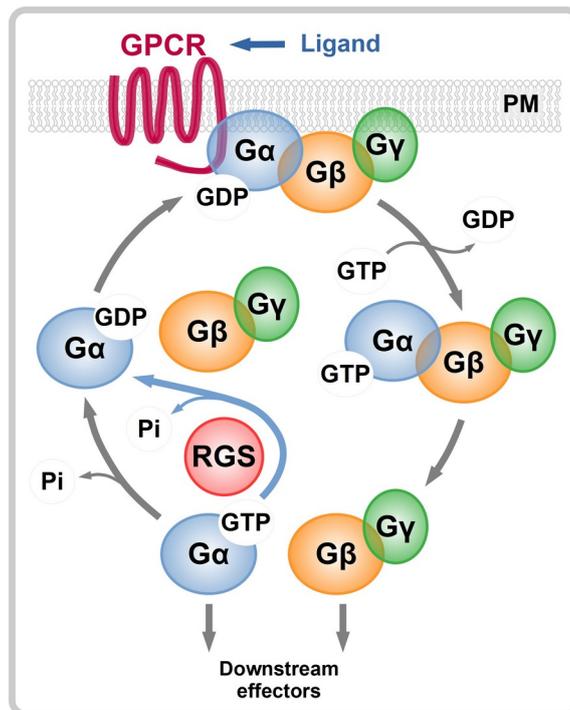


Fig. 1. Modelo del sistema de señalización de las proteínas G heterotriméricas.

La figura muestra un ciclo normal de activación/inactivación de las proteínas G heterotriméricas. Un ligando se une a un GPCR provocando un intercambio de GDP por GTP en la subunidad Gα y su disociación del heterodímero Gβγ. Ambos, Gα y Gβγ, pueden regular efectores corriente abajo (“downstream”). La hidrólisis de GTP resulta en la reasociación de Gα-GDP con el heterodímero Gβγ completándose el ciclo. Las proteínas RGS aceleran la tasa de hidrólisis de GTP por la subunidad Gα. Figura modificada de [9].

1.1.1. Subunidad Gα de las proteínas G heterotriméricas.

En mamíferos se han identificado más de 20 diferentes subunidades Gα, las cuales corresponden a los productos de 16 genes. Estas subunidades Gα se han dividido en cuatro clases con base en la similitud de su secuencia primaria: Gα_s, Gα_i, Gα_q y Gα₁₂ [4]. Los miembros de la familia de Gα_i (Gα_{i1}, Gα_{i2} y Gα_{i3}) generalmente se clasifican por su capacidad de inhibir la adenilato ciclasa (“*Adenylyl cyclase: AC*”), y controlar los niveles de cAMP intracelular [10]. Además, la familia de proteínas Gα_i (Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gα_{oA}, Gα_{oB}, Gα_{t1}, Gα_{t2}, Gα_z) presentan un sitio susceptible a la ADP-ribosilación en el extremo C-terminal, proceso catalizado por una toxina producida por la bacteria *Bordetella pertussis* [10].

Estructuralmente todas las subunidades Gα tienen dos dominios, un dominio GTPasa endógeno que hidroliza GTP, y un dominio helicoidal único que encierra el GTP en el núcleo de la proteína [11, 12].

El dominio GTPasa es estructuralmente homólogo al de la familia de proteínas G monoméricas, y está compuesto de seis hojas β rodeadas por cinco hélices α . Este dominio tiene cinco cajas o loops (G-1 a G-5) altamente conservados, los cuales conforman el sitio de unión de GTP (**Fig. 2A y B**). El loop de unión a GTP (P-loop o caja G-1), con una secuencia consenso GXXXXGK(S/T) (**GAGESGKS** para $G_{i\alpha}$ de bovino) conecta la hoja $\beta 1$ a la hélice $\alpha 1$, e interacciona con los fosfatos α y β del GTP. La caja G-2 está localizada en la región N-terminal de la hoja $\beta 2$ (entre la hélice $\alpha 1$ y hoja $\beta 2$), contiene un sitio de unión para el cofactor Mg^{2+} y tiene una secuencia consenso RVKITGI para $G_{i\alpha}$ de bovino. La caja G-3 con la secuencia consenso DXXG (MF**DVGGQR** para $G_{i\alpha}$ de bovino) en el N-terminal de la hélice $\alpha 2$ (entre la hoja $\beta 3$ y hélice $\alpha 2$) conecta los sitios de unión para Mg^{2+} y para el fosfato γ del GTP. El loop G-4 (entre la hoja $\beta 5$ y la hélice $\alpha 4$) con la secuencia conservada NKXD (FL**NKKD** para $G_{i\alpha}$ de bovino) reconoce el anillo de guanina. La caja G-5 con la secuencia consenso [T/G][C/S]A (THFT**CAT** para $G_{i\alpha}$ de bovino), se localiza entre la hoja $\beta 6$ y la hélice $\alpha 5$, y estabiliza a la guanina [4, 5]. El dominio GTPasa también tiene tres loops flexibles cerca del sitio de unión al fosfato γ (llamados “switches” I, II y III), los cuales son conformacionalmente sensibles a la unión de GDP y GTP γ S (un análogo no hidrolizable de GTP usado para estudios de conformación e interacciones moleculares de G_{α} activas). El dominio GTPasa posee sitios de unión (“switches” I y II) para el dímero $G\beta\gamma$, receptores helicoidales y proteínas efectoras corriente abajo [13]. Por otro lado, el dominio helicoidal está constituido de seis hélices α envueltas, las cuales forman una cubierta en la cavidad del sitio de unión a nucleótido (**Fig. 2A y B**). El dominio helicoidal incluye dos funciones importantes: incrementa la afinidad de G_{α} por el nucleótido de guanina, e incrementa la actividad hidrolítica de la proteína [5, 13].

Como molécula señalizadora, la subunidad G_{α} interactúa con membranas celulares, con el dímero $G\beta\gamma$, receptores GPCR, proteínas RGS, enzimas y canales iónicos. Esta interacción puede verse afectada por mutaciones dominantes puntuales que ocurren principalmente en las cajas G1 y G3 (“switch” II) de la subunidad G_{α} (**Fig. 2C**). Se han identificado varias mutaciones adicionales que afectan a la unión del nucleótido de guanina [8].

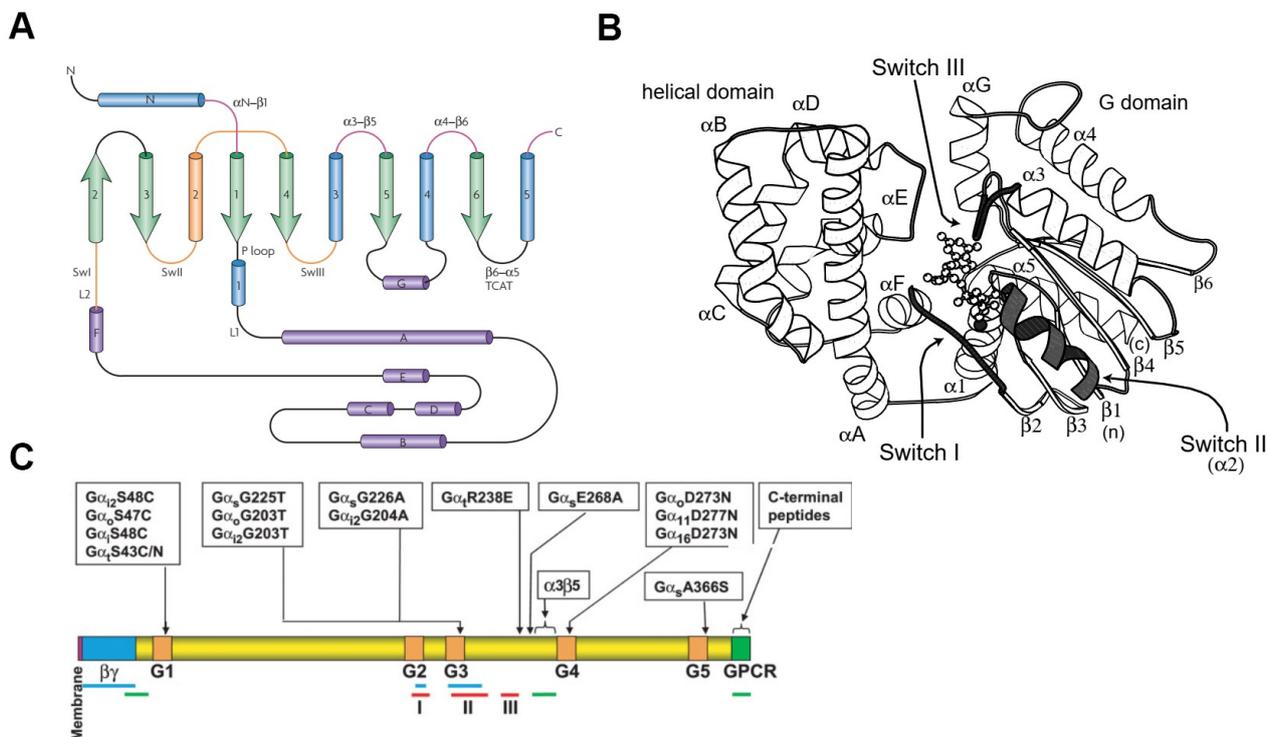


Fig. 2. Estructura de la subunidad Gα de las proteínas G heterotriméricas.

(A) Estructura secundaria de la subunidad Gα. Los cilindros representan hélices-α y las flechas hojas-β. Las hélices-α del dominio helicoidal están nombradas con siete letras (A - G, cilindros color púrpura). Las uniones 1 y 2 (L1 y L2) conectan al dominio helicoidal y el dominio GTPasa. También se muestran las regiones “switch” (naranja) y los sitios de contacto con el receptor GPCR (rosa). El motivo TCAT de unión al anillo de guanina se encuentra en el “loop” β6-α5 opuesto a la helice-α5. El “loop” (P-loop) de unión a fosfato de nucleótido se localiza entre la hoja- β1 y la hélice-α1. La figura fue tomada de [5].

(B) Estructura terciaria de la subunidad Gα_{i1}. Localización de regiones estructurales en la subunidad Gα_{i1} de mamíferos. Cada elemento descrito en el inciso A se muestra en esta estructura terciaria. La figura fue tomada de [4].

(C) Mapa lineal de la subunidad Gα. Las cajas y líneas coloreadas representan diferentes regiones funcionales de la subunidad Gα. La figura también muestra mutaciones puntuales que dan origen a fenotipos dominantes en varios organismos eucariotas. La figura fue tomada de [8].

1.1.2. Proteínas G heterotriméricas en hongos filamentosos.

Las proteínas G heterotriméricas regulan varios procesos fundamentales en los hongos filamentosos. Esta regulación puede originarse a partir de respuestas a señales intra o extracelulares, señales que son percibidas por los receptores GPCR y transferidas a proteínas G heterotriméricas, las cuales son disociadas para activar toda una compleja vía de señalización.

En hongos filamentosos se han encontrado tres subgrupos (I, II y III) de subunidades Gα [9, 14]. Esta clasificación fue establecida por similitud de secuencia entre subunidades

G α identificadas en algunos hongos filamentosos, y por identidad estructural con subunidades G α de mamíferos, las cuales incluyen secuencias variables de reconocimiento a otras moléculas [14].

Las subunidades G α de los subgrupos I (**G α I**) y III (**G α III**) se relacionan con las subunidades de las clases G α_i y G α_s de mamíferos, las cuales inhiben y estimulan la actividad de la adenilato ciclase, respectivamente, mientras que las del subgrupo II no muestran correspondencia con alguna subunidad G α de mamíferos [14], y por ello es catalogada como específica de hongos (“*fungal-specific*”) [15]. Las subunidades G α I en todos los hongos filamentosos presentan alta identidad en su secuencia. Este subgrupo presenta un sitio de N-miristilación (MGXXXS) en su extremo N-terminal (donde M representa un residuo de metionina, G representa un residuo de glicina y X representa cualquier aminoácido) el cual mejora la asociación de la proteína G α con el dímero G $\beta\gamma$ y es requerido para unirse a la membrana [16]. También contiene un sitio para ADP ribosilación (CAAX) por la toxina de *B. pertussis* en su extremo C-terminal (donde C representa un residuo de cisteína y A representa algún residuo alifático). La ADP-ribosilación se lleva a cabo por una ADP-ribosiltransferasa producida por *B. pertussis*, la toxina cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde un NAD (dinucleótido de nicotinamida-adenina) a las proteínas de unión a nucleótidos de guanina, que conduce a la separación de G α de su receptor, evitando así la activación de la señal mediada por el receptor de las proteínas G [9]. La ADP-ribosilación puede ser inhibida por luz azul y GTP; la luz azul mejora la unión de GTP a las membranas en el hongo filamentoso *Coprinus congregatus* [17]. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado una S-palmitoilación en la cisteína 3, mientras que en hongos filamentosos no se encuentra esta modificación [18]. Las subunidades G α del subgrupo II (**G α II**) no siguen estrictamente el patrón del sitio de miristilación (MGXXXS) en su extremo N-terminal, sólo algunos hongos conservan este motivo, y por otro lado carece de un sitio para ADP ribosilación (CAAX) en su extremo C-terminal. Las subunidades G α III, al igual que G α I presentan un sitio de miristoilación (MGXXXS) en su extremo N-terminal, pero carece de un sitio para ADP ribosilación (CAAX) en su extremo C-terminal.

Los primeros estudios de G α I mostraron características funcionales y estructurales similares a las de la superfamilia G α_i de mamíferos [19]. Hasta la fecha, se han realizado algunos estudios funcionales de la subunidad G α I en varios hongos filamentosos del “*phylum*” Ascomycota (**Anexo 1, Tabla 1**). Cabe mencionar que este grupo de hongos

filamentosos presenta subunidades Gal con más del 88% de identidad en su secuencia (Fig. 3). El alto grado de conservación de las subunidades Gal se debe posiblemente al papel esencial que juegan estas proteínas en la regulación de procesos tan importantes como el crecimiento vegetativo, conidiación, metabolismo secundario y patogenicidad [20].

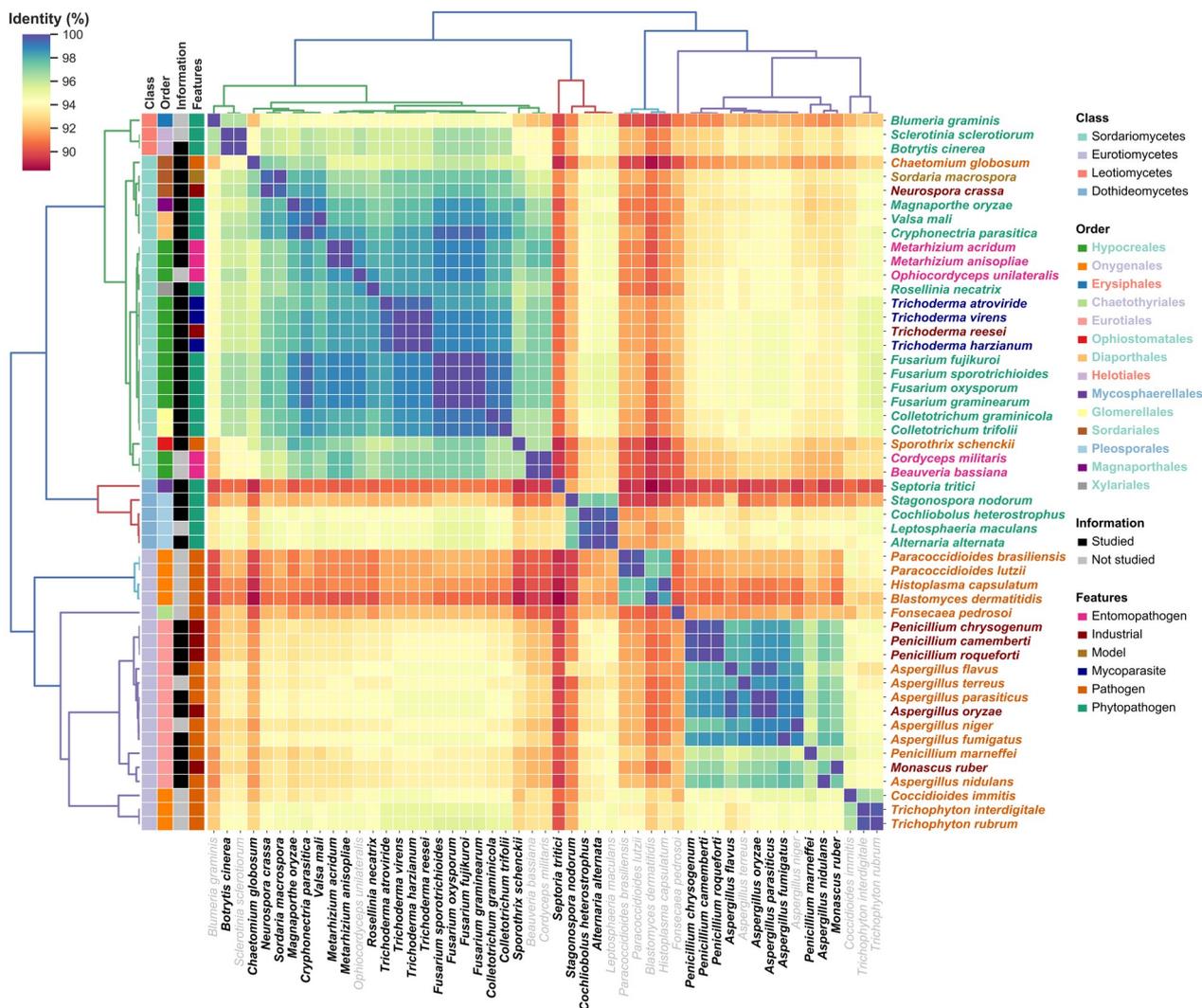


Fig. 3. Identidad entre subunidades Gal en hongos filamentosos.

El *heatmap* muestra el grado de conservación entre subunidades Gal de 51 hongos filamentosos y está agrupado por correlaciones de acuerdo a un análisis de distancias entre pares. La escala de color representa el porcentaje (%) de identidad obtenido por Blastp (BLAST v2.8.1) usando un Evalúe de 1E-6. Las anotaciones agregadas al *heatmap* corresponden a la Clase y Orden de los hongos filamentosos, hongos estudiados (subunidades Gal) y características generales. El color de letra de los órdenes se corresponde con la Clase a la que pertenecen. En 16 hongos filamentosos no hay estudios de las proteínas G heterotriméricas, sin embargo, fueron incluidos debido a su impacto en la salud humana [21, 22], y en plantas [23].

1.2. Mutación Q204L en la subunidad G α i: su origen

Los primeros reportes sobre esta mutación se remontan a los años 80s. En 1983 se identificó la forma activa de la proteína H-Ras (p21ras) en la línea celular derivada de carcinoma de pulmón humano (Hs242), la cual contiene una mutación en la posición 61, codificando una leucina (“*Leucine: L*”) en lugar de glutamina (“*Glutamine: Q*”) [24, 25]. *HRAS* es uno de los tres genes *RAS* (*HRAS*, *KRAS* y *NRAS*), de una familia de oncogenes mutados con mayor frecuencia en varios tipos de cáncer (hematopoiético/linfoide, colorrectal, pulmón, próstata, piel, tiroides y tracto urinario) [26]. Un análisis funcional con H-Ras publicado en 1986 demostró que la sustitución de la glutamina 61 con 17 aminoácidos diferentes reduce la actividad GTPasa hasta 10 veces con respecto a H-Ras normal [27]. Por otro lado, mientras se desarrollaban estudios en las proteínas Ras, también se desarrollaban estudios de las proteínas G heterotriméricas. Los primeros estudios daban a conocer los componentes funcionales de este complejo heterotrimérico y las bases moleculares de su funcionamiento [28, 29, 30]. Sabiendo que las proteínas Ras y la subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas compartían actividad GTPasa, se identificaron mutaciones somáticas que inhibían la misma actividad en subunidades G α de humanos, lo que daba como resultado una activación constitutiva de la proteína G y, en consecuencia, la activación de adenilato ciclasa [31, 32, 33, 34]. Particularmente, en subunidades G α_s y G α_i se identificaron mutaciones asociadas a tumores endocrinos, sugiriendo que varios tumores humanos pueden albergar mutaciones oncogénicas en subunidades G α de proteínas G heterotriméricas [35].

La mutación Q204L en G α_{i1} de humanos fue estudiada en profundidad por dos grupos en 1994 [11, 36], demostrando que el residuo Q204 es esencial para la actividad catalítica. Estos estudios revelaron que Q204 estabiliza la carga negativa del fosfato y en el estado de transición y orienta el ataque nucleofílico de una molécula de agua [11, 36, 37]. El residuo Q204 en G α_i de humanos, equivalente a Q61 en p21ras, se localiza en la caja G-3 (MFDVGGQ₂₀₄R), en el extremo N-terminal de la hélice α_2 (entre hoja β_3 y hélice α_2), cerca del “*switch*” II (**Fig. 2A y B**). Un estudio posterior reveló que la mutación Q204L en G α_{i1} es insensible al efecto de la proteína RGS4, siendo esta última incapaz de restaurar la actividad GTPasa en G α_{i1} , esto posiblemente debido a una remodelación del dominio catalítico asociado con la función de RGS4 [38]. En este contexto, se abordó un estudio interesante que demostró el efecto de la mutación Q61L (equivalente a Q204L) en la

actividad GTPasa de proteínas Ras. Este estudio consistió en la transfección de fibroblastos (NIH 3T3) de ratón e inyección de células transfectadas en ratones nu/nu, con un alelo dominante del gen *CT-ras* (*CT-ras*^{Q66L}) de *C. trifolii*. Los resultados mostraron por inmunoblot que el alelo dominante provoca la sobreexpresión de *CT-ras*^{Q66L} en células NIH 3T3 y la formación de tumores visibles en ratones nu/nu. Este estudio demostró que la proteína CT-Ras de *C. trifolii* funciona como un auténtico oncogén en células NIH 3T3 y en ratones nu/nu, debido a la activación constitutiva ocasionada por el cambio de glutamina por leucina en la posición 66 dentro del dominio GTPasa [39], funcionalmente equivalente a Q61L y Q204L.

Los dos primeros trabajos en los cuales se estudió la mutación Q204L en hongos filamentosos fueron publicados en 1999, con subunidades G α de los hongos filamentosos *A. nidulans* [40] y *N. crassa* [41]. Posteriormente se desarrollaron otros estudios en varios hongos filamentosos, como fue descrito anteriormente en la sección [1.2](#). En 2012 se publicó un trabajo relevante sobre el efecto de la mutación Q204L en *M. oryzae* [42], en el que pusieron en duda el efecto de otra mutación dominante, la G42R, que se venía estudiando en hongos filamentosos. En este estudio se destacó la consistencia en el efecto provocado por la mutación Q204L (constitutivamente activa) sobre la G42R (parcialmente constitutivamente activa), a pesar de contarse ya con varias publicaciones realizadas hasta ese momento (como se describió detalladamente en la sección [1.2](#)). Además, otro grupo en 2007 [15], propuso que la mutación G42R retenía residuos de actividad GTPasa, mientras que en Q204L la actividad se suprimía totalmente. Hasta este momento se han estudiado siete mutaciones puntuales (G42R, R178L, R178C, G183S, G203R, Q204L y R205H) en la subunidad G α en hongos filamentosos; sin embargo, el número de trabajos en los que se usa específicamente la mutación Q204L son limitados.

1.3. Revisión: Subunidad G α en hongos filamentosos de la división Ascomycota

Los hongos filamentosos tienen gran importancia en varias áreas relacionadas con el ser humano, incluyendo la industria alimenticia [43], farmacéutica [44], agrícola [45], médica [46] e investigación científica [47]. Varias especies de estos hongos tienen numerosos usos industriales [48], sin embargo, algunos presentan implicaciones médicas importantes [49, 50]. Tal es el caso de especies patógenas, como *Aspergillus niger*,

Aspergillus flavus, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, y *Aspergillus terreus*, entre otras, las cuales son responsables de varias infecciones en humanos y animales [21, 22] [51]. Otro grupo de hongos con un impacto global importante son los fitopatógenos, que incluye a especies como *Magnaporthe grisea* y *Botrytis cinerea*, entre otras, las cuales infectan cultivos agrícolas causando pérdidas millonarias [52]. Por su parte, especies del género *Trichoderma* se usan como agentes de biocontrol frente a fitopatógenos. Un grupo más de hongos incluye a patógenos de insectos como *Metarhizium anisopliae* y *Metarhizium acridum*, los cuales juegan un papel importante en el control de poblaciones de insectos, además de usarse como una alternativa al uso de pesticidas químicos [53]. A partir de estos antecedentes han derivado múltiples investigaciones con el fin de entender los mecanismos de patogenicidad, y regular o contrarrestar sus efectos. La manipulación de la vía de las proteínas G heterotriméricas ha sido uno de los caminos para entender estos procesos, sin embargo, los estudios aún son limitados, y es por tal razón que las investigaciones en los hongos filamentosos son de gran relevancia (**Fig. 3**).

1.3.1. *Neurospora crassa*

Neurospora crassa es un hongo filamentoso con algunas aplicaciones biotecnológicas, incluyendo la producción de enzimas, ácidos orgánicos, producción de metabolitos secundarios, así como la producción de antibióticos o drogas inmunosupresoras [48]. Además, *N. crassa* es un organismo modelo ampliamente usado en múltiples enfoques y aplicaciones de la investigación científica; con una importancia capital en estudios pioneros de genética clásica y recombinación.

El primer estudio reportado sobre subunidad Gal se realizó en el hongo filamentoso *N. crassa*, en el cual se identificó y caracterizó el gen *gna-1* el cual codifica la subunidad G α GNA-1 [19]. En términos generales, la subunidad G α GNA-1 tiene efectos importantes en el ciclo sexual y asexual del hongo. En primer lugar, la delección de *gna-1* provocó un alto contenido de carotenoides, una reducción de los niveles de cAMP, alteró la morfología de las colonias, redujo la tasa de crecimiento vegetativo hasta 2.8 veces menos que la cepa parental, provocó una hipóramificación del micelio, y finalmente una reducción significativa en la producción de biomasa en medio sólido, mientras que en medio líquido la producción de biomasa no se vio afectada [54, 41, 55, 56]. La delección también tuvo un efecto negativo en la resistencia a estrés osmótico y un efecto positivo en la resistencia al estrés

térmico y oxidativo [19, 41]. Por otro lado, la delección también tuvo efectos en el ciclo sexual provocando la producción de protoperitecios pequeños e infértiles cuando se cultivaba el hongo en medio con baja fuente de nitrógeno [54, 57, 58]. Otros estudios funcionales en *N. crassa* con alelos dominantes de activación constitutiva de *gna-1* mostraron efectos opuestos a lo observado con la delección de *gna-1*. Las mutaciones dominantes R178C (*gna-1*^{R178C}) y Q204L (*gna-1*^{Q204L}) provocaron un incremento de los niveles de cAMP intracelular y abundante micelio aéreo, con respecto a la cepa parental. Por otro lado, estas mutaciones provocaron una reducida conidiación y una disminución de los niveles de carotenoides, asociada esta última con una mayor sensibilidad a estrés térmico y oxidativo [59, 41].

Sordaria macrospora es otro hongo filamentoso usado como organismo modelo, y en el cual también se ha estudiado su subunidad G α GSA1. Aunque el estudio de la subunidad G α no fue en profundidad se demostró que la delección de *gsa1* provoca una reducción de la tasa de crecimiento y defectos en el desarrollo sexual, reduciendo la fertilidad y el número de peritecios [60].

1.3.2. *Aspergillus* spp.

Aspergillus nidulans es uno de los hongos filamentosos ampliamente usado en sistemas de expresión heteróloga [61], y además es globalmente conocido por ser uno de los microorganismos modelo para estudios genéticos [62]. En *A. nidulans* se identificó el gen *fadA*, el cual codifica la subunidad G α homóloga a *gna-1* de *N. crassa*. La delección de *fadA* provocó un crecimiento reducido, sin afectar a la esporulación en medio sólido, mientras que en medio líquido no logró generar esporas [63]. La delección de *fadA* presenta un comportamiento similar al alelo dominante *fadA*^{G203R}. La mutación dominante G203R o de inactivación constitutiva, provocó una esporulación temprana respecto a la cepa parental y la cepa con la delección de *fadA* en medio sólido y líquido, y un efecto similar a *fadA*^{G203R} fue observado con el alelo dominante *fadA*^{R205H} [40]. Funcionalmente la mutación dominante G203R secuestra el dímero G $\beta\gamma$ causando una híperesporulación, mientras que la delección deja un dímero G $\beta\gamma$ libre. Por ello, se concluyó que la vía de las proteínas G heterotriméricas con la subunidad G α FadA regula negativamente la esporulación [63] [64]. Estos estudios fueron apoyados con varios alelos de activación constitutiva, *fadA*^{G42R}, *fadA*^{R178L}, *fadA*^{R178C}, *fadA*^{G183S} y *fadA*^{Q204L}, los cuales presentaron un fenotipo similar a las

mutantes de pérdida de función (“*loss-of-function*”) del gen *flbA* ($\Delta flbA$), el cual codifica una RGS [63, 65, 40]. Estas mutaciones dominantes provocaron un efecto negativo sobre la esporulación asexual y la biosíntesis de la micotoxina esterigmatocistina (“*sterigmatocystin: ST*”) [66], y además provocaron un crecimiento descontrolado y producción abundante de micelio aéreo (“*fluffy*”), seguido de un fenotipo autolítico [65]. En este punto cabe señalar, que no todos los metabolitos secundarios producidos en *A. nidulans* se regulan negativamente por FadA, ya que otro estudio demostró que mientras FadA regula negativamente la producción de esterigmatocistina, por otro lado se da una regulación positiva en genes del cluster biosintético de penicilina, obteniéndose una producción más elevada de este antibiótico [67]. Este dato demuestra que FadA tiene papeles contrastantes en la regulación de los metabolitos secundarios, incluso dentro de una misma especie (algo que se ha observado posteriormente en varias especies de hongos filamentosos).

Se ha estudiado también el papel de la subunidad G α FadA en la regulación de los niveles de cAMP y la actividad de proteína cinasa dependiente de cAMP (“*cAMP-dependent protein kinase: PKA*”). Se demostró que FadA incrementa la actividad de PKA y que la esporulación es regulada por la vía cAMP/PKA. Sin embargo, por ensayos de complementación se concluyó que la subunidad G α FadA también regula la esporulación y la producción de ST por un mecanismo independiente de cAMP/PKA [68].

Además de la micotoxina ST, la aflatoxina (“*Aflatoxin: AF*”) es otro de los principales contaminantes de cultivos y semillas, y representa un riesgo para la salud [69]. La micotoxina AF es producida por *A. flavus*, una especie del género *Aspergillus*, que es la segunda causa principal de aspergilosis invasiva e infección superficial [70]. En *A. flavus* se intentó estudiar el papel de la subunidad G α AFLA_018340, ortóloga de FadA, con el fin de obtener conocimientos sobre los mecanismos que regulan la producción de AF y la virulencia. Sin embargo, no fue posible realizar la delección de esta subunidad, lo cual llevó a los investigadores a proponer que AFLA_018340 podría estar jugando un papel esencial en el hongo, que haría inviables las mutantes con delecciones en este gen [71]. Por otro lado, Calvo *et al.* [72] lograron introducir el alelo dominante heterólogo *fadA*^{G42R} (de *A. nidulans*) en *A. flavus* observando el mismo fenotipo que en *A. nidulans*: una conidiación reducida y bloqueo en la producción de la micotoxina AF.

Aspergillus parasiticus, al igual que *A. flavus*, es otra especie de *Aspergillus* capaz de producir la micotoxina AF y contaminar alimentos y semillas [73]. En *A. parasiticus* se

estudió el alelo dominante heterólogo *fadA*^{G42R} (de *A. nidulans*) demostrando que se reduce la conidiación y que los niveles de cAMP se incrementan. Por otro lado, también se demostró que la biosíntesis de AF y la conidiación es regulada por una vía alterna a FadA/cAMP/PKA [74].

Aspergillus fumigatus es un patógeno oportunista con mayor grado de virulencia que *A. flavus*. *A. fumigatus* produce grandes cantidades de conidios, las cuales son el agente causal de la aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos [75]. En *A. fumigatus* se han identificado reguladores clave de la conidiación incluyendo GpaA (Gα), AfFlbA (RGS), AfFluG y AfBrlA, previamente estudiados en *A. nidulans* (FadA, FlbA, FluG y BrlA). Se demostró que el alelo dominante *gpaA*^{Q204L}, de activación constitutiva, reduce la conidiación, presenta un fenotipo autolítico y estimula el crecimiento vegetativo, mientras que *gpaA*^{G203R}, de inactivación constitutiva, estimula la conidiación. Aunque no se ha estudiado directamente la relación entre la subunidad Gal y la producción de la micotoxina gliotoxina (“gliotoxin: GT”) producida por *A. fumigatus*, estudios indirectos podrían dar idea del papel de Gα sobre la producción de GT. Se ha demostrado que las proteínas RGS AfFlbA, GprK, y Rax1 juegan un papel importante en la regulación del desarrollo asexual, el metabolismo secundario y la respuesta a estrés [76, 77]. Mediante una delección de *AfflbA* (Afu2g11180) el regulador negativo directo de GpaA, se demostró que se reduce la producción de GT [78]. Por otro lado, se relacionó a Gα con el estrés oxidativo: el alelo dominante de activación constitutiva *gpaA*^{Q204L} provocó mayor tolerancia a H₂O₂, mostrando un crecimiento radial 1.6 veces mayor que la cepa parental. La activación constitutiva de GpaA y la delección de *AfflbA* provocaron la sobreexpresión de los genes *catA*, *cat1* y *cat2*, los cuales codifican para tres catalasas [79].

Los conidios de *A. oryzae* son ampliamente usados en la industria alimenticia como iniciadores (“starters”) en la primera etapa de la fermentación para digerir aditivos [80]. Debido a que, industrialmente, la producción de conidios en *A. oryzae* y otros hongos filamentosos es importante, se realizó un estudio sobre la regulación de la conidiación orientado hacia una de las principales vías reguladoras de la conidiogénesis, la vía de las proteínas G heterotriméricas [81]. Como se ha estudiado en otras especies de *Aspergillus*, la subunidad Gal tiene un papel en la regulación de la conidiación en hongos filamentosos. En *A. oryzae* fueron estudiados los alelos *AorfadA*^{R178L}, *AorfadA*^{Q204L} y *AorfadA*^{G42R}, los cuales mostraron fenotipos iguales a los observados en *A. nidulans*. Con estos estudios se demostró que la vía de señalización mediada por FadA suprime la conidiación en *A. oryzae*

como ocurre en *A. nidulans*, además, la activación constitutiva de AorfadA en *A. oryzae* tiene un papel esencial en la proliferación [81].

1.3.3. *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* comprende varias especies de hongos filamentosos fitopatógenos responsables de la infección y contaminación de cultivos de cereales con pérdidas millonarias en todo el mundo [82]. Los miembros de este género son conocidos por producir una amplia variedad de micotoxinas [83, 84] y pigmentos [85] bajo condiciones definidas. Otro dato alarmante sobre especies de *Fusarium*, es la producción de la micotoxina zearalenona ("*Zearalenone: ZEA*"), un compuesto estrogénico capaz de causar abortos y otras complicaciones reproductivas en cerdos, caballos, ovinos y bovinos [86] [87]. El estudio de las proteínas G heterotriméricas en especies de *Fusarium* ha sido una alternativa para comprender los mecanismos que regulan la producción de metabolitos secundarios, incluyendo las micotoxinas.

En *Fusarium oxysporum* se identificó el gen *fga1*, el cual codifica para una subunidad Gal. La delección de *fga1* provocó defectos en la morfología de las colonias, conidiación reducida (menos del 50% respecto a la cepa parental), disminución de la patogenicidad, mayor resistencia a estrés térmico (45°C) y bajos niveles de cAMP [88, 89]. El crecimiento vegetativo y la expresión de *fga1* también fueron afectados con la delección de *fga1*, sin embargo, se determinó que el efecto fue dependiente de la cepa [90].

Fusarium fujikuroi produce varios metabolitos secundarios, incluyendo pigmentos como fusarrubinas ("*fusarubin*") y bikaverinas ("*bikaverin*"), y ácido giberélico ("*gibberellic acid: GA*"), una hormona que regula el crecimiento y morfogénesis en plantas [91]. La subunidad G α FfG1 de *F. fujikuroi* regula múltiples procesos. La delección de *ffg1* provoca una pigmentación roja, característica de la acumulación de fusarrubina, cuando se incuba el hongo con bajo nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno, y una reducción de la biosíntesis de bikaverina comparado con la cepa parental, lo que llevó a concluir que los genes de la biosíntesis de bikaverinas son regulados positivamente por FfG1 [92]. Con respecto a la producción de fusarrubinas, se observó que la ausencia de *ffg1* provoca una sobrerregulación de los genes biosintéticos de fusarrubina. Por otro lado, se estudió el alelo dominante de activación constitutiva *ffg1*^{G42R}, y se demostró que FfG1 regula negativamente los genes para la biosíntesis de fusarrubina y bikaverina [92].

En este contexto se puede observar nuevamente que la subunidad G α ejerce una regulación diferencial sobre algunos metabolitos secundarios. Un caso similar ocurrió en otra especie de *Fusarium*, *Fusarium sporotrichioides*, donde se observó que el alelo dominante heterólogo *fadA*^{G42R} (de *A. nidulans*) incrementó la producción de tricoteceno (“*trichothecene: TR*”) [67], una micotoxina contaminante encontrada en cultivos de cereales con un impacto económico importante [93].

Fusarium graminearum es un hongo filamentoso responsable de una enfermedad destructiva (“*Fusarium ear blight: FEB*”) que afecta a cultivos de trigo, cebada, maíz, sorgo, avena y centeno [94]. *F. graminearum*, produce varias micotoxinas incluyendo deoxinivalenol (“*deoxynivalenol: DON*”) y zearalenona (“*zearalenone: ZEA*”), las cuales presentan un importante riesgo para la salud humana y animal. Como en otras especies de *Fusarium*, en *F. graminearum* también se estudió la subunidad G α . En un estudio se demostró que la subunidad G α GzGPA1 regula negativamente la producción de las micotoxinas DON y ZEA, y tiene un ligero efecto en el crecimiento vegetativo, sugiriendo que GzGPA1 es requerida para la represión de la biosíntesis de micotoxinas [95].

1.3.4. *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. es usado industrialmente para la producción de enzimas como celulasas [96] y en la agricultura como agente de control de plagas, por su capacidad para reducir enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, incluyendo *F. oxysporum* y *Botrytis cinerea*, entre otros, gracias a su capacidad reproductiva en ambientes desfavorables [97, 98].

En *Trichoderma reesei*, se ha identificado la subunidad G α , nombrada GNA1, homóloga de *FadA* de *A. nidulans*. La delección de *gna1* tuvo un efecto negativo en la esporulación, redujo significativamente el crecimiento en oscuridad en medio líquido en presencia de glucosa o glicerol como fuente de carbono, tuvo un efecto mínimo en la morfología, sin apreciar diferencia en la tasa de extensión apical en medio sólido en presencia de luz u oscuridad constante: por su parte, y de forma contraria a lo observado en *N. crassa*, la delección de *gna1* elevó los niveles de cAMP. La delección de *gna1* no tuvo efecto significativo en la respuesta a estrés osmótico (NaCl y sorbitol) en presencia de luz u oscuridad constantes; sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo (menadiona) y en presencia de luz u oscuridad constantes, la delección de *gna1* supuso un crecimiento

acelerado. La activación constitutiva de GNA1 (*gna1*^{Q204L}) redujo la esporulación y provocó crecimiento acelerado en condiciones de estrés oxidativo y oscuridad, mientras que en presencia de luz afectó ligeramente al crecimiento. Los autores demostraron que la transcripción y actividad de GNA1 es regulada por la fuente de carbono (regulación por “*Feedback*”): en presencia de lactosa y glicerol los niveles transcripcionales son elevados, mientras en presencia de glucosa se inhiben. Al igual que la delección, *gna1*^{Q204L} no tuvo efecto significativo en la respuesta a estrés osmótico, ni en presencia de luz ni en oscuridad constantes. De forma contraria a lo reportado para la delección, no se observaron cambios en los niveles de cAMP, ni en la morfología. La producción de hidrofobinas es otro proceso dependiente de luz, en *T. reesei* se observó que la delección de *gna1* provocó la sobreexpresión de los genes *hfb1* y *hfb2* en oscuridad, mientras que *gna1*^{Q204L} no tuvo efectos significativos en la transcripción de ambos genes. En *T. reesei*, se observa claramente una fuerte regulación de la función de GNA1 por la luz, principalmente por el complejo ENVOY, un regulador clave de señales dependientes de luz, y de sus mecanismos adaptativos, teniendo efectos en la conidiación, respuesta a varios tipos de estrés, producción de celulasa e hidrofobinas. En *T. reesei* se observó que la delección de *gna1* inhibe la transcripción de la celulasa (*cbh1*) en presencia de luz, mientras que en oscuridad los niveles fueron elevados. Lo contrario ocurrió con *gna1*^{Q204L}, en la que la transcripción de *cbn1* fue inhibida en oscuridad y sobreexpresada en presencia de luz. [99] [100]. Además de la celulasa, *T. reesei* es capaz de producir enzimas degradadoras de pared celular (“*Cell Wall Degrading Enzymes: CWDEs*”), en un proceso llamado micoparasitismo. Estas enzimas incluyen a la endoquitinasa, N-acetyl- β -D-glucosaminidasa (“*N-Acetyl- β -D-glucosaminidase: NAGase*”), lipasa y fosfatasa ácida, las cuales tienen importancia industrial. En *T. reesei* se observó que *gna1*^{Q204L} induce mayor producción y actividad de CWDEs, favoreciendo el papel antagonista contra *Pythium ultimum*, mientras que la delección de *gna1* presenta menor actividad de CWDEs, reduciendo su capacidad para ejercer un papel antagonista contra *P. ultimum* [101].

Trichoderma atroviride (anteriormente, *Trichoderma harzianum*), es otra especie en la cual se ha estudiado el papel de la subunidad G α Tga1 en el proceso micoparasítico. La delección de *tga1* provocó mayor esporulación, altos niveles de cAMP, y pérdida de su capacidad micoparasitaria sobre hongos filamentosos como *Rhizoctonia solani*, *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. En estas condiciones se observó una disminución en la actividad quitinasa, y en la expresión de *nag1* y *ech42*, dos quitinasas importantes en *T. atroviride*

[102]. Por otro lado, en otro estudio se observó que la activación constitutiva de Tga1 (*Tga1*^{G203L}) redujo la conidiación y favoreció el enrollamiento, aunque los resultados de este trabajo son cuestionables [103], ya que en la posición 203 de Tga1 se encuentra un residuo de glicina y no una glutamina, la glutamina se encuentra en la posición 204.

En *Trichoderma virens*, la ausencia de la subunidad G α TgaA causó efectos importantes en el proceso de invasión contra los hongos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Se demostró que la delección de *tgaA* bloquea la ramificación en los conidios germinados, mientras que en la cepa parental son altamente ramificados. También causa la colonización y lisis de *R. solani*, sin embargo, pierde su capacidad para colonizar el esclerocio de *S. rolfsii*. Por otro lado, se observó que la ausencia de TgaA activó mecanismos que responden a la luz azul formando anillos de esporulación en la colonia [104].

1.3.5. *Penicillium* spp.

Varias especies de *Penicillium* producen compuestos de importancia médica, como antibióticos y antifúngicos, así como micotoxinas. Además tiene un amplio uso en la industria alimentaria [105, 106]. En algunas especies de este género también se han identificado las subunidades Gal, y se ha estudiado el papel que juegan las proteínas G heterotriméricas en su desarrollo.

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso usado industrialmente en la producción de penicilina [107]. En *P. chrysogenum* se identificó la subunidad G α Pga1. Hasta el momento se han estudiado dos variantes alélicas de *pga1* en esta especie, incluyendo *pga1*^{G42R} y *pga1*^{G203R}, además de la delección de *pga1*, las cuales han mostrado estar implicadas en varios mecanismos del desarrollo del hongo. La delección de *pga1* y el alelo *pga1*^{G203R} no mostraron diferencias en el crecimiento radial, sin embargo, incrementaron la producción de esporas, favoreciendo la expresión de dos reguladores centrales de la conidiación, los genes *brlA* y *wetA*. También, se observó que la delección y el alelo *pga1*^{G203R}, causaron un aumento de la resistencia al estrés térmico y oxidativo en conidios y micelio vegetativo, además de observarse un decaimiento de la germinación de conidios con respecto a la cepa parental. De forma particular, el alelo *pga1*^{G203R} provocó además defectos morfológicos en conidióforos de conidios germinados. Por otro lado, el alelo dominante *pga1*^{G42R} provocó una tasa de extensión radial reducida, redujo los niveles

de esporulación, favoreció la pigmentación en el reverso de las colonias, elevó la transcripción de los genes biosintéticos *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, genes que controlan la biosíntesis de penicilina, y finalmente incrementó los niveles de cAMP [108, 109, 110, 111], al igual que lo observado anteriormente en *A. nidulans*. Un estudio proteómico en *P. chrysogenum* mediante la técnica 2D-DIGE (“*Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis*”), permitió la identificación de varias proteínas implicadas en varios procesos posiblemente regulados por Pga1, estos procesos incluyen el metabolismo central, fosforilación oxidativa, producción de penicilina, metabolismo de purinas, el estrés oxidativo y estrés térmico [112]. Las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo fueron la catalasa R (B6H9T9) y benzoquinona reductasa (B6HS43), mientras que las relacionadas al estrés térmico fueron proteínas asociadas al plegamiento de proteínas, ortólogas de las chaperonas HSC82 (P15108) y SSA4 (P22202) de *S. cerevisiae* [113].

Penicillium roqueforti y *Penicillium camemberti* son hongos filamentosos ampliamente conocidos por su uso en la elaboración de quesos como Camembert, Roquefort y Gorgonzola [106]. Además, son también conocidos por producir micotoxinas como roquefortina C (“*roquefortine C*”), ácido micofenólico (“*mycophenolic acid: MPA*”), patulina (“*Patulin*”), ácido penicílico (“*Penicillic acid*”), isofumigaclavina A y B (“*isofumigaclavine A y B*”), además de toxina PR en *P. roqueforti* [114] y ácido ciclopiazónico (“*Cyclopiazonic acid*”) en *P. camemberti* [115]. En *P. roqueforti* se introdujo el alelo dominante heterólogo *pga1*^{G42R} de *P. chrysogenum*, y se demostró que *pga1*^{G42R} provoca la germinación de conidios en ausencia de fuente de carbono, reduce la conidiación, disminuye la respuesta a estrés osmótico y térmico, y aumenta la producción de roquefortina C, destacando el papel fundamental que tiene la subunidad G α en el desarrollo de *P. roqueforti* [116]. En *P. camemberti*, de igual modo, se introdujo el alelo dominante heterólogo *pga1*^{G42R} de *P. chrysogenum*, y se observó un comportamiento similar al de *P. roqueforti*. Sin embargo, *pga1*^{G42R} redujo la producción de ácido ciclopiazónico, en forma contraria a lo ocurrido en *P. roqueforti* donde la producción de roquefortina C fue aumentada tras el uso de ese mismo alelo. Las proteasas extracelulares producidas por *P. camemberti* juegan un papel importante en las propiedades organolépticas del queso Camembert. Relacionado con esto, se demostró que *pga1*^{G42R} reduce la actividad catalítica de las proteasas [117].

Penicillium marneffe es un patógeno oportunista capaz de alternar su crecimiento en forma filamentosa a 25°C y levaduriforme a 37°C, siendo este el principal factor de virulencia [118]. Los conidios, o agentes infecciosos, se producen durante su desarrollo

asexual, y a 37°C se activa su programa dimórfico para producir estructuras patogénicas levaduriformes. *P. marneffe* es evolutivamente distinto a la mayoría de los hongos dimórficos patógenos, y es la única especie de *Penicillium* que exhibe un crecimiento dimórfico [119]. En *P. marneffe* se identificó el gen *gasA*, homólogo a *fadA* de *A. nidulans*. Un análisis funcional reveló que el alelo dominante *gasA*^{G42R} regula ligeramente la producción de un pigmento rojo a 25°C, bloquea el crecimiento vegetativo, inhibe la transcripción del gen *brlA* y en consecuencia inhibe la conidiación. Por otra parte, la delección de *gasA* y el alelo dominante *gasA*^{G203R} de inactivación constitutiva mostraron un fenotipo conidial similar a la cepa parental, no presentaron cambios en la tasa de crecimiento radial, presentaron hifas aéreas reducidas, y mostraron una producción reducida de pigmento rojo. La delección de *gasA* bloqueó la formación de conidióforos, mientras que *gasA*^{G203R} presentó una conidiación inapropiada sin afectar la formación de conidióforos. Finalmente se concluyó que *gasA* es un regulador clave del desarrollo asexual, sin embargo, no es requerido para la formación de estructuras levaduriformes a 37°C [120, 121, 122].

1.3.6. *Magnaporthe* spp.

Magnaporthe grisea y *Magnaporthe oryzae* son responsables de infectar cultivos de arroz, trigo y cebada [123]. En *M. grisea* se identificó el gen *magB*, el cual codifica para la subunidad Gal, nombrada MAGB. La delección de *magB* causó una reducción significativa del crecimiento vegetativo, conidiación, formación de apresorio, y provocó defectos en la formación de peritecios. Además, redujo la habilidad de infectar y colonizar hojas de arroz susceptibles a infección. El alelo dominante *magB*^{G203R} de inactivación constitutiva no causó cambios fenotípicos drásticos, sin embargo, incrementó la sensibilidad de los conidios al estrés osmótico. Por otro lado, los alelos de activación constitutiva *magB*^{G42R}, *magB*^{G183S} y *magB*^{Q204L} mostraron algunos fenotipos contrarios a los observados con la delección y el alelo *magB*^{G203R}. El alelo *magB*^{G42R} causó autólisis de colonias envejecidas, defectos en la melanización de conidióforos, reducción en la reproducción sexual y asexual, reducción en la virulencia, producción de apresorios en superficies hidrolíticas e hidrofóbicas, reducción de la conidiación hasta un 95% (dependiente de medio de cultivo), conidiación descontrolada (dependiente de medio de cultivo), y formación de apresorios en superficies no inductivas con tubos germinales altamente alargados. Los alelos *magB*^{G183S} y *magB*^{Q204L}

causaron también la formación de apresorios en superficies no inductivas con tubos germinales altamente alargados y una conidiación descontrolada [15, 124, 125, 42].

En *Magnaporthe oryzae* se realizó un estudio para reevaluar la función del alelo *magB*^{G42R}, debido a que se demostró funcional y estructuralmente que el producto del alelo *magB*^{G42R} no es deficiente en su actividad GTPasa y tampoco es constitutivamente activo [42], manteniendo una actividad GTPasa residual [15]. Este efecto se vio reflejado en diferencias funcionales (morfología de conidios y patogenicidad) significativas entre las mutaciones G42R y Q204L, observándose efectos drásticos con la mutación Q204L. Además, estos resultados son consistentes como se describe en la sección [1.3](#), siendo Q204L una mutación insensible a la acción de RGS [42]. Finalmente, se llegó a la conclusión que la subunidad G α MagB controla el crecimiento vegetativo, la conidiación, la adhesión de conidios, la formación de apresorios y la patogenicidad en *M. grisea* y *M. oryzae*.

1.3.7. Otros hongos filamentosos de importancia mundial

Además de los hongos filamentosos antes mencionados, existen muchos otros hongos patógenos de plantas, que afectan a una gran variedad de cultivos [126]. Este grupo de hongos es responsable de varias enfermedades que causan enormes pérdidas económicas a nivel mundial [127, 52]. La ruta de colonización e infección de algunos hongos empieza con la formación de apresorios melanizados, una estructura infectiva capaz de penetrar la pared celular [128]. Existen varios trabajos que muestran el papel de las proteínas G heterotriméricas, principalmente de la subunidad G α I, en este tipo de hongos intentando explicar su relación con el desarrollo y la patogenicidad. Aunque el número de trabajos es limitado, las especies estudiadas pertenecen a los géneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Stagonospora*, *Cochliobolus*, *Cryphonectria*, *Alternaria*, *Valsa*, *Roselliania* y *Zymoseptoria*, incluyendo los géneros *Fusarium* y *Magnaporthe* que se describieron anteriormente (**Fig. 3**).

Por otro lado, los hongos filamentosos patógenos representan un riesgo significativo para la salud humana. Anteriormente se describieron algunos aspectos moleculares de la patogénesis y su relación con las proteínas G heterotriméricas en algunas especies patógenas para humanos del género *Aspergillus* y *P. marneffe*, incluyendo a *Monascus ruber*, aunque de este último el número de casos en humanos es limitado [129]. Sin

embargo, existen varios hongos filamentosos patógenos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecaea pedrosoi*, de los cuales no hay reportes de proteínas G heterotriméricas, particularmente de la subunidad Gal (**Fig. 3**).

1.3.7.1. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea tiene un elevado impacto económico debido a que afecta una gran variedad de plantas, sobre todo frutos, flores y tejidos verdes de más de 500 especies [130]. *B. cinerea* causa daños en la planta por diferentes mecanismos, secretando enzimas que degradan la pared celular, produciendo metabolitos fitotóxicos y estimulando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (“*Reactive Oxygen Species: ROS*”). Su proceso infectivo está regulado principalmente por MAP cinasas, por señales dependientes de cAMP, por histidinas cinasas de clase III y pequeñas GTPasas, las cuales están implicadas en el desarrollo y patogenicidad [130, 131, 132, 133]. *B. cinerea* es uno de los hongos fitopatógenos más estudiados, en el cual también se ha identificado y caracterizado la subunidad Gal. Un estudio reveló que *B. cinerea* expresa *bcg1* en etapas muy tempranas en hojas de frijol infectadas. Tras la delección de *bcg1* se altera la morfología de la colonia, no se secretan proteasas extracelulares y se reduce la patogenicidad en frijol y tomate. La delección no causa efectos en la germinación ni en la penetración; sin embargo, el proceso de infección se detiene completamente después de la formación de la primera lesión. Al adicionar cAMP al medio de cultivo no se restaura la producción de proteasas, al parecer la secreción de estas enzimas es por un mecanismo independiente de cAMP [134]. Otro estudio confirmó que la delección de *bcg1* causa germinación de conidios y penetración de hifas en hojas del hospedero, sin embargo, contrario a lo que ocurre en la cepa parental, estas mutantes detienen completamente la invasión del tejido vegetal en este paso. Por otro lado, se identificaron 22 genes diferencialmente expresados, incluyendo proteasas, enzimas del metabolismo y enzimas degradadoras de pared celular, los cuales son sobreexpresados en la cepa parental durante la infección, pero no en la cepa con la delección de *bcg1* [135]. Un estudio basado en microarreglos reveló la identificación de genes regulados y coregulados por BCG1 y calcineurina. Con este estudio se demostró por primera vez una posible conexión entre las

vías de señalización de la subunidad G α y la calcineurina. Además, también demostraron que la fosfolipasa C es un componente más de la vía de señalización dependiente de BCG1/calcineurina que regula la patogenicidad [136]. Un estudio posterior demostró que BCG1 regula varios genes implicados en la biosíntesis de toxinas que pueden actuar como factores de virulencia, incluyendo al botridial (“*botrydial*”) y ácido botcínico (“*botcininc acid*”) [137, 138].

1.3.7.2. *Colletotrichum* spp.

La subunidad Gal ha sido estudiada en al menos en dos especies de *Colletotrichum* (*C. trifolii* y *C. graminicola*), mostrando efectos en el desarrollo y la patogenicidad. *C. trifolii* y *C. graminicola* son capaces de provocar antracnosis en alfalfa y maíz, respectivamente, un tipo de mancha oscura sobre las hojas o frutos [139, 140]. Un estudio funcional con la subunidad G α , Ctg-1, identificada en *C. trifolii*, reveló que los transcritos de *ctg-1* se acumulan en conidios en estado germinativo. Por otro lado, la delección de *ctg-1* provocó varios efectos incluyendo una reducción en la tasa de crecimiento en medio líquido y sólido, una reducida germinación conidial, una reducida formación de apresorios en hojas de alfalfa y, en consecuencia, una reducción de la patogenicidad [141]. En *C. graminicola* se evaluó la función de *cgg1*, homólogo de *ctg-1*. La delección de *cgg1* disminuyó la tasa de crecimiento en medio sólido, favoreció la producción de esporas fusiformes cuando típicamente son de forma curva, causó pérdida de su patrón de crecimiento en forma de espiral en medio sólido y redujo la patogenicidad en tallos y hojas de maíz [142].

1.3.7.3. *Stagonospora nodorum*

Stagonospora nodorum es el principal patógeno del trigo, generando manchas en las hojas y las glumas [143]. La subunidad Gna1 de *S. nodorum*, al igual que en otros hongos filamentosos, regula múltiples procesos de su desarrollo. La inactivación de Gna1 mostró tener un efecto pleiotrópico, reduciendo su patogenicidad, inhibiendo su esporulación, provocando un fenotipo albino, secretando pigmento marrón al medio de crecimiento y provocando sensibilidad a estrés osmótico [144, 145]. En un proteoma extracelular (“*Secretome*”) realizado por electroforesis bi-dimensional (“*Two-dimensional gel electrophoresis: 2-DE*”) se identificaron proteasas extracelulares relacionadas con la degradación de la pared celular, proteólisis, hidrólisis de ARN y metabolismo de

compuestos aromáticos. Estos resultados fueron confirmados por RT-qPCR y se observó una correlación entre la intensidad de los spots (proteína) y la abundancia de los transcritos. En estos estudios también se identificaron genes (SNOG_06492, SNOG_11078, SNOG_00848, SNOG_08052, SNOG_14370, SNOG_13504, SNOG_15451, SNOG_07541, SNOG_07604, SNOG_10217, SNOG_11441, SNOG_11081 y SNOG_13042) involucrados en la infección y penetración de la planta del trigo (*Triticum aestivum*), además de regular la esporulación [146, 147]. Por otro lado, se observó que la disrupción del gen que codifica Gna1 alteró el 13.2% de las proteínas extracelulares detectadas, lo que revela el papel regulador de la subunidad G α en *S. nodorum*. Se determinó que Gna1 es un regulador positivo de la patogenicidad ya que su interrupción disminuye los niveles de melanina, un componente clave de su proceso infeccioso [147]. En un estudio proteómico intracelular posterior fueron identificadas 1336 proteínas, de las cuales 49 fueron alteradas significativamente, algunas de estas involucradas en vías del metabolismo primario, patogenicidad y respuesta a estrés ("*Glutaredoxins, bifunctional catalase-peroxidases*"), procesos que son regulados positivamente por Gna1. En este estudio proteómico se prestó principal atención a una deshidrogenasa de cadena corta ("*putative short-chain dehydrogenase: Sch1*") la cual mostró altos niveles de expresión en etapas tardías de infección coincidiendo con la esporulación. Además de la regulación de Sch1 por Gna1, también se demostró que está regulada por una MAP cinasa (Mak2) [148] [149]. La función de Gna1 en *S. nodorum* es opuesta a la de la mayoría de las subunidades Gal de los hongos filamentosos, pues Gna1 regula positivamente la esporulación, pigmentación, tolerancia a estrés y patogénesis, demostrando que, aunque las vías de señalización constituyen varios de los mecanismos evolutivamente conservados, la respuesta puede llegar a ser organismo-dependiente, incluso el comportamiento llega a ser distinto entre especies.

1.3.7.4. *Rosellinia necatrix*

Rosellinia necatrix es un hongo filamentoso comercialmente importante, debido a su capacidad de infectar raíces de un amplio rango de plantas. En un trabajo único y no muy reciente, se identificó por primera vez la subunidad G α Rga2 en *R. necatrix*, cuya secuencia fue similar a la de MagB de *M. grisea*. En este estudio se identificaron las tres

subunidades G α encontradas en hongos filamentosos y fueron caracterizadas a nivel de secuencia [150].

1.3.7.5. *Septoria tritici*

El ascomiceto *Septoria tritici* es el agente causal de la mancha foliar o septoria en el trigo [151]. En *S. tritici* se identificó la subunidad G α y fue nombrada como MgGPA1. La delección de *MgGpa1* afectó significativamente la morfología de las esporas, produciendo esporas más largas, en comparación con la cepa parental. En presencia de cAMP extracelular se redujo drásticamente el desarrollo de la colonia, y en ausencia de cAMP se indujo la producción de micelio aéreo abundante mostrando un aspecto "*fluffy*", y se redujo la ramificación micelial. Por otro lado, no se observaron diferencias en los niveles intracelulares de cAMP entre la cepa parental y la que porta la delección. En estas condiciones, la delección de *MgGpa1* redujo drásticamente la patogenicidad. Adicionalmente a los fenotipos mencionados, la delección de *MgGpa1* también causó una conidiación reducida, baja melanización y una alteración en el crecimiento polarizado. Estos resultados llevaron a los autores a concluir que MgGPA1 regula negativamente el crecimiento filamentosos [152]. Además, en estos resultados se observó claramente la regulación positiva que ejerce MgGPA1 sobre la conidiación y patogenicidad en *S. tritici*.

1.3.7.6. *Monascus ruber*

Monascus ruber es un hongo filamentosos usado tradicionalmente en alimentos fermentados en varios países de Asia. Sin embargo, este hongo produce la micotoxina citrinina [153], la cual representa una amenaza para la seguridad alimenticia. En *M. ruber* se identificó el gen *Mga1* que codifica para una subunidad G α . La delección de *Mga1* causó un incremento en la producción de citrinina (nueve veces más que la cepa parental), así como un 71% más en la producción de pigmento rojo. Con estos resultados se demostró que la subunidad G α está implicada en la regulación de la producción de citrinina y la biosíntesis de pigmento rojo [154, 155].

1.3.7.7. *Chaetomium globosum*

Chaetomium globosum es un hongo filamentosos saprófito encontrado en el suelo, estiércol y desechos de plantas [156], y produce cinco micotoxinas ("*chaetoglobosins*") con

capacidades citotóxicas y fitotóxicas, incluyendo las quetoglobosinas A, G, V, Vb y C [157]. Además, *C. globosum* también es considerado un agente raro de infecciones subcutáneas, causando onicomycosis en sujetos sanos, micosis pulmonares invasivas, así como infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos [158]. Estudios recientes demuestran el papel de la subunidad G α en la producción de enzimas degradadoras de celulosa y en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Un estudio usando el sistema de RNA de interferencia ("*RNA interference: RNAi*"), reveló que *gna1* provoca varios cambios fenotípicos en *C. globosum*, como la producción de micelio albino, restricción en el desarrollo de peritecios y disminución de la biosíntesis de quetoglobosina A y melanina. Fue observado también que los niveles de cAMP en la cepa parental fueron 3.4 veces más altos que en la cepa con la delección de *gna1*, resultados que ya se habían observado en otros hongos filamentosos. En esta cepa mutante se observó una regulación negativa en genes del complejo Velvet como *CglaeA* y *CgVeA*, y reguladores como la histona acetiltransferasa *CgSptJ* [159]. Otro estudio en *C. globosum*, mediante secuenciación de RNA ("*RNA sequencing: RNA-Seq*"), reveló que la ausencia de Gna1 disminuye significativamente la transcripción de genes de la familia glicohidrolasa y genes de celulasas, implicados en la degradación de celulosa, y este efecto está ligado a la regulación positiva de Gna1 sobre complejos transcripcionales como el complejo Hap2/3/5 (el cual se une a un elemento *cis*: motivo CCAAT) y *Clr1/2*, que juntos regulan la expresión de celulasas y hemicelulasas. En este estudio se demostró finalmente que la producción de celulasas regulada por la vía de señalización G α -cAMP/PKA es modulada por señales del entorno incluyendo fuente de carbono y luz, en la cual los complejos Velvet y ENVOY trabajan como efectores indirectos de esta vía [160].

1.3.7.8. *Sporothrix schenckii*

Sporothrix schenckii presenta un crecimiento dimórfico dependiente de las condiciones ambientales: a 30°C crece de forma filamentosa (estado saprófito), mientras que a 37°C crece de forma levaduriforme. Este hongo dimórfico causa una enfermedad llamada esporotricosis ("*Sporotrichosis*"), la cual afecta a humanos y animales [161]. La infección generalmente ocurre por inoculación traumática de suelo, plantas y materia orgánica contaminada con el hongo [162].

En *S. schenckii* fue identificada la subunidad Ga1 y nombrada como SSG-1 [163], mostrando más del 90% de identidad con subunidades Gα de varios hongos filamentosos (**Fig. 3**). Un estudio de interacción proteína-proteína, por el método doble híbrido en levadura ("*yeast two-hybrid technique*"), reveló que SSG-1 interacciona con una Fe/Mn superóxido dismutasa ("*Fe/Mn superoxide dismutase: SOD*"), una gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa ("*glyceraldehyde-3-P dehydrogenase: GAPDH*"), y dos proteínas transportadoras, una transportadora de hierro ("*siderophore-iron transporter*" perteneciente a la superfamilia "*Major Facilitator Superfamily: MFS*"), y una transportadora de cationes divalentes de la familia NRAMP ("*natural resistance-associated macrophage protein*"). Este fue el primer reporte en *S. schenckii* que describe la interacción de la subunidad Ga SSG-1 con SOD, GAPDH y dos transportadores. De acuerdo con las observaciones en varios hongos filamentosos, la identificación de estas proteínas sugiere posibles mecanismos por los cuales la subunidad Gα afecta a la patogenicidad y la supervivencia bajo condiciones de estrés, o dentro del hospedero [164].

1.4. Conidiación en hongos filamentosos: regulación y vía central

El ciclo típico de vida de los hongos filamentosos implica la conidiación después de un periodo de crecimiento vegetativo. La diferenciación de estos estados fisiológicos depende de varios factores ambientales como la luz, temperatura, pH, osmolaridad, nutrientes, lesiones físicas del micelio y presencia de compuestos volátiles [165]. La conidiación, implica la formación de conidióforos, estructuras especializadas en la formación de conidios (conidiogénesis). La morfología de estas estructuras (tamaño, forma, color y arreglo) son de gran importancia taxonómica, y tradicionalmente se ha usado para clasificar varios hongos filamentosos [166], incluyendo distintas especies de *Penicillium*. La conidiación inicia con una ramificación de las hifas, seguida de la formación de múltiples métulas en la punta de las hifas ramificadas, después, en la superficie de las métulas se forman fiálides, estructuras en forma de matraz, las cuales después de una repetida división mitótica generan cadenas de conidios (más de 50 conidios por fiálide) [167]. La conidiación es regulada por más de 1000 genes, todos controlados por la vía reguladora central, la cual está conformada por los factores de transcripción **BrlA**, **AbaA** y **WetA**, ampliamente estudiados en *A. nidulans* [168]. La activación de BrlA ("*bristle A*") es el paso esencial de la conidiación. BrlA contiene dos motivos "*C2H2 zinc-finger*", esenciales para la

unión al ADN, y los cuales permiten regular la expresión de genes relacionados con el desarrollo durante la primera fase de la conidiación [169]. Este factor de transcripción también interactúa con elementos de respuesta ("*BrlA response elements: BREs*"; 5'-[C/A][G/A]AGGG[G/A]-3'), localizados en promotores de múltiples genes implicados en el desarrollo [170]. AbaA ("*abacus A*"), es activado por BrlA durante la fase media del desarrollo asexual, después de la diferenciación de mótulas, y es necesario para la formación adecuada de fiálides [171]. AbaA es un miembro de la familia de factores de transcripción TEF-1 ("*Transcriptional Enhancer Factor-1*"), la cual contiene una secuencia ATTS ("*AbaA, TEC1p, TEF-1 sequence*") y un dominio TEA de unión a ADN, con una cremallera de leucina responsable de la dimerización [172]. Al igual que BrlA, AbaA también se une a elementos de respuesta ("*AbaA response element: ARE*"; CATTCT, donde Y es T o C), presentes en promotores de genes como *yA*, *rodA*, *wA*, *wetA*, *brlA*, *chsC*, *vosA*, *velB*, *axl2* y el mismo *abaA* [173]. WetA ("*wet-white A*") es activado por AbaA, y es esencial durante la fase tardía de la conidiación. WetA es esencial para la formación de fiálides y conidios, y está implicado en la maduración de conidios. Se ha demostrado que WetA regula su propia expresión, y también regula la expresión de *brlA* y *abaA* [174].

Además de BrlA, WetA y AbaA, existen otros factores de transcripción (VeA, VelB, VelC, VosA, RgdA, MtfA SitA, RlmA, SfgA, FlbB, FlbE, NapA, AreB, StuA, MedA, entre otros) necesarios para la conidiación, aunque cabe señalar que estos no pertenecen a la vía reguladora central: unos actúan activando el proceso, otros lo reprimen.

1.5. Proteínas cinasas

Las proteínas cinasas catalizan la fosforilación de proteínas y controlan la mayoría de los procesos celulares [175]. Estas proteínas son esenciales para la transducción de señales y se han encontrado en todos los organismos. La selectividad específica de las cinasas por sus sustratos depende de múltiples factores. Por ejemplo, las cinasas y sus sustratos deben ser coexpresados y colocalizados, su interacción debe ser mediada por proteínas adaptadoras, incluyendo otros eventos de interacción entre sitio de fosforilación y el sitio de acoplamiento molecular ("*Docking site*") con el dominio cinasa [176]. Se conocen ocho grupos de proteínas cinasas canónicas: 1) AGC (PKA, PKG, PKC), 2) CAMK ("*calcium- and calmodulin-regulated kinases*"), 3) CK1 ("*casein Kinase 1*"), 4) CMGC ("*cyclin-dependent kinases (CDKs)*"), "*mitogen-activated protein kinases*" ("*MAP kinases*"),

“*glycogen synthase kinases*” (GSK) y “*CDK-like kinases*” (CLKs), 5) RGC (“*receptor guanylate cyclases*”), 6) STE (“*sterile mutant*”), 7) TKL (“*tyrosine kinase-like*”) y 8) TK (“*tyrosine kinases*”) [177]. La mayoría de las proteínas serina/treonina/tirosina cinasas pueden ser divididas en tres clases en función de las fuerzas electrostáticas de los aminoácidos circundantes al sitio de fosforilación: basofílicas (por ejemplo, PKA, PKC, “*CaM-II kinase*”), acidofílicas (por ejemplo, “*casein kinases I and II*”) y dirigidas por prolina (por ejemplo, “*cyclin-dependent kinases*”, “*MAP kinases*”) [176, 178]. Las propiedades físicoquímicas de estos aminoácidos son otro factor clave que favorece la especificidad de las cinasas por sus sustratos.

La cinasa más caracterizada es la proteína cinasa A (“*cyclic AMP-dependent protein kinase*, o *PKA*”). PKA es una holoenzima formada por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras, estas últimas encargadas de la unión del sustrato (cAMP) [175] [179]. Además de que PKA es un efector clave de las proteínas G heterotriméricas, la vía de señalización por cAMP/PKA ha sido implicada en varios procesos de los hongos filamentosos como respuesta a varios tipos de estrés, metabolismo secundario, patogenicidad y desarrollo asexual [180].

Además de PKA, las proteínas cinasas activadas por mitógeno (“*mitogen-activated protein kinase: MAPK*”) son otro grupo de enzimas encargadas de regular múltiples respuestas, que se encuentran desde levaduras hasta humanos. Este módulo de señalización consiste en tres proteínas cinasas donde una MAPKKK (MAP3K) fosforila a una segunda cinasa, una MAPKK (MAP2K), la cual fosforila una tercera cinasa, una MAPK, y esta última fosforila proteínas nucleares, como factores de transcripción, para activar la expresión de genes [181]. Aunque la señalización mediada por proteínas MAPK es ubicua y evolutivamente conservada [177], algunas proteínas que participan en estas respuestas son específicas de especies, por ejemplo, la presencia de proteínas “*scaffold*” o adaptadores. La mayoría de los estudios de vías mediadas por MAP cinasas se han realizado en *S. cerevisiae*, y a partir de estos, se han intentado explicar varios mecanismos y comportamientos de los hongos filamentosos, aunque quedan muchas interrogantes. Se ha demostrado que algunas proteínas MAPK están implicadas en el proceso conidiogénico de algunos hongos filamentosos, tal es el caso de la MAP3K SteC (AnSte11) de *A. nidulans*, homólogo de Ste11 de *S. cerevisiae*, la cual está implicada en el crecimiento y en el desarrollo de los conidióforos [182, 183]. Los hongos filamentosos generalmente contienen tres vías MAPK conservadas y estas han sido estudiadas en *A. nidulans*: HOG,

MpkA y MpkB. La vía HOG está implicada en la adaptación a alta osmolaridad, MpkA está implicada en la integridad de la pared celular y MpkB regula el desarrollo sexual y el metabolismo secundario [184]. Se ha observado que MpkB es un regulador negativo de BrlA, por lo tanto, tiene un efecto negativo en la formación de conidióforos [185]. Otro grupo de tres proteínas serina/treonina cinasas (An-PlkA, A-Mst1 y An-Gin4) fueron identificadas en *A. nidulans* con un papel importante en la producción de esporas [186].

1.6. Proteómica y Fosfoproteómica

Las tecnologías ómicas (“*Omics*”) han adoptado una visión holística de las moléculas que conforman una célula, tejido u organismo [187]. Están dirigidas principalmente a la detección sistémica de genes (genómica: “*Genomics*”), ARN mensajero (transcriptómica: “*Transcriptomics*”), proteínas (proteómica: “*Proteomics*”), genomas (metagenómica: “*Metagenomics*”), metabolitos (metabolómica: “*Metabolomics*”), fenotipos (fenómica: “*Phenomics*”), elementos/iones (ionómica: “*Ionomics*”) y lípidos (lipidómica: “*Lipidomics*”) en una muestra biológica (**Fig. 4A**) [188]. El principio básico de estos enfoques radica en que un sistema complejo se puede entender más a fondo si se considera como un todo [189]. Un proteoma es definido como un conjunto de proteínas expresadas en una célula, tejido u organismo [189]. A partir de este contexto surgió la proteómica, que es el estudio a gran escala de la presencia, abundancia, función y estructura de las proteínas en una muestra biológica compleja [190]. Este enfoque permite realizar varios estudios comparativos como perfiles proteómicos, análisis comparativos entre dos o más condiciones, identificación de modificaciones postraduccionales y estudios de interacción proteína-proteína. La proteómica ha dado lugar a variantes que permiten el estudio de fosfoproteomas, acetilomas, metilomas, entre otros (**Fig. 4A**).

La fosfoproteómica se encarga de la identificación y caracterización a gran escala de proteínas modificadas postraduccionalmente por la unión covalente de uno o más grupos fosfato. La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes y juega un papel central en las señales intracelulares de todos los organismos [191]. Más de un tercio de estos eventos de fosforilación ocurre en los residuos de serina (“*Serine: S*”), treonina (“*Threonine: T*”) y tirosina (“*Tyrosine: Y*”); algunas veces se han detectado fosforilaciones en residuos de histidina (“*Histidine: H*”) y ácido aspártico (“*Aspartic acid: D*”), pero son menos estables que las anteriores [192]. La dinámica de la

fosforilación proporciona un nivel de regulación altamente complejo provocando cambios en las proteínas a nivel estructural, funcional y espacial [193, 194]. Entre los principales constituyentes de la maquinaria de fosforilación se encuentran las cinasas, fosfatasas y proteínas de unión al grupo fosfato (**Fig. 4B**) [195]. La identificación y cuantificación de una gran cantidad de eventos de fosforilación encontrados en ciertas condiciones fisiológicas requiere de técnicas de alto rendimiento. La cromatografía de líquidos (*“liquid chromatography: LC”*) acoplada a espectrometría de masas en tándem (*“tandem mass spectrometry: MS/MS”*, o MS2) (LC-MS/MS) es una de las herramientas más usada en estudios proteómicos. El principio de esta técnica consiste en la separación de péptidos de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y posteriormente la medición de la relación masa/carga (*“mass-to-charge: m/z”*) de moléculas ionizadas [196]. Además del sistema LC-MS/MS, actualmente se han implementado otras técnicas más eficientes. Una de estas implementaciones es nanoLC-MS/MS, un poderoso sistema de ultra alta resolución que consiste en una cromatografía líquida a nano escala acoplada con espectrometría de masas en tándem y, a su vez, a un sistema de detección como ESI (*“electrospray ionization”*), lo que proporciona mayor resolución y sensibilidad [197].

El enfoque proteómico *“shotgun phosphoproteomics”*, utiliza LC-MS/MS junto con un enriquecimiento selectivo de péptidos fosforilados haciendo posible la identificación de miles de sitios de fosforilación. Este enfoque tiene mucha mayor cobertura en la identificación de fosforilaciones comparado con métodos basados en anticuerpos, los cuales requieren de información previa sobre las proteínas fosforiladas. El flujo de trabajo de la fosfoproteómica *“shotgun”* comienza con la digestión de proteínas, generalmente con tripsina, después los fosfopéptidos generados son enriquecidos por algún método de enriquecimiento selectivo, a continuación, estos fosfopéptidos son separados por cromatografía líquida en fase reversa y sometidos directamente a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (**Fig. 4C**). Posteriormente, los datos son sometidos a análisis computacionales para identificar proteínas a partir de los espectros detectados [198]. La fosfoproteómica *“shotgun”* permite implementar la cuantificación libre de marcaje (*“Label-free”*), la cual aplica dos estrategias: i) compara la abundancia en muestras biológicas mediante la medición de la intensidad de iones precursores de los péptidos (LC-MS), ii) o mide las cuentas espectrales (LC-MS/MS) de proteínas, en ambos casos sin marcaje químico [191, 199]. La fosfoproteómica cuantitativa por *“label-free”* proporciona mediciones rápidas y a bajo costo en muestras biológicas complejas. Comparado con los

métodos con marcaje como ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*) [200], iTRAQ (*Isobaric Tags For Relative and Absolute Quantitation*) [201], TMT (*Tandem Mass Tag*) [202], entre otros, *label-free* necesita ser más preciso y controlado, debido a la posibilidad de errores causados durante las corridas en LC-MS/MS. Sin embargo, el sistema nanoLC-MS/MS mejora la reproducibilidad y resolución del análisis, y con la ayuda de herramientas computacionales adecuadas mejora en gran medida la confiabilidad y precisión de los resultados [203].

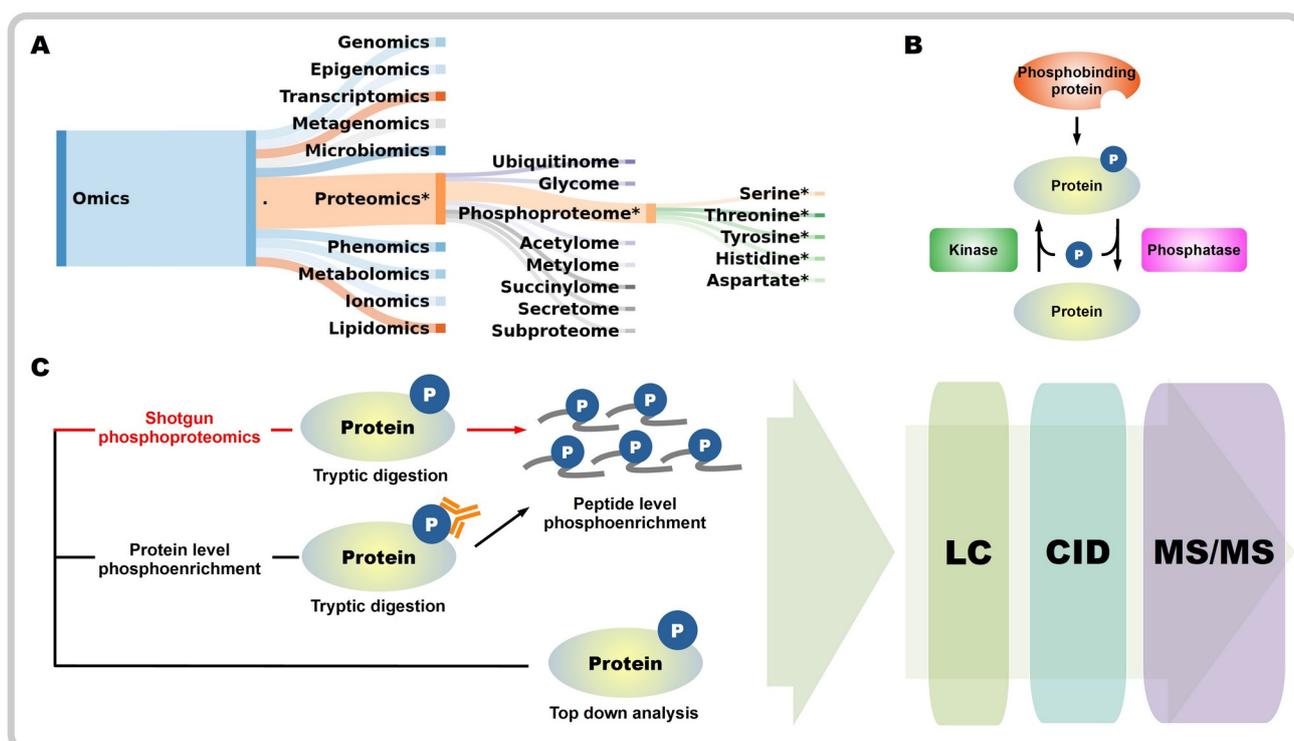


Fig. 4. Tecnologías “Ómicas” y sus enfoques.

(A) Esquema general de enfoques recientes que conforman las tecnologías “Ómicas” (*Omics*). * indica la tecnología proteómica y su variante la fosfoproteómica, así como los residuos de aminoácidos implicados en la fosforilación. Figura creada en <http://sankeymatic.com/> con información manualmente revisada.

(B) Componentes principales de la maquinaria de fosforilación. Figura modificada de [195].

(C) Diferentes flujos de trabajo para análisis fosfoproteómicos. El enfoque *“top-down”* estudia la fosforilación de proteínas completas pero su uso es limitado. En otros estudios se usa *“pull-down”* (por ejemplo, el enriquecimiento de fosfotirosina), seguido de digestión enzimática. El método más común es *“bottom-up”*, el análisis *“bottom-up”* en una mezcla de proteínas es llamado *“shotgun phosphoproteomics”*, donde la digestión enzimática es seguida de un fosfoenriquecimiento. En todas estas estrategias se realiza análisis por LC-MS/MS. Figura modificada de [195].

1.7. Bioinformática en proteómica

La bioinformática puede ser definida como una disciplina científica multidisciplinaria encargada de la aplicación de herramientas computacionales para organizar, analizar, interpretar, visualizar y almacenar información biológica a gran escala (**Fig. 5A**) [204]. La bioinformática tiene como objetivo: i) organizar los datos para que la comunidad científica pueda acceder a la información y crear nuevas fuentes de acceso, ii) desarrollar herramientas de análisis de datos, y iii) usar estas herramientas para analizar e interpretar los datos [205]. Esta disciplina a su vez puede ser dividida en dos clases: la primera relacionada con el análisis de secuencias y la segunda relacionada con el análisis estructural de biomoléculas [204]. La bioinformática tiene un papel fundamental en la proteómica, y su aplicación va desde el análisis de secuencias peptídicas hasta la clasificación funcional de proteínas. Una de las principales limitantes de la proteómica se relaciona con el análisis de grandes volúmenes de datos. Esta producción masiva de información ha provocado la necesidad de procesarla eficientemente, por ello se desarrollan nuevos programas y algoritmos con el fin de mejorar la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas en términos de enfoques de alto rendimiento (“*high-throughput*”). El procesamiento y análisis de datos proteómicos es un proceso complejo que consta de varios pasos (**Fig. 5B**) [190], incluyendo el procesamiento de los datos crudos para extraer información relevante, búsqueda en una base de datos para asignar espectros a secuencias peptídicas, reensamblado *in silico* de los péptidos identificados en las proteínas, validación y cuantificación a nivel de péptidos y proteínas, anotación y caracterización funcional, y almacenamiento de los resultados en una base de datos [206]. La bioinformática ha complementado a la proteómica de forma significativa, gracias a ésta la proteómica ha alcanzado un enorme potencial ampliando el conocimiento de la naturaleza compleja de los organismos. Sin embargo, a pesar de las múltiples herramientas y sofisticados algoritmos bioinformáticos, el principal desafío sigue siendo el procesamiento y análisis de complejos volúmenes de datos.

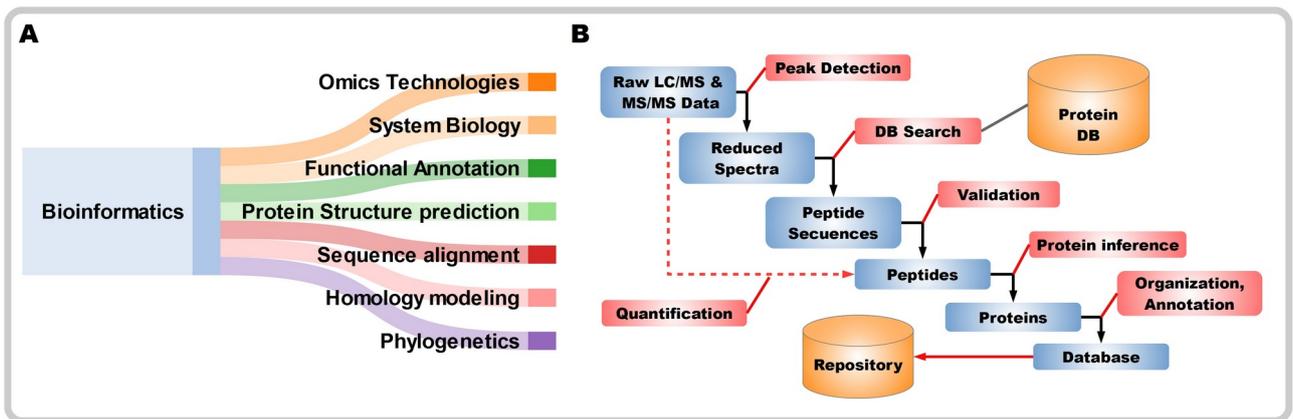


Fig. 5. Aplicaciones de la bioinformática y análisis de datos.

(A) Representación de algunas áreas donde se aplican programas y algoritmos bioinformáticos para el análisis de datos a gran escala. Figura modificada de [204].

(B) Representación esquemática de los diferentes módulos que constituyen un proceso de análisis proteómico completo. Figura modificada de [206].

1.8. Justificación

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso de gran importancia industrial, ya que tiene la capacidad de producir uno de los antibióticos más usados en la historia de la humanidad, la penicilina. Desde su descubrimiento ha revolucionado el campo de la medicina. Conocer los mecanismos que regulan el desarrollo de *P. chrysogenum* a nivel de señalización celular es muy importante, en parte para enriquecer el conocimiento que se tiene de su fisiología y para mejorar sus aplicaciones industriales, además de contribuir al conocimiento general de la señalización y las vías de transducción en los hongos filamentosos. El estudio de las vías de señalización ha sido abordado en un grupo selecto de hongos, siendo *Saccharomyces cerevisiae* el más estudiado y usado como referencia para describir el comportamiento de la mayoría de los hongos, incluidos los filamentosos.

El estudio de la vía de señalización mediada por Pga1 será la base para entender la regulación del desarrollo de *P. chrysogenum* a otros niveles, para ello se ha obtenido una variante alélica de *pga1* (*pga1*^{Q204L}) con el fin de estudiar el efecto de Pga1 en procesos como conidiación, respuesta a estrés y crecimiento, para posteriormente ser relacionados con eventos de fosforilación en las proteínas que participan en estos procesos.

La vía de señalización mediada por la subunidad G α Pga1 de las proteínas G heterotriméricas en *P. chrysogenum* regula varios procesos como la conidiación, producción de metabolitos secundarios, y respuesta a estrés oxidativo y osmótico. A pesar de estas contribuciones no se tiene un panorama global de lo que ocurre con otras vías de señalización y se desconocen los mecanismos que controlan la conidiación a nivel de fosforilación de proteínas, una de las modificaciones postraduccionales más importantes que controlan el flujo de información en la señalización celular. Estudiar la regulación de la conidiación y otros procesos relacionados con el desarrollo de *P. chrysogenum*, en relación con las modificaciones postraduccionales permitirá identificar posibles reguladores y vías de señalización dependientes de Pga1. Esto sin duda aportará información valiosa para entender la compleja regulación dependiente de fosforilación en otros hongos filamentosos.

1.9. Hipótesis

El desarrollo de *P. chrysogenum* depende del funcionamiento coordinado de varias vías de señalización. Sin embargo, se desconoce el papel que juega la fosforilación de las proteínas en estos procesos. Por lo tanto, se ha planteado que los cambios en los patrones de fosforilación de proteínas que regulan el desarrollo son regulados, a su vez, por la subunidad Gal Pga1 en *P. chrysogenum*.

1.10. Objetivos generales

- Caracterización fenotípica de cepas mutantes de *P. chrysogenum*.
- Identificación de efectores fosforilados mediados por Pga1 en cepas mutantes de *P. chrysogenum*.

Capítulo 2

Obtención de una cepa mutante

Pga1^{Q204L} y caracterización de su fenotipo

2.1. Introducción

Los hongos filamentosos han sido estudiados durante muchos años, debido a la relación intrínseca que existe con el hombre. Todas esas contribuciones han permitido conocer más sobre la fisiología de estos microorganismos, favoreciéndose por un lado múltiples aplicaciones industriales, y por otro lado conociendo mejor los mecanismos patogénicos que provocan varias enfermedades.

Una forma de estudiar el comportamiento de estos hongos es la caracterización fenotípica, la cual consiste en una serie de técnicas micro y macroscópicas, así como algunas pruebas bioquímicas y moleculares realizadas en condiciones determinadas. La mayoría de estos estudios implica el uso de cepas mutantes, empleadas como punto de comparación con una cepa control. Entre estas técnicas se pueden mencionar algunas como la medición del peso seco (en medio líquido y sólido), crecimiento radial (en medio sólido), niveles de conidiación (en medio líquido y sólido), producción de metabolitos secundarios (antibióticos, pigmentos, toxinas; en medio líquido y sólido), cambios de pH (en medio líquido), cAMP intracelular (en medio líquido y sólido), tolerancia a estrés oxidativo, osmótico, lumínico y térmico (en medio líquido y sólido) y germinación conidial (en medio líquido), morfología de estructuras (en medio líquido y sólido), entre otras.

Todas estas técnicas proporcionan mecanismos de estudio de los fenotipos de *P. chrysogenum* y cepas mutantes derivadas de ésta, con el fin de conocer y entender su fisiología.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la subunidad $G\alpha$ Pga1 constitutivamente activa (Pga1^{Q204L}) en el desarrollo de *P. chrysogenum*.

2.2.2. Objetivos específicos

- Obtener cepas transformantes portando el alelo dominante de activación constitutiva *pga1*^{Q204L}.
- Comparación fenotípica entre las cepas *P. chrysogenum* Wis54-1255, Pga1Q204L y Δ *pga1*:
 1. Producción de biomasa.
 2. Tasa de crecimiento radial.
 3. Conidiación.
 4. Respuesta a estrés oxidativo.
 5. Niveles intracelulares de cAMP.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Microorganismos

2.3.1.1. *Escherichia coli*

Cepa: *E. coli* DH5 α .

Genotipo: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*.

Condiciones de cultivo: medio de cultivo Luria Bertani (LB) con (agar 2%) o sin agar, incubada para crecimiento a 37°C durante 16 h. Las colonias transformantes resistentes a ampicilina fueron sembradas en medio LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina.

Aplicación: Esta cepa fue utilizada para la amplificar y conservar plásmidos.

2.3.1.2. *P. chrysogenum* Wis54-1255

Cepa: ATCC 28089 / Wisconsin 54-1255.

Genotipo: Cepa silvestre con función normal de la subunidad G α Pga1 de las proteínas G heterotriméricas. Usada para la secuenciación del genoma completo [207].

Condiciones de cultivo: Temperatura óptima de crecimiento 27°C.

Aplicación: Se usó como control en todos los experimentos.

2.3.1.3. *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG*⁻

Cepa: *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *pyrG*⁻, nombre abreviado: Wis54-1255 *pyrG*⁻.

Genotipo: Auxotrofia a uridina, obtenida por mutación con nitrosoguanidina [208].

Condiciones de cultivo: Medio suplementado con uridina y temperatura óptima de crecimiento de 27°C.

Aplicación: Se usó como cepa receptora para la introducción del alelo dominante de activación constitutiva *pga1*^{Q204L}.

2.3.1.4. *P. chrysogenum* Wis54-1255 Δ *pga1*

Cepa: *P. chrysogenum* Wis54-1255 Δ *pga1*, nombre abreviado en este trabajo: Δ *pga1*.

Genotipo: Deleción del gen *pga1* que codifica para la subunidad G α Pga1 [109].

Condiciones de cultivo: Temperatura óptima de crecimiento 27°C.

Aplicación: Se usó para estudios fenotípicos y para obtener un perfil fosfoproteómico.

2.3.1.5. *P. chrysogenum* Wis54-1255 Pga1Q204L

Cepa: en este trabajo se obtuvieron las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L.

Genotipo: Fondo genético de *P. chrysogenum* Wis54-1255 más el alelo dominante *pga1*^{Q204L}.

Condiciones de cultivo: Temperatura óptima de crecimiento 27°C.

Aplicación: Se usó para estudios fenotípicos y para obtener un perfil fosfoproteómico.

2.3.2. Medios de cultivo para *P. chrysogenum* Wis54-1255

MPPY: Glucosa 40 g/L, extracto de levadura 2 g/L, NaNO₃ 3 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO₄•7H₂O 0.5 g/L, FeSO₄•7H₂O 0.01 g/L, pH 6.0. Usado para preinóculo y crecimiento de esporas [117].

Power: Sacarosa 25 g/L, lactosa 5 g/L, peptona 2.5 g/L, sólidos de maceración de maíz 0.5 g/L, KCl 26.1 g/L, NaCl 2 g/L, NaNO₃ 1.5 g/L, K₂HPO₄ 0.25 g/L, MgSO₄•7H₂O 0.25 g/L, sales PW 1 mL (KH₂PO₄ 30 g/L, FeSO₄•7H₂O 5 g/L, FeCl₃•6H₂O 2 g/L, CuSO₄•7H₂O 1 g/L), pH de 6,75 ± 0.2 [109].

Czapek: Sacarosa 30 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, solución concentrada Czapek 10 mL (NaNO₃ 300 g/L, KCl 50 g/L, MgSO₄•7H₂O 50 g/L, FeSO₄•7H₂O 10 g/L), pH 6.8 ± 0.2. Para regeneración de protoplastos fue suplementado con 1 M de sorbitol.

PDA: infusión de papa 4 g/L, dextrosa 20 g/L, agar 15 g/L, pH 5.6 ± 0.2.

2.3.3. Vectores de clonación y plásmidos

- 1 | pJET1.2/blunt: vector de clonación de 2974 pb, adquirido de Thermo Scientific (CloneJET PCR Cloning Kit). La secuencia fue descargada del Genbank con el número de acceso [EF694056](#).
- 2 | pBluescript KS(+): vector fagémido de 2958 pb. La secuencia fue descargada del Genbank con el número de acceso [X52331](#) [209, 210].
- 3 | pPG(+): plásmido con el gen *pyrG* de *P. chrysogenum* para complementar la auxotrofia de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG*⁻. Donado por [109].

Construidos en este trabajo:

- 4 | pJpga1Q: vector con el gen *pga1* (bajo su propio promotor y terminador), con el codón de glutamina (CAG) normal.
- 5 | pJpga1L: vector pJpga1Q, pero con el cambio del codón de glutamina (CAG) a leucina (CTC), correspondiente a la posición 204 (Q204L) en la Pga1.
- 6 | pBpga1Q-L: vector con el nuevo alelo de *pga1*, *pga1*^{Q204L}.
- 7 | pQ204L: plásmido con el alelo *pga1*^{Q204L} más el gen *pyrG*.

2.3.4. Oligonucleótidos

- 1 | F-pro-Pga1: 5'-CTGCATCGATCTAGAAGTCCGGCAT-3', con sitios de restricción para ClaI, XbaI.
- 2 | R-ter-Pga1: 5'-TACAACCGTATCGATATCTACGACTTGGGA-3', con sitio de restricción para ClaI.
- 3 | Pga1Q204L-F : 5'- TTCGACGTTGGTGGTCTCCGATCCGAGCGG-3', con nuevo codón de leucina.
- 4 | Pga1Q204L-R : 5'- CCGCTCGGATCGGAGACCACCAACGTCGAA-3', secuencia complementaria del nuevo codón de leucina.
- 5 | *pyrG*-test: 5'- TCGACATCGCGCGCA AGTAC -3', usado para comprobar la integración del plásmido pQ204L en el genoma de *P. chrysogenum* Wis54-1255.
- 6 | *pga1*-test-R: 5'- TCATCGGGCTAACGGGAAGC -3', usado para secuenciación y para comprobar la integración del plásmido pQ204L en el genoma de *P. chrysogenum* Wis54-1255.

2.3.5. Digestiones enzimáticas y ligación de fragmentos de ADN

Las digestiones y ligaciones se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del proveedor (Thermo Scientific).

2.3.6. Extracción de ADN plasmídico

Se utilizaron las soluciones descritas en [211], y se siguió una nueva metodología implementada en este trabajo.

2.3.7. ADN genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255

Las extracciones de ADN genómico de *P. chrysogenum* Wis54-1255 se realizaron usando Promega DNA Purification Kit, siguiendo las especificaciones del proveedor.

2.3.8. Mutagénesis dirigida

- 1 | Amplificar el vector pJpga1Q con el par de oligonucleótidos Pga1Q204L-F y Pga1Q204L-R.
 - ▶ Condiciones de PCR: 95°C 30 s; 25X [95°C 30 s, 58.8 30 s, 68°C 6 min]; 68°C 7 min.
 - ▶ Termociclador modelo T100™ (Biorad).
 - ▶ **NOTA:** para mayor especificidad y eficiencia utilizar PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent).
- 2 | Tratar el producto de la reacción de PCR con la endonucleasa DpnI incubando a 37°C durante 1 h.
 - ▶ DpnI digiere ADN metilado y hemimetilado.
- 3 | Purificar el producto de la digestión y transformar DH5 α .
- 4 | Extraer el nuevo vector pJpga1L con el nuevo alelo *pga1*^{Q204L}.
- 5 | Verificar la integridad de la mutagénesis por secuenciación.

2.3.9. Preparación y transformación de células Ultracompetentes de *E. coli*

La preparación y transformación de células ultracompetentes se llevó a cabo usando los métodos descritos en [212, 213].

2.3.10. Preparación de protoplastos de *P. chrysogenum*

- 1 | Inocular 100 mL de medio MPPY (suplementado con uridina) con conidios provenientes de una placa e incubar con agitación constante 250 rpm durante 18-24 horas.
- 2 | Recolectar el micelio, lavarlo dos veces con agua y secar con papel filtro.
- 3 | Pesar 1 g de micelio y resuspenderlo en 10 mL de TPP.
 - ▶ **NOTA:** preferiblemente hacer esta mezcla en un matraz de 125 mL
 - ▶ TPP: 50 mM buffer de fosfato potásico, 0.7M KCl, pH 5.80.
- 4 | Agregar 10 mL de solución de enzimas líticas a la mezcla anterior.
 - ▶ Solución de enzimas líticas: enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) disueltas en TPP, a una concentración final de 10-14 mg/mL. Filtrar por membrana de 0.22 μ m.
- 5 | Incubar la mezcla a 28°C a 100 rpm durante 2-4 horas.
 - ▶ **NOTA:** monitorear la liberación de protoplastos cada hora.
- 6 | Filtrar la suspensión de protoplastos por una membrana de 30 μ m.
- 7 | Recolectar el sobrenadante con los protoplastos y centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
 - ▶ **NOTA:** preferiblemente usar tubos de fondo cónico y usar centrifuga de rotor basculante.
- 8 | Hacer dos lavados con solución KCM.
 - ▶ KCM: 0.7 M KCl, 50 mM CaCl₂, 10 mM MES, pH 5.80.
- 9 | Resuspender los protoplastos en buffer KCM a una concentración de 1-2E8 protoplastos/mL.
 - ▶ Mantenerlos la suspensión de protoplastos en hielo hasta su transformación.

2.3.11. Transformación de *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG*⁻

Continuación

- 10 | Preparar la mezcla de transformación agregando 100 µL de la suspensión de protoplastos, 10 µL de PCM, 5-10 µL de ADN (1-2 µg/µL). Mezclar suavemente con ayuda de una micropipeta.
 - ▶ PCM: Polietilenglicol 6000 50%, 50 mM CaCl₂, 10 mM MES, pH 5.80.
 - ▶ **NOTA:** hacer un control haciendo una mezcla idéntica, pero sin ADN para determinar la capacidad de regeneración de los protoplastos, así como la aparición de colonias revertientes.
- 11 | Mantener la reacción en hielo durante 20 minutos.
- 12 | Adicionar 500 µL de PCM y mezclar suavemente. Mantener a temperatura ambiente durante 20 min.
- 13 | Diluir el polietilenglicol del PCM agregando 600 µL de solución KCM.
- 14 | Añadir la mezcla de transformación al medio de cultivo fundido (48-50°C).
- 15 | Mezclar suavemente y añadir como cobertera sobre una base previamente preparada.
- 16 | Incubar a 28°C durante 4-7 días, o hasta la aparición de colonias de transformantes.

2.3.12. Producción de biomasa (por peso seco)

- 1 | Recolectar el micelio con ayuda de una espátula metálica a partir de placas con medio Power/agar.
 - ▶ **NOTA:** Hacer las mediciones por triplicado cada 24 h hasta las 192 h.
- 2 | Depositar el micelio en un matraz que contiene 30 mL de solución salina.
- 3 | Calentar en un microondas hasta fundir el agar.
- 4 | Filtrar el micelio y lavar con agua.
- 5 | Deshidratar el micelio a 60°C durante 72 h.
- 6 | Determinar el peso seco de la biomasa.

2.3.13. Conidiación

- 1 | Aislar conidios a partir de matraces con medio Power inoculados con conidios después de 6 días de incubación a 27°C.
- 2 | Lavar y resuspender los conidios en solución salina (NaCl 0.9%) y ajustar a 1E6 conidios/mL.
 - ▶ **NOTA:** Esta suspensión también se usa para el ensayo de conidiación.
- 3 | Propagar 5E4 conidios en la superficie de una placa (de 50 mm de diámetro) con la ayuda de una varilla de vidrio.
- 4 | Incubar a 27°C.
- 5 | Extraer 8 *plugs* de agar (8 mm de diámetro) en cada tiempo y depositarlos en 4 mL de solución NT.
 - ▶ Tiempos: 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 56, 72, 96, 120, 144 y 168 h.
 - ▶ Solución NT: NaCl 0.9%, 0.01% Triton-X100.
 - ▶ **NOTA:** Hacer cuadruplicado y dos mediciones por réplica.
- 6 | Contar los conidios en una cámara de Neubauer "improved" (0.100 mm Depth, 0.0025mm²) en un microscopio óptico Olympus CH30RF100 a 40x.

2.3.14. Extensión radial

- 1 | Inocular el centro de una placa (50 mm de diámetro) con 0.5 µL de la suspensión de conidios.
 - ▶ **NOTA:** Para evaluar el efecto del estrés oxidativo se exponen los conidios a varias concentraciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sembrándose en placas de bioensayo dividida en varios cuadrantes y midiéndose el diámetro de la colonia.
- 2 | Incubar a 27°C.

- 3 | Tomar fotografías de las colonias cada 24 h a partir de las 48 h hasta las 168 h.
 - ▶ Fotografías tomadas con una Cámara Reflex Canon EOS Rebel T5 en modo Macro, a una altura aproximada de 30 cm, usando siempre una referencia milimétrica al lado de cada placa para las mediciones.
 - ▶ **NOTA:** Hacer las mediciones en 5 réplicas.
- 4 | Procesar las imágenes con el programa ImageJ v1.52s haciendo dos mediciones perpendiculares por colonia.
- 5 | Analizar los datos obtenidos en algún programa estadístico (Python).

2.3.15. Cuantificación de cAMP intracelular

- 1 | Recolectar el micelio con ayuda de una espátula metálica a partir de placas con medio Power/agar.
- 2 | Lavar dos veces con solución salina.
- 3 | Medir la concentración de cAMP de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Direct cAMP ELISA kit, Enzo Life Science, Catalog ADI-900-066), con algunas modificaciones.
 - ▶ **NOTA:** Después macerar el micelio con ayuda de nitrógeno, incluir un paso de liofilización de 6 h aproximadamente para remover toda la humedad de las muestras.
- 4 | Leer la absorbancia en un Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek) a una longitud de onda de 405 nm y procesar los datos.

2.3.16. Análisis estadísticos

- 1 | Todos los datos fueron procesados en Jupyter Notebook de Python.
- 2 | Todos los análisis estadísticos (medias, desviaciones estándar, pruebas de T y regresiones lineales) se realizaron usando la biblioteca SciPy (<https://www.scipy.org/>) para Python, la cual se compone de herramientas y algoritmos matemáticos.

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Clonación de *pga1* y construcción del plásmido pPgaQ204Lp

El gen *pga1* codifica la subunidad G α Pga1, de las proteínas G heterotriméricas de *P. chrysogenum*. Pga1 presenta alta identidad de secuencia (más del 88%) con subunidades G α 1 de varios hongos filamentosos (**Fig. 3**). Entre hongos del mismo Orden Eurotiales, la identidad llega a ser del 100% (**Fig. 6A**).

El objetivo de clonar *pga1* fue obtener el alelo de activación constitutiva *pga1*^{Q204L} y estudiar sus efectos en el desarrollo de *P. chrysogenum*, principalmente en etapas tempranas de la conidiación. Hasta el momento, se han estudiado los alelos constitutivos *pga1*^{G42R} y *pga1*^{G203R}, además de la delección de *pga1* en *P. chrysogenum*, los cuales han mostrado tener efectos pleiotrópicos [108, 109]. Por otro lado, debido a que Bosch *et al.* (2012) cuestionaron el verdadero funcionamiento del alelo *pga1*^{G42R}, que hasta ese momento ya había sido estudiado en varios hongos filamentosos, se decidió estudiar el efecto del alelo *pga1*^{Q204L}, el cual es más estable que *pga1*^{G42R}, y comparar el comportamiento de ambos. La glicina 204 se localiza en el “switch” II (caja 3 con la secuencia consenso DXXG: **F**D**V****G****G****Q****R** en hongos filamentosos) hacia el extremo N-terminal de la hélice α 2 (entre la hoja β 3 y la hélice α 2). La alteración de este motivo puede afectar a la interacción con el dímero G $\beta\gamma$, receptores GPCR, proteínas RGS, enzimas y canales iónicos. Además, también está demostrado que el cambio de este residuo afecta los sitios de unión del cofactor Mg²⁺ y del fosfato y del GTP necesario para el ciclo normal de activación de las proteínas G heterotriméricas (**Fig. 6A, B**).

Antes de obtener todas las construcciones plasmídicas, éstas fueron diseñadas usando el programa libre ApE-A plasmid Editor v2.0.55 con el fin de tener control total sobre las secuencias y construcciones esperadas. Este programa permite saber con exactitud la posición de todos los sitios y patrones de restricción en las secuencias y, en consecuencia, el tamaño de todos los fragmentos esperados, sin posibilidad de error.

A partir de ADN total de la cepa Wis54-1255, se amplificó por PCR un fragmento de 2.7 kb que contiene el gen *pga1*, con su promotor y terminador (**Fig. 6C**). Este fragmento fue clonado en el vector pJET1.2/blunt (CloneJET PCR Cloning Kit #K1232) obteniéndose el nuevo vector pJpga1, para a continuación realizar una mutagénesis dirigida para hacer el cambio de glutamina (codón CAG: Q) por leucina (codón CTC: L) en la posición 204, de la

secuencia de aminoácidos. El producto de la mutagénesis fue secuenciado, para confirmar el cambio de los nucleótidos AG por CT. Una vez confirmada la mutación, el fragmento *Cla*I fue clonado en el fagémido pBluescript KS(+), obteniéndose el nuevo plásmido pBpga1Q204L, que fue confirmado mediante análisis con enzimas de restricción. Posteriormente el fragmento *Hind*III (con el gen *pyrG* de *P. chrysogenum*) del plásmido pPG(+) fue clonado en pBpga1Q204L, para obtener el plásmido pPgaQ204Lp (**Fig. 6C**). El plásmido pPgaQ204Lp se construyó de tal forma que tuviera la misma estructura que el plásmido pPgaG42Rp [109], que porta el alelo *pga1*^{G42R} con su propio promotor más el gen *pyrG* como marcador de selección, para que de esta forma sean comparables las cepas que portan cada uno de los alelos en los diferentes análisis fenotípicos a los que se someterían posteriormente.

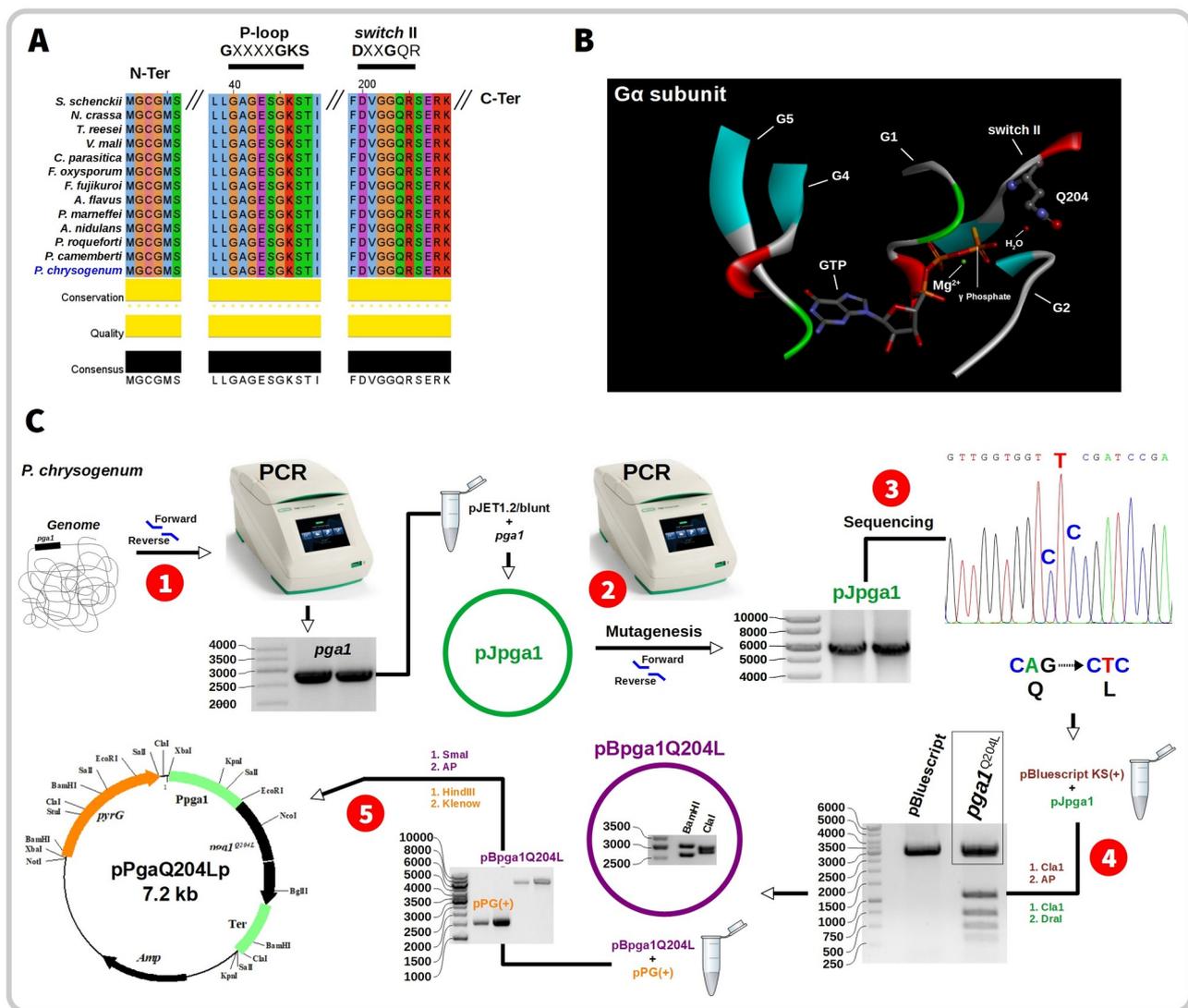


Fig. 6. Construcción del plásmido pPga1Q204Lp con la mutación Q204L en el gen *pga1*.

(A) Grado de conservación entre varias subunidades G_{α} de algunos hongos filamentosos. También se muestran las dos cajas (caja 1 [P-loop]: G42, caja 3 ["switch II"]: G203) que hasta ahora han sido estudiadas en *P. chrysogenum*, incluyendo la Q204, propuesta en este trabajo.

(B) Esta figura muestra los 5 motivos que conforman el sitio de unión de GTP en la subunidad $G_{\alpha 1}$ de rata. También muestra el acercamiento del residuo Q204 al fosfato gamma y al cofactor Mg^{2+} , lo cual demuestra su papel esencial en la estabilidad de GTP. Este modelo fue tomado de la base de datos PDB y pertenece la subunidad $G_{\alpha 1}$ de rata [214], sin embargo, el grado de identidad con Pga1 en los motivos del dominio GTPasa es del 100%. La estructura fue procesada con el programa Discovery Studio Visualizer v19.1.0.18287.

(C) Construcción del plásmido pPga1Q204Lp. 1) El primer paso fue la amplificación del gen *pga1* obteniéndose un fragmento de 2.7 kb y su ligación con el vector pJET1.2/blunt para obtener el plásmido pJpga1 de 5.7 kb. 2) El segundo paso fue la mutagénesis usando pJpga1 como molde. 3) El producto de la mutagénesis fue secuenciado para confirmar el cambio en los nucleótidos como muestra el electroferograma. 4) El cuarto paso consistió en ligar dos productos de digestión, uno proveniente del vector pBluescript KS(+), y otro del plásmido pJpga1, de 2.9 kb y 2.7 kb, respectivamente. El plásmido generado pBpga1Q204L (5.7 kb) fue digerido con *Bam*HI y *Cla*I para confirmar el patrón de bandas, obteniéndose un par de bandas de 3.0 y 2.6 kb con *Bam*HI, y otro par de bandas de 2.9 y 2.7 kb con *Cla*I. 5) El último paso consistió en la inserción del gen *pyrG* en

el plásmido pBpga1Q204L para obtener finalmente pPga1Q204Lp (7.2 kb). Este último fue obtenido después de ligar dos productos de digestión, uno de 1.4 kb correspondiente al gen *pyrG* y otro de 5.7 kb, correspondiente al plásmido pBpga1Q204L linealizado.

2.4.2. Selección y confirmación de cepas transformantes

Una vez construido el plásmido pPga1Q204Lp se procedió a transformar *P. chrysogenum* Wis54-1255 *pyrG*⁻. Tras la transformación de Wis54-1255 *pyrG*⁻ se obtuvieron 47 transformantes, que fueron propagadas para análisis posteriores. En general, se observó un fenotipo heterogéneo, es decir, se obtuvieron cepas con diferente grado de conidiación (**Fig. 7A**). Ya que era claro el fenotipo esperado, se eligieron aquellas cepas con un aspecto “*fluffy*” (micelio aéreo blanco [41, 215]), característico de cepas con alelos de activación constitutiva (al menos, según lo observado en hongos filamentosos Eurotiales). Es común observar variabilidad fenotípica en transformantes, aunque esto generalmente no se reporta [216]. Esta variabilidad puede ocurrir en diferentes grados, en algunas ocasiones los fenotipos entre cepas transformantes son contrastantes, y se pueden observar desde diferentes grados de conidiación, pigmentación, crecimiento, hasta diferentes grados de patogenicidad.

La correcta integración del plásmido pPga1Q204Lp en el genoma de Wis54-1255 *pyrG*⁻ se comprobó por PCR usando el par de oligonucleótidos *pyrG*-test y *pga1*-test-R (sección 2.3.4). Debido a que la integración del plásmido en el genoma es generalmente ectópica, se diseñó un par de oligonucleótidos para confirmar la presencia tanto de *pyrG* como del alelo *pga1*^{Q204L} (**Fig. 7B, C, D, E**). Este par de oligonucleótidos genera un fragmento de 2543 pb, suficiente para determinar la integridad de *pga1*. Se eligieron 9 de 47 transformantes que presentaron un fenotipo similar y más predominante entre todas las transformantes, a las cuales se les aisló el ADN genómico y se usó como molde para la PCR. Los productos de PCR fueron secuenciados para confirmar la integridad de la mutación Q204L (CAG→CTC) después de la integración en el genoma. De las 9 transformantes analizadas, 8 dieron positivo.

Finalmente, de las 8 transformantes positivas, se eligieron la 9 y la 12 para todos los ensayos posteriores, y fueron nombradas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L, nombres que se corresponden con el número original de transformante: 27 y 44, respectivamente.

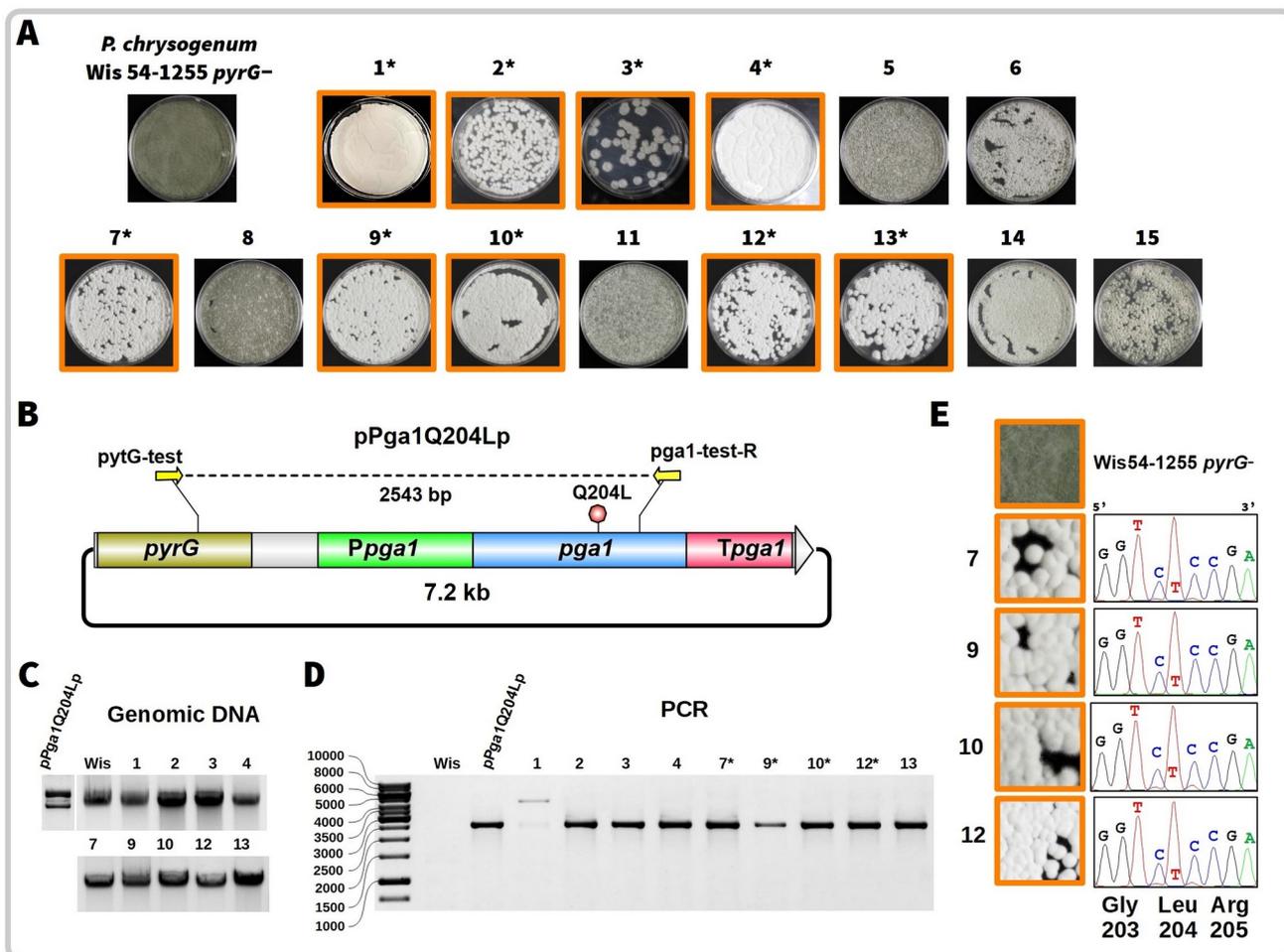


Fig. 7. Fenotipos y selección de transformantes.

(A) La imagen muestra 15 de las 47 transformantes. Las transformantes marcadas en naranja presentaron el fenotipo esperado (“fluffy”), ver también figura 9C. Las imágenes muestran 6 días de crecimiento en medio Power.

(B) Esquema general del plásmido pPga1Q204Lp, mostrando las posiciones de elementos como: el gen *pyrG*, alineamiento de los oligonucleótidos *pyrG-test* y *pga1-test-R*, promotor de *pga1* (*Ppga1*), *pga1* y el terminador de *pga1* (*Tpga1*). Además, se señala la posición de la mutación Q204L en la secuencia, la cual está incluida en el producto de PCR de 2543 pb.

(C) Extracciones de ADN. El primer carril corresponde a ADN plasmídico aislado de *E. coli* DH5α. El resto de los carriles corresponde al ADN genómico de las nueve transformantes seleccionadas.

(D) PCR de las nueve transformantes seleccionadas. Todas dieron positivo en el análisis de integración, a excepción de la 1 que presentó un patrón indeseado. Además, en el gel se incluyen dos controles, un control positivo que corresponde a una banda obtenida directamente del plásmido, y un control negativo correspondiente a la cepa Wis54-1255 donde no se observa banda. La banda esperada tenía un tamaño de 2543 pb.

(E) Secuenciación de los productos de PCR del análisis de integración. El codón esperado es CTC que codifica al residuo de leucina, tal como se muestra en los electroferogramas.

2.4.3. Producción de biomasa

Además de las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L, se incluyeron la cepas Wis54-1255 y $\Delta pga1$ cuyos genotipos se describen en la sección (2.3.1.1). Existen varios métodos para medir el crecimiento, uno de ellos es la cuantificación del peso seco. Esta cuantificación se determinó a partir del crecimiento en superficie sólida, usando medio de cultivo Power/agar con el fin de favorecer el crecimiento de micelio aéreo. Se pretendía evaluar, como ya se mencionó anteriormente, el efecto de Pga1 en dos tipos de cepas diferentes: una donde la actividad de Pga1 es constitutiva y otra donde Pga1 está ausente.

Una vez realizada la cinética de crecimiento, se observó una curva de crecimiento similar en todas las cepas (**Fig. 8A**). La cepa Wis54-1255 presentó una curva típica de crecimiento con fase exponencial y estacionaria bien diferenciadas, además de un ligero declive después de las 144 h. En el rango de las 72 y 144 h se observan comportamientos opuestos entre la cepa $\Delta pga1$, y las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L, respecto a la cepa Wis54-1255, un efecto probablemente provocado por la actividad de Pga1. Si se observan por separado, se aprecia una diferencia estadísticamente significativa entre $\Delta pga1$, y las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L en diferentes tiempos (**Fig. 8B**). Este resultado apunta a que Pga1 regula positivamente la producción de biomasa en medio sólido. El estudio más cercano y comparable con estos resultados se realizó en *N. crassa* [41], en el cual demostraron que los alelos $gna-1^{Q204L}$ y $gna-1^{R178C}$ se correlacionaron con un incremento en la producción de biomasa, mientras en $\Delta gna-1$ la producción fue reducida. Cabe mencionar que estas diferencias las encontraron a las 72 h, lo cual coincide con lo observado en este trabajo, aunque en este caso la cinética de crecimiento permitió identificar otros tiempos con diferencias en la producción de biomasa (**Fig. 8B**). La mayoría de los experimentos que implican el estudio de la subunidad G α se han conducido empleando el medio líquido como sistema de crecimiento y análisis, lo cual hace complicada una comparación objetiva de resultados. En otro trabajo se evaluó el alelo $pga1^{G42R}$, similar a $pga1^{Q204L}$, no observándose diferencias significativas en el patrón de crecimiento ni en la producción de biomasa en cultivo líquido entre las cepas NRRL 1951 (*P. chrysogenum*), PgaG42R-T ($pga1^{G42R}$) y GpdG42R-T ($pga1^{G42R}$) [108]. Por otro lado, García-Rico *et al.* (2011) concluyeron que la activación constitutiva de Pga1 favorece el

crecimiento vegetativo, aunque esta afirmación se refiere al crecimiento apical en medio sólido y no a la producción de biomasa.

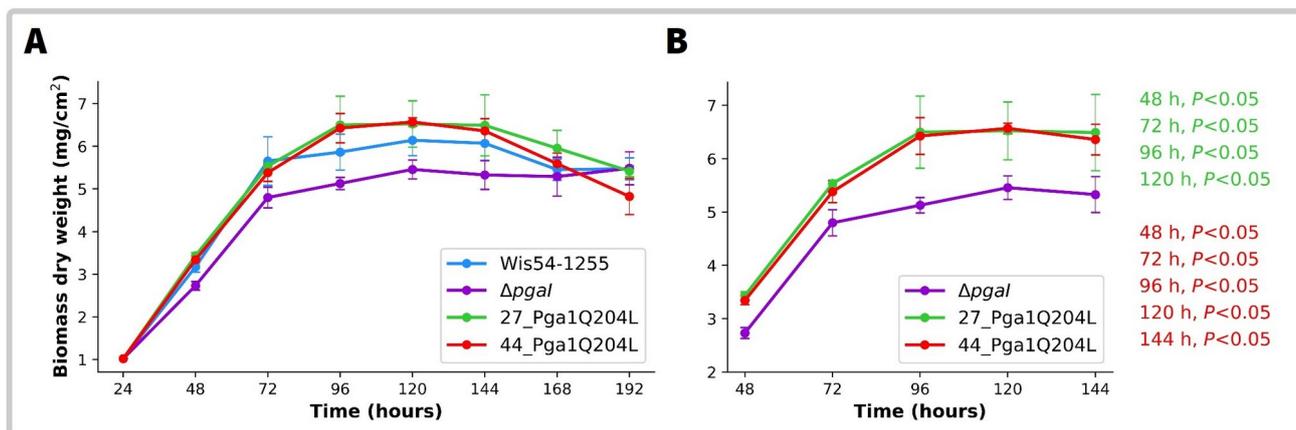


Fig. 8. Efecto de Pga1 sobre la producción de biomasa en medio sólido.

(A) Producción de biomasa de las cepas Wis54-1255, 27_Pga1Q204L, 44_Pga1Q204L y $\Delta pga1$. El ensayo se realizó en medio Power/agar. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

(B) Tiempos en los que se presentaron diferencias significativas entre las cepas $\Delta pga1$, 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L. $\Delta pga1$ vs 27_Pga1Q204L (en verde), y $\Delta pga1$ vs 44_Pga1Q204L (en rojo). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. Las diferencias significativas fueron determinadas aplicando una prueba de T ($P < 0.05$).

2.4.4. Crecimiento radial

La tasa de crecimiento radial es otra medida de crecimiento usada frecuentemente en el estudio de hongos filamentosos. Para este método se emplea una superficie sólida, tal como el agar, y se monitorea el crecimiento radial de las hifas vegetativas, las cuales forman un círculo. El incremento del radio de este círculo refleja la velocidad de crecimiento del hongo, que se obtiene a partir de una regresión lineal con el radio de la colonia (mm) en función del tiempo (h).

La tasa de crecimiento radial fue evaluada en tres medios de cultivo distintos con el fin de observar el efecto de la actividad de Pga1 sobre el crecimiento de *P. chrysogenum*. Los tres medios empleados fueron Czapek (un medio de cultivo definido), PDA (un medio de cultivo de uso general para varios hongos) y Power (un medio de cultivo complejo usado para esporulación). El crecimiento radial de las cepas fue lineal en todos los casos con coeficientes de correlación superiores a 0.9 indicando que la regresión lineal explica adecuadamente la variación del radio (crecimiento radial) en función del tiempo. En este resultado se vuelve a observar un comportamiento opuesto entre la cepa $\Delta pga1$, y las

cepas Wis54-1255, 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L (**Fig. 9A**). Este mismo comportamiento se observó en las cepas PgaG42Rpyr-T, GpdG42Rpyr-T, Wis54-1255, G203R-T y $\Delta pga1$ al someterlas a una temperatura de 37°C, donde $\Delta pga1$ tuvo una tasa de extensión apical relativa mayor que el resto de las cepas, en medio Czapek y Power [111]. Las cepas con el alelo $pga1^{Q204L}$ presentaron un comportamiento similar a la cepa Wis54-1255, aunque con una velocidad de crecimiento ligeramente inferior en PDA y Power (**Fig. 9A**). También se observó una velocidad de crecimiento mayor de todas las cepas en medio Power que en los medios Czapek y PDA.

Las cepas Wis54-1255, 27_Pga1Q204L y $\Delta pga1$ también fueron sometidas a un ensayo de respuesta a estrés oxidativo para evaluar el efecto de Pga1 (**Fig. 9B**). Se observa que 27_Pga1Q204L es hipersensible al estrés oxidativo comparada con Wis54-1255 y $\Delta pga1$. El alelo $pga1^{G42R}$ estudiado en otro trabajo, no presentó diferencias significativas en la respuesta a estrés oxidante, respecto a la cepa Wis54-1255 [111], lo cual apunta a que el efecto provocado por el alelo $pga1^{Q204L}$ es más extremo que el de $pga1^{G42R}$, tal como argumentan Bosch *et al.* (2012) y otros autores como Yu *et al.* (1999), y Yang y Borkivich (1999), quienes han estudiado el alelo Q204L y plantean que la actividad dominante de la subunidad G α causa pérdida de la actividad GTPasa intrínseca, la cual es esencial para inactivar la señalización por proteínas G heterotriméricas. Por otro lado, $\Delta pga1$ y Wis54-1255 mostraron mayor resistencia a varias concentraciones de peróxido de hidrógeno, aunque el crecimiento de $\Delta pga1$ fue superior. Los mismos comportamientos fueron observados en *N. crassa*, donde se demostró que la delección de *gna-1*, aunque produce poco micelio aéreo es más resistente a estrés térmico y oxidativo que la cepa parental, y los alelos $gna-1^{R178C}$ y $gna-1^{Q204L}$ aunque producen más micelio aéreo que la cepa parental son más sensibles a estrés oxidativo y térmico [41, 56]. Cabe señalar que $\Delta pga1$ presentó un crecimiento radial superior al de las cepas Wis54-1255 y 27_Pga1Q204L (**Fig. 9B**), y este comportamiento fue observado por García-Rico *et al.* (2011) al someter a la cepa $\Delta pga1$ y otras cepas a varios tipos de estrés como térmico, osmótico y oxidativo, demostrando que la tasa de extensión apical relativa siempre fue mayor al resto de cepas.

Estos resultados demuestran el importante papel de Pga1 en la respuesta a estrés oxidativo: al parecer Pga1 regula negativamente la respuesta a este y otros tipos de estrés, como el térmico y osmótico. En varias especies de hongos se ha correlacionado la producción de carotenoides con la protección contra estrés oxidativo [41, 217]. En *P.*

chrysogenum la presencia de pigmentos está relacionada igualmente con la respuesta a estrés oxidativo si estos tienen capacidad antioxidante como es el caso de los carotenoides; el alelo *pga1*^{Q204L} no produce ningún tipo de pigmento durante su crecimiento y presenta mayor sensibilidad a estrés oxidativo (Fig. 9B, C, pigmentación de colonia y de conidios), caso contrario al de Δ *pga1*, que produce pigmento y es resistente a varios tipos de estrés. Además, la cepa Q204L produce conidios no pigmentados (o albinos), lo que se logró observar en suspensiones de conidios, mientras que la Δ *pga1* produce conidios de color verde oscuro (Fig. 9C, inferior).

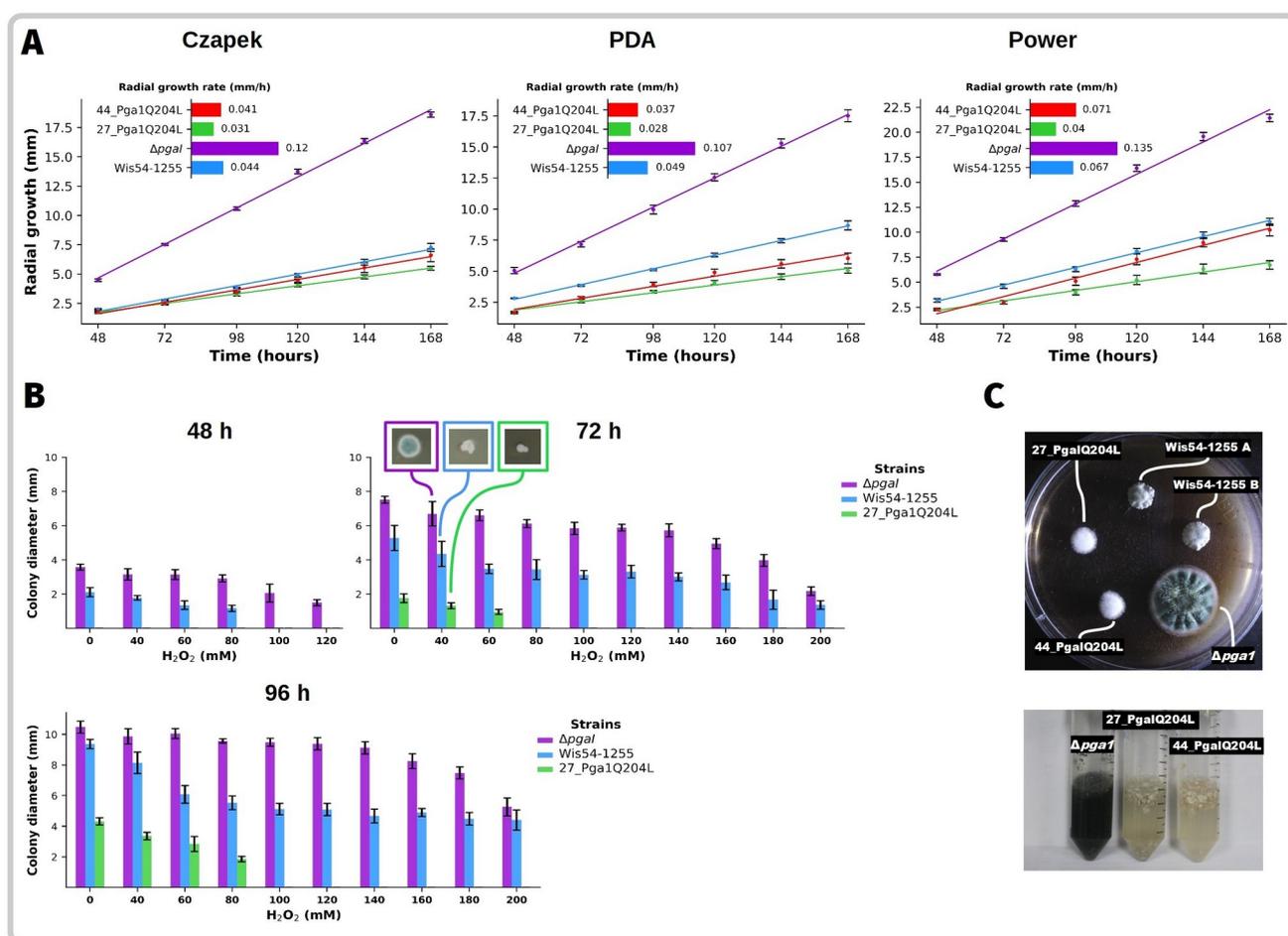


Fig. 9. Tasa de crecimiento radial en diferentes medios de cultivo.

(A) Comparación del crecimiento radial entre diferentes cepas. Los gráficos de barras insertados en el gráfico principal representan la tasa de crecimiento radial obtenida a partir de la regresión lineal del radio de las colonias en función del tiempo en horas. Para estimar la tasa de crecimiento radial se utilizó la ecuación de la recta $y = mx + b$, donde y es el radio de la colonia (mm), m es la tasa de crecimiento radial (mm/h), x es el tiempo (h) y b es una constante de la regresión lineal.

(B) Los gráficos muestran una comparación del crecimiento radial de las cepas Wis54-1255, 27_Pga1Q204L y Δ *pga1* en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂ con el fin de evaluar su respuesta a estrés. A las 72 h se muestra un conjunto de micrografías pertenecientes a Δ *pga1*,

Wis54-1255 y 27_Pga1Q204L mostrando el grado de pigmentación y su relación con la resistencia a estrés oxidativo.

(C) Crecimiento radial de diferentes cepas en medio Power suplementado con extracto de planta (*Hibiscus sabdariffa*, el cual provoca la esporulación en *P. chrysogenum*), foto tomada a las 72 h de crecimiento para observar la diferencia fenotípica entre las cepas. La imagen inferior muestra el grado de pigmentación en suspensiones de conidios aislados de cajas de Petri con medio Power después de 6 - 7 días de incubación a 27°C.

2.4.5. Efecto de Pga1 en la conidiación

La conidiación es otro de los procesos regulados por la subunidad Gal, lo que se ha demostrado en varios hongos filamentosos con aplicaciones industriales, fitopatógenos, entomopatógenos y patógenos. Dicha subunidad no provoca un único patrón sobre el control de la conidiación: en algunos casos se han observado efectos drásticos llegando a suprimir por completo la formación de conidióforos, en otros hongos ocurre sólo una reducción parcial sin inhibir este proceso por completo, y con menos frecuencia, no provoca efectos sobre la conidiación (**Fig. 10A**). Cabe señalar, que la conidiación y otros procesos como la producción de metabolitos secundarios, la patogenicidad y el crecimiento vegetativo, se encuentran regulados diferencialmente en varias especies.

En condiciones ambientales favorables, los conidios producen micelio joven y esta propiedad es aprovechada para múltiples aplicaciones: por ejemplo, el uso de conidios de *P. camemberti* como cultivo iniciador en la elaboración de queso [218]. Los conidios son el principal medio de reproducción, propagación e infectividad en los hongos filamentosos. En especies de *Penicillium* se han identificado cuatro estados morfogénicos relacionados con la conidiación: **1)** una vez que se induce la conidiación (hora 0) se detiene el crecimiento apical de las hifas vegetativas, **2)** después de 4 horas, las células apicales son septadas y comienzan a hincharse, con la concomitante formación de extensiones subapicales, **3)** después de 6 horas, las células apicales se diferencian en fiálides, **4)** de las fiálides brota el primer conidio, y a partir de este paso, aproximadamente cada hora se forma el siguiente conidio resultando en una cadena de conidios en sucesión basipétala [219]. Los conidios son formados en estructuras asexuales especializadas llamadas conidióforos, los cuales se desarrollan de forma programada por varios elementos genéticos directos de la expresión de genes y por varios reguladores responsables de la progresión de cada estado [173]. La conidiación es controlada por una vía reguladora central conformada por tres factores de

transcripción [168]: BrlA, AbaA y WetA (**Fig. 10B**), además de otros reguladores indirectos de este proceso.

Hasta el momento, la mutación Q204L ha sido estudiada específicamente en ocho hongos filamentosos, y en estos estudios se ha destacado la conidiación como uno de los procesos más importantes regulado por la subunidad Gal (**Fig. 10B**). Además de estos ocho trabajos, existe otro trabajo en *T. atroviride* [103], en el cual construyen un alelo de *tga1*, ortólogo de *fadA* de *A. nidulans* o de *gna-1* de *N. crassa*, nombrado Q203L, sin embargo, los resultados de este trabajo son cuestionables ya que al realizar un alineamiento de secuencias entre Tga1 de *T. atroviride* y varias subunidades Gal de varios hongos filamentosos, en la posición 203 de Tga1 *T. atroviride* se encuentra un residuo de glicina y no una glutamina, la glutamina se encuentra en la posición 204. Y, ya que esto genera confusión, este trabajo no fue tomado en cuenta para discusión en esta tesis, aunque encontraron efectos importantes de la subunidad Tga1 sobre la conidiación o algún otro proceso.

Para evaluar el efecto de Pga1 en el desarrollo asexual, se llevó a cabo una cinética de conidiación en diferentes cepas durante 8 días de crecimiento en medio Power. La primera observación que se hizo fue que las cepas mostraron diferencias morfológicas. Las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L presentaron pocos conidióforos, con escasos conidios en su estructura y de tamaño superior a los conidios de $\Delta pga1$ (**Fig. 10C**). Por otro lado, la cepa $\Delta pga1$ presentó conidióforos con estructura normal, portando largas cadenas de conidios, incluso más que en la cepa Wis54-1255 (**Fig. 10C**). Un efecto similar sobre la morfología fue observado en *M. oryzae*, donde el alelo *magB*^{Q204L} provocó cambios en la morfología de los conidios respecto a las cepas *magB*(G42R) y parental, generando conidios más largos y delgados [42]. Con estos resultados Bosch *et al.* (2012), aclarando un poco la controversia con la mutación G42R, concluyeron que las mutantes G42R presentan fenotipos diferentes a las mutantes Q204L deficientes en actividad GTPasa, y que esto era consistente con las confirmaciones estructurales, bioquímicas y experimentales obtenidas sobre la actividad GTPasa de la subunidad G α . Aunque no es directamente relacionado con la mutación Q204L, la delección en *S. tritici* de *MgGpa1* provocó defectos en la morfología de las esporas, generando esporas más largas que en la cepa parental [152], lo cual también habla del papel de la subunidad G α en la morfología.

En la cinética de conidiación se observó una drástica disminución la conidiación en las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L, alcanzando diferencias de hasta 2 - 4 órdenes de

magnitud con respecto a las cepas Wis54-1255 y $\Delta pga1$ (**Fig. 10D**). Otra observación que se hizo fue que las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L presentaron un retraso en la conidiogénesis de hasta 28 h respecto a Wis54-1255 y $\Delta pga1$, iniciando su producción de conidios entre las 56 y 72 h (**Fig. 10E**). Las cepas Wis54-1255 y $\Delta pga1$ comenzaron su ciclo conidiogénico entre las 24 y 28 h, aunque posteriormente $\Delta pga1$ incrementó su producción gradualmente. Aunque existen varios estudios sobre el papel regulador de la subunidad Gal en la conidiación, en pocos se menciona si la activación constitutiva o la delección retrasó o aceleró la conidiogénesis. En un trabajo con *T. reesei*, aunque no mencionan el tiempo aproximado, describen que la activación constitutiva de *gna1* (*gna1*^{Q204L}) retrasó la esporulación y redujo la formación de esporas un 30%. En otro estudio con *T. harzianum*, describen que la delección de *tga1*, ortólogo de *fadA* de *A. nidulans*, provoca un retraso de la conidiogénesis de aproximadamente 20 h [220].

La conidiación también fue evaluada en los medios Czapek, PDA y Power a las 72 y 168 h (**Fig. 10F**). A diferencia de la mutante PgaG42R-T de *P. chrysogenum* [109], las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L con el alelo *pga1*^{Q204L} presentaron una represión completa de la conidiación en los medios Czapek y PDA. En algunos hongos, la activación constitutiva de Gal ha tenido efectos drásticos sobre la conidiación: por ejemplo, en el hongo filamentoso *C. parasitica*, la mutación Q204L provocó la inhibición completa de la conidiación [221], a tal grado de impedir la realización de algunos experimentos, y en *P. marneffeii* la mutación G42R reprimió la expresión de *brlA* y en consecuencia la conidiación [120].

Después de ver estos resultados, se observa que la conidiación requiere de al menos una inactivación parcial de la señalización mediada por las proteínas G heterotriméricas. Cabe señalar que muchos de los enfoques usados para comprender el papel de las proteínas G heterotriméricas en la conidiación y otros procesos relacionados con el desarrollo de los hongos, se han dirigido a nivel transcripcional, sin explorar otros niveles de regulación que están presentes en la célula y que pueden tener impacto en el desarrollo, tal como la fosforilación de las proteínas, tema que se discute en el Capítulo 3 de esta tesis.

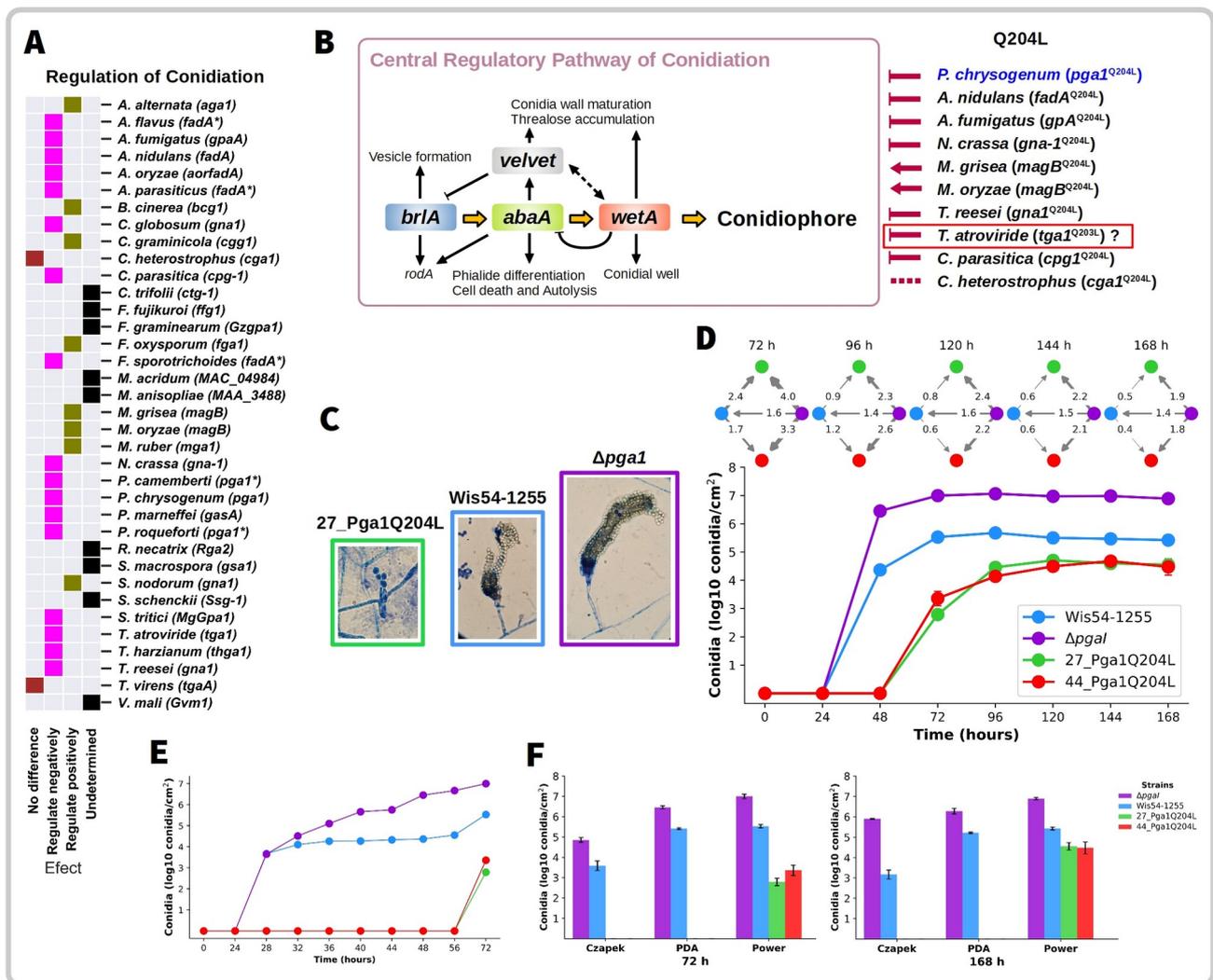


Fig. 10. Conidiación en *P. chrysogenum*.

(A) Regulación de la conidiación de hongos filamentosos en los cuales se ha estudiado la subunidad Gal. El asterisco en el nombre de algunos genes indica que se usó un gen heterólogo de una especie relacionada, porque no se ha descrito o porque la delección era letal como en el caso de *A. flavus* [71].

(B) Vía reguladora central de la conidiación en especies de *Aspergillus* (Figura modificada de [222]). Lado derecho de la figura: hongos filamentosos en los cuales se ha estudiado el alelo Q204L y sus efectos observados sobre la conidiación (líneas terminadas en barra indican regulación negativa, líneas terminadas en flecha indican regulación positiva y líneas punteadas indican que no produce un efecto significativo). En el caso de *P. chrysogenum* fue el resultado observado en esta tesis, aunque esto ya se había concluido previamente en un estudio con el alelo *pga1*^{G42R}. El hongo dentro del recuadro rojo indica que los resultados son cuestionables, revisar en [103].

(C) Morfología de conidióforos en tres cepas diferentes. Micrografías a 100 aumentos tomadas a las 72 h a partir de microcultivos en medio Power.

(D) Efecto de Pga1 en la conidiación de *P. chrysogenum* en medio Power. La producción de conidios se muestra como el log10 de conidios/cm² para mejor visualización. Los grafos en la parte superior de la cinética muestran los órdenes de magnitud que existen entre las cepas en horas con mayor producción de conidios, y la dirección de flechas indica el sentido en que fue calculado el orden de magnitud considerando como punto de partida las cepas con mayor cuenta de conidios.

- (E) Cinética de conidiación de las primeras 72 h para ilustrar la diferencia entre cepas del inicio de la conidiación.
- (F) Efecto de Pga1 en la conidiación de *P. chrysogenum* en diferentes medios de cultivo.

2.4.6. Efecto de Pga1 sobre los niveles intracelulares de cAMP

En general, todos los hongos filamentosos han desarrollado la capacidad de percibir condiciones ambientales y responder adecuadamente; es decir, son capaces de detectar cambios en la disponibilidad de nutrientes, de pH, de oxígeno, de temperatura y cambios en la osmolaridad. Las vías de transducción de señales juegan un papel importante en estos mecanismos de percepción, respuesta y adaptación, y una de ellas es la vía de señalización cAMP/PKA. Esta vía ha sido implicada en procesos de respuesta a estrés, metabolismo, desarrollo y virulencia [223], y se ha relacionado con la germinación de esporas [224]. La vía cAMP/PKA incluye a dos componentes clave, la enzima adenilato ciclasa y la PKA. La activación de la adenilato ciclasa por GTP-G α cataliza la conversión de ATP (“*Adenosine triphosphate*”) a cAMP. La molécula de cAMP actúa como un mensajero secundario que activa a PKA provocando la liberación de las subunidades catalíticas e iniciando así una cascada de fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina, incluyendo otras cinasas y factores de transcripción. Finalmente, los niveles de cAMP son regulados por fosfodiesterasas, las cuales convierten el cAMP en 5'-AMP [225].

Para determinar en qué forma Pga1 regula los niveles intracelulares de cAMP en *P. chrysogenum*, se midieron los niveles de este mensajero en micelio vegetativo incubado en medio sólido Power, en un tiempo en el cual la cuenta de conidios de cada cepa alcanzó el 5% de su punto máximo de conidiación (**Fig. 11A**), y teniendo en cuenta su comportamiento en la conidiogénesis, observado en la cinética de conidiación descrita en la sección anterior (sección [2.4.5](#)). Este planteamiento se hizo con el fin de evitar sesgos en los resultados: este método permite controlar el estado fisiológico del hongo ya que el comportamiento de las cepas es diferente, sobre todo considerando el retraso de la conidiación de las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L, y otro objetivo del planteamiento es la evaluación de etapas tempranas de la conidiación, con el fin de relacionar los niveles de cAMP, la activación de la vía cAMP/PKA y la fosforilación de proteínas, tema que se discute en el siguiente capítulo.

El conteo de conidios en las cepas 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L fue tan escaso que sus puntos máximos de conidiación apenas alcanzaron el 0.5 y 10% de los puntos máximos de conidiación de las cepas Wis54-1255 y $\Delta pga1$, respectivamente (**Fig. 11A**). El punto máximo de conidiación de Wis54-1255 respecto a $\Delta pga1$ fue de apenas el 10.7%. Teniendo en cuenta este efecto, se observó que las cepas con el alelo $pga1^{Q204L}$ presentaron niveles elevados de cAMP intracelular, tres veces más que Wis54-1255 y siete veces más que $\Delta pga1$ (**Fig. 11B**). Estos resultados demuestran que Pga1 regula positivamente los niveles intracelulares de cAMP. Esta regulación positiva sobre los niveles de cAMP se refleja en la mayoría de los hongos en los que se ha estudiado, pero también existen excepciones. En las cepas donde ha sido estudiada la mutación Q204L se han observado patrones distintos sobre la regulación del cAMP (**Fig. 11C**). Por ejemplo, el alelo $magB^{Q204L}$ de *M. grisea* regula negativamente los niveles de cAMP, y aunque en *M. oryzae* no fue determinado, es posible que tenga el mismo efecto. En *C. parasitica* la delección de *cpg-1* incrementó los niveles de cAMP y, aunque tampoco fue determinado, cabe la posibilidad que una activación constitutiva de *cpga-1* provoque el efecto contrario, reduciendo los niveles de cAMP. Por otro lado, en las cepas *N. crassa* y *T. reesei*, los alelos de activación constitutiva incrementaron los niveles de cAMP. Y en *P. chrysogenum* se estudió el alelo $pga1^{G42R}$ y se observaron los mismos resultados.

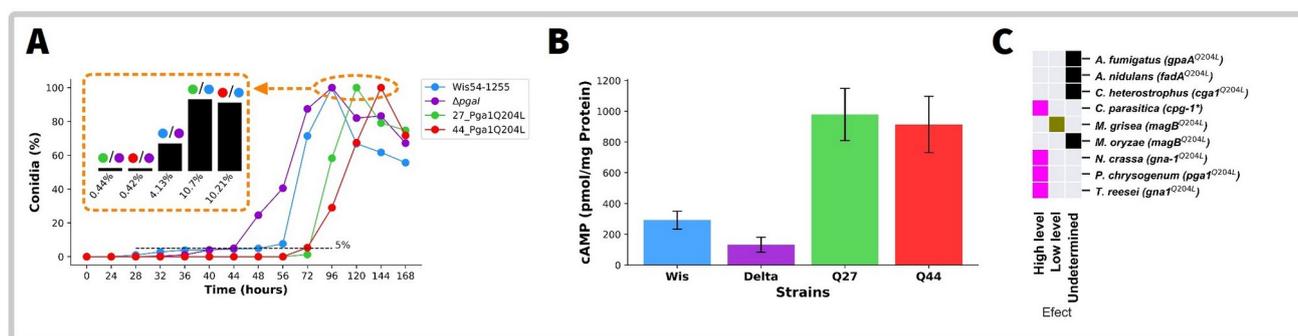


Fig. 11. Regulación de los niveles intracelulares de cAMP en *P. chrysogenum*.

(A) Producción máxima de conidiación. Porcentaje de conidios estimado a partir del punto máximo (tomado como el 100%) de conidiación de cada cepa. La línea negra punteada indica el 5%. El óvalo naranja señala los puntos máximos de conidiación de las cuatro cepas. El recuadro naranja representa las diferencias en la conidiación entre cepas, obtenidas a partir de los puntos máximos, y los puntos de colores se corresponden con la leyenda del lado derecho.

(B) Concentraciones de cAMP intracelular obtenidas a las 44 ($\Delta pga1$), 48 (Wis54-1255), 75 (27_Pga1Q204L) y 72 horas (44_Pga1Q204L) de cultivo en medio sólido Power, que es cuando cada cepa obtiene el 5% de conidios respecto a su punto máximo de conidiación.

(C) Regulación de los niveles de cAMP intracelular en hongos filamentosos en los que se ha estudiado la mutación Q204L. En el caso de *C. parasitica*, el resultado en el “*heatmap*” corresponde al efecto provocado por la delección de *cpga-1* debido a que no se evaluó el alelo *cpga-1*^{Q204L}.

2.5. Conclusiones

1. Se amplificó y clonó el gen *pga1*, y a partir de éste se obtuvo el alelo *pga1*^{Q204L} de activación de constitutiva.
2. Se obtuvieron varias cepas transformantes con el alelo *pga1*^{Q204L}, de las cuales se eligieron dos con el mismo fenotipo: 27_Pga1Q204L y 44_Pga1Q204L, para el análisis fenotípico y fosfoproteómico.
3. Los resultados de la cinética de conidiación muestran que la activación constitutiva afecta drásticamente a la producción de conidios, reduciendo los niveles en varios órdenes de magnitud respecto a la cepa parental. Con esto se demuestra que Pga1 regula negativamente la conidiación. Estos resultados también permitieron observar que la activación constitutiva de Pga1 puede retrasar la conidiogénesis hasta por 28 horas, y además provocar cambios morfológicos importantes en la estructura de los conidióforos.
4. El proceso de conidiación es un proceso clave del desarrollo de *P. chrysogenum* y requiere al menos de una inactivación parcial de la señalización mediada por Pga1 para llevarse a cabo, de lo contrario se reprime o se retrasa.
5. La activación constitutiva de Pga1 redujo ligeramente la tasa de crecimiento radial de *P. chrysogenum* en los medios de cultivo PDA y Power.
6. Pga1 regula negativamente la respuesta a estrés oxidativo.
7. Pga1 regula positivamente los niveles de cAMP, incrementándose los niveles hasta dos veces más que en la cepa parental.

Capítulo 3

“Shotgun phosphoproteomics”

3.1. Introducción: fosfoproteómica en hongos filamentosos

La fosfoproteómica es una excelente herramienta para estudiar cambios globales en la fosforilación de proteínas de un organismo. A pesar de los enfoques proteómicos disponibles, la fosfoproteómica ha sido poco utilizada en los hongos filamentosos. Los estudios que existen del tema han sido publicados en los últimos seis años, y se reducen a un limitado número de hongos, incluyendo *N. crassa* [226, 227], *S. tritici* [228], *M. oryzae* [229, 230, 231], *A. nidulans* [232, 233, 234], *A. flavus* [235], *A. fumigatus* [236, 237], *B. cinerea* [238, 239, 240], *F. graminearum* [241, 242], *Alternaria brassicicola* [238], *P. brasiliensis* [243], *B. bassiana* [244], *T. reesei* [245] y *S. macrospora* [246, 247]. Estos estudios han revelado resultados interesantes, facilitando la comprensión de los mecanismos de patogenicidad y permitiendo identificar múltiples procesos regulados por la fosforilación de proteínas, incluyendo localización celular, plegamiento de proteínas, transporte de membrana, vías de señalización, respuesta a estrés oxidativo, crecimiento micelial, regulación durante la formación de apresorio, conidiación, metabolismo en conidios, metabolismo de fosfolípidos, autofagia, integridad de la pared celular, biosíntesis de aflatoxinas, disponibilidad de fuentes de carbono, producción de deoxinivalenol, secreción de enzimas hidrolíticas, morfogénesis, inducción de celulasas mediada por luz, osmorregulación, almacenamiento de carbono, tráfico intracelular, citoesqueleto, represión de la fotosíntesis y regulación de genes de celulasas. El estudio de la fosforilación de proteínas incrementa el grado de profundidad a la hora de elucidar cómo funciona un proceso o procesos, y es especialmente útil para estudiar en detalle la señalización intracelular. Algunos de estos estudios han combinado la fosfoproteómica con otros enfoques como proteómica o transcriptómica, o una combinación de tres enfoques como el publicado por Xiong *et al.* [226], haciendo más robusta la identificación de patrones de regulación, y sobre todo la conexión entre niveles de regulación, espacial y temporalmente diferentes y altamente complejos. Es de esperar que la fosfoproteómica adquiera mayor importancia en varios ámbitos, aunque esto dependerá en gran medida de las nuevas tecnologías de análisis de péptidos y de la implementación de nuevos y más eficientes algoritmos bioinformáticos capaces de procesar grandes volúmenes de datos sin requerir de un excesivo poder computacional. También es probable que se implementen nuevas metodologías para optimizar y hacer más sensible la identificación de la fosforilación.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Identificar efectores y vías de señalización relevantes reguladas por Pga1 en *P. chrysogenum* por el método “*shotgun phosphoproteomics*”, y establecer su relación con el proceso de conidiación del hongo.

3.2.2. Objetivos específicos

- Mediante el método “*shotgun phosphoproteomics*”, obtener el perfil global de fosforilación de las tres cepas con diferente actividad de Pga1.
- Comparar los fosfoproteomas de las tres cepas mencionadas.
- Identificar sitios diferencialmente fosforilados en las tres cepas.
- Identificar efectores y vías de transducción de señales relevantes reguladas por Pga1 y su relación con el proceso de conidiación.
- Anotar funcionalmente todas las fosfoproteínas identificadas en este estudio.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Microorganismos

Se emplearon las cepas Wis54-1255, $\Delta pga1$ y 44_Pga1Q204L, descritas en la sección [2.3.1](#).

3.3.2. Condiciones de cultivo y recolección de micelio

- 1 | Propagar 25 conidios/mm² en la superficie de una placa de 150 x 15 mm (nonTC Petri FALCON) con medio Power/agar.
 - ▶ El inóculo corresponde a 450 μ L de una suspensión 1E6 conidios/mL.
- 2 | Incubar a 27°C durante 44, 48, y 72 h para $\Delta pga1$, Wis54-1255 y 44_Pga1Q204L, respectivamente.
 - ▶ Los tiempos se corresponden con el 5% del punto máximo de conidiación para cada cepa (**Fig. 11A**).
- 3 | Recuperar cuidadosamente el micelio con una espátula metálica y depositarlo en un tubo de 50 mL.
 - ▶ **NOTA:** asegurarse de eliminar todo el agar posible.

3.3.3. Obtención, cuantificación y digestión de proteínas intracelulares

- 1 | Macerar el micelio con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido.
- 2 | Resuspender el polvo obtenido en 15 mL de buffer: 6 M Tris-HCl, 6 M Urea, 5 mM 1,4-ditiotreitol (DTT), pH 7.4.
 - ▶ **NOTA:** el buffer es suplementado con inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) y fosfatasas (Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific).
- 3 | Homogenizar la mezcla durante 30 min, manteniendo siempre las muestras en hielo.
 - ▶ Homogenizador: ULTRA-TURRAX® T 18 basic/S18N-19G (IKA), ajustado en modo 2, equivalente a 7200 \pm 200 rpm.
- 4 | Clarificar el extracto proteico por centrifugación a 10000 rpm durante 20 min (Pro-Analytical Small Centrifuge) y recuperar el sobrenadante.
- 5 | Mezclar el sobrenadante con solución de precipitación (ácido tricloroacético (TCA) 20% (P/v), DTT 0.14% (P/v), en acetona).
- 6 | Precipitar las proteínas a -20°C toda la noche.
- 7 | Lavar dos veces el precipitado de proteínas con acetona al 100%, seguido de un lavado final con acetona al 80%.
- 8 | Resuspender las proteínas precipitadas en solución de rehidratación/solubilización (50 mM Tris-HCl, 6 M urea, pH 8.0).
- 9 | Determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford [248].
 - ▶ Cuantificación de proteínas en microplaca: 160 μ L de muestra, 40 μ L de reactivo de Bradford, incubar 5 min a temperatura ambiente, cuantificar a 595 nm en un Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek). La concentración final se determina a partir de una curva patrón realizada con el estándar albúmina bovina.
- 10 | Añadir 10 mM de DTT a 3 mg de proteína e incubar a 37°C durante 1 h, con el fin de reducir puentes disulfuro y otros grupos oxidados de las proteínas.
- 11 | Adicionar iodoacetamida en una concentración final de 15 mM e incubar 30 min a temperatura ambiente.
- 12 | Diluir la muestra con tres volúmenes de Tris-HCl 50 mM pH 8.0.
- 13 | Digerir la muestra con Trypsin from porcine pancreas Proteomics Grade (Sigma-Aldrich) e incubar a 37°C durante 18 h.

- 14 | Desalar los péptidos usando cartuchos HyperSep™ C18 (Thermo Scientific).
 - ▶ Protocolo para desalar péptidos: **1)** lavar dos veces la columna con un volumen de ácido trifluoroacético al 0.25%, **2)** adicionar la mezcla de péptidos y eluirlos usando vacío, **3)** lavar las columnas 3 veces con un volumen de ácido trifluoroacético 0.25%, **4)** eluir los péptidos con un volumen de acetonitrilo 80%, ácido fórmico 0.1% usando el accesorio HyperSep™ Glass Block 24 port Vacuum Manifolds (Thermo Scientific) acoplado a una bomba de vacío Rocker 400 Oil Free (Rocker Scientific Co., Ltd.).
- 15 | Liofilizar los péptidos desalados en un equipo FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Console Freeze Dry System (Labconco) durante 6 h.

3.3.4. Enriquecimiento de fosfopéptidos

El enriquecimiento de fosfopéptidos se llevó a cabo usando el kit comercial High-Select™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment Kit (Thermo Scientific). Los fosfopéptidos resultantes fueron secados en un Savant™ SPD131DDA SpeedVac™ Concentrator (Thermo Scientific), antes de su análisis por LC-MS/MS.

3.3.5. Análisis de fosfopéptidos por espectrometría de masas

Los fosfopéptidos fueron enviados como un servicio externo al Montreal Clinical Research Institute (IRCM)/Proteomics discovery platform, Montreal, QC, Canada, para su análisis por nanoLC-MS/MS. Los resultados fueron entregados en formato *.sf3 compatible con Scaffold Viewer v4.11.0. Todos los espectros MS2 fueron exportados (Export > Spectra... > All Spectra > File type: Mascot MGFs > Export) en formato *.mgf ("*Mascot generic files*"). Estos archivos contienen información sobre el tiempo de retención, valores m/z, intensidades y estados de carga de péptidos precursores y de iones de precursores.

3.3.6. Análisis y procesamiento de datos

3.3.6.1. Programas informáticos, bioinformáticos y módulos

- 1 | Trans-Proteomic Pipeline (TPP, v5.2.0 Flammagenitus) [249] es una colección de herramientas para análisis de espectros MS2, desarrollado en el Seattle Proteome Center (SPC). TPP emplea programas como PeptideProphet [250] para validar péptidos y ProteinProphet [251] para validar proteínas, asegurando de esta forma la calidad del análisis de datos.
 - ▶ **NOTA:** descarga desde: https://sourceforge.net/projects/sashimi/files/Trans-Proteomic_Pipeline/, ver instrucciones de instalación en [TPP:5.2_Installation](#).
- 2 | Python v3.6.7: existen muchos lenguajes de programación para desarrollar herramientas bioinformáticas, así como para procesar grandes volúmenes de datos. Python se ha vuelto un lenguaje de programación popular en las biociencias gracias a i) su semántica y sintaxis simple, ii) está adaptado a la programación orientada a objetos, es decir, este tipo de programación es cercano a cómo expresamos las cosas en la vida real, y iii) la disponibilidad de módulos y bibliotecas multipropósito [252].
 - ▶ **NOTA:** Python es descargado desde [python-3.6.7](#), e instalado con permisos de administrador activando la casilla: Add Python 3.6 to PATH.
- 3 | Jupyter Notebook: es una aplicación web interactiva de código abierto estructurada en formato JSON, con la cual los usuarios pueden procesar texto, procedimientos matemáticos, imágenes y datos, mismos que pueden ser exportados en otros formatos de archivo como HTML, LaTeX, PDF, Python, etc. La ventaja de usar Jupyter Notebook radica en que es un documento que registra el proceso completo de todo un algoritmo de programación, pudiendo ejecutar de forma independiente

cada una de sus partes y explorar los resultados, además de tener el control total del proceso en ejecución.

► **NOTA:** para instalar *jupyter notebook* ver <https://jupyter.org/install>.

- 4 | Módulos adicionales de Python: requests v2.22.0, pandas v0.24.2, scipy v1.3.0, openpyxl v2.6.2.

► **NOTA:** descargar el instalador: [install_python_modules](#), e instalar como administrador.

3.3.6.2. Construcción de una base de datos *target-decoy*

- 1 | Descargar el proteoma de *P. chrysogenum* en formato fasta ([500485.fasta](#)), con última actualización el 9 de noviembre de 2018.

► **NOTA:** es recomendable descargar el proteoma a partir de UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) porque los identificadores están ligados a múltiples bases de datos como la ontología genética ("*Gene Ontology: GO*"), facilitando la anotación funcional de proteínas.

- 2 | Descargar secuencias de proteínas encontradas como contaminantes comunes en experimentos de proteómica.

► **NOTA:** estas secuencias se encuentran depositadas en el repositorio común de proteínas adventicias ("*common Repository of Adventitious Proteins: cRAP*", <https://www.thegpm.org/crap/>), versión 1.0 con última actualización el 04 de marzo de 2019.

► **NOTA:** esta base de datos (*crap.fasta*) comprende 116 secuencias y se descarga a partir de: <ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP/crap.fasta>.

- 3 | Concatenar las secuencias descargadas en los dos pasos anteriores.

► **NOTA:** para concatenar usar algún editor de texto como Visual Studio Code v1.36.1.

- 4 | Crear una base de datos "*target-decoy*" en TPP usando la aplicación "*Decoy Databases*" en modalidad "*Randomize sequences and interleave entries*".

► **NOTA:** la base de datos "*target-decoy*" se genera con secuencias señuelo ("*decoy*") generadas a partir del proteoma ("*target*").

3.3.6.3. Identificación de fosfopéptidos y fosfoproteínas

La interfaz gráfica de TPP permite el uso de múltiples aplicaciones para analizar espectros MS2; sin embargo, esta modalidad restringe varias opciones de sus componentes, pudiéndose perder algún tipo de información relevante. Por lo tanto, con el fin de tener mayor control sobre el análisis de los datos, éste fue realizado en Jupyter notebook de forma automatizada usando las opciones de línea de comandos.

- 1 | Convertir los archivos *.mgf a formato *.mzXML con el programa MSConvertGUI v3.0.19113-cee25be0b de ProteoWizard [253].

- 2 | Procesar los archivos *.mzXML con Jupyter notebook.

► **NOTA:** los espectros MS2 son comparados contra la base de datos *target-decoy* con el motor de búsqueda Comet 2018.01rev.4 [254] (<http://comet-ms.sourceforge.net/>).

La validación de los péptidos se realizó con los algoritmos estadísticos PeptideProphet [250] y ProteinProphet [251], ambos incluidos en TPP, con la ayuda de un script personalizado construido en lenguaje Python.

3.3.7. Análisis de residuos de aminoácidos que flanquean el sitio de fosforilación

- 1 | Extraer todos los péptidos alineados con una longitud de 13 aminoácidos ("*nonphospho 13-mers*", xxxxxx[S/T/Y]xxxxxx, donde x es cualquier aminoácido) a partir del proteoma completo de *P. chrysogenum*.

- ▶ **NOTA:** Para esto se usaron comandos en lenguaje de Perl compartidos por los Dres. Ming-kun Yang y Feng Ge [255].
- 2 | Extraer todos los péptidos fosforilados “*phospho 13-mers*” con el fosfotio en el centro.
 - ▶ **NOTA:** Para esto se usó un “*script*” personalizado en lenguaje de Python usando como referencia el proteoma de *P. chrysogenum* para localizar las posiciones exactas.
- 3 | A partir de los dos conjuntos de secuencias alineadas se determina el log2 de las frecuencias (frecuencia de residuos “*phospho 13-mers*” frecuencia de residuos “*nonphospho 13-mers*”) y se representa en un gráfico “*Heatmap*”.

3.3.8. Anotaciones funcionales

En este contexto, una anotación es una declaración funcional a partir de bases de datos biológicas especializadas. Generalmente los organismos menos estudiados carecen de este tipo de información, por lo tanto, uno de los enfoques para conocer un poco más sobre estos organismos es la búsqueda de homólogos. En seguida se muestran las bases de datos usadas para asignaciones y predicciones funcionales de las fosfoproteínas identificadas en este trabajo.

- 1 | **KEGG** (vApril 1, 2020).
[<https://www.kegg.jp/>]
- 2 | **UniProtKB** (vApril 10, 2018).
[<https://www.uniprot.org/>]
- 3 | **QuickGO** (v2020-08-04).
[<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>]
- 4 | **PFAM** (v33.1, May 2020).
[<http://pfam.xfam.org/>]
- 5 | **SMART** (2020).
[<http://smart.embl-heidelberg.de/>]
- 6 | **STRING** (v11.0). Parámetros: “*all active interaction sources*”, “*minimum required interaction score = medium confidence 0.4*”, “*hide disconnected nodes in the network activated*”. [<https://string-db.org/>]
- 7 | **AspGD** (2008-2020). [<http://www.aspgd.org/>].
- 8 | **WoLF PSORT II**. Parámetros: Fungi. [<https://wolfpsort.hgc.jp/>]
- 9 | **ProtComp** (v9.0) . Parámetros: “*Predict the sub-cellular localization for Animal/Fungi proteins*”.
[<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>]
- 10 | **NeVOmics** (2019). Parámetros: FDR 5%, UniProtKB vJun2020, KEGG vJul2020.
[<https://github.com/bioinfproject/bioinfo>].
- 11 | **Blastp** (v2.8.1). Parámetros: “*Evaluate 1E-6*”.
[<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>].

El uso de programas y la manipulación de datos e información fue realizada en Jupyter Notebook de Python.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Estrategia para el análisis fosfoproteómico

Con el fin de identificar efectores de la vía de las proteínas G heterotriméricas mediada por Pga1, se llevó a cabo un perfil fosfoproteómico por el método “*label-free*” para identificar proteínas fosforiladas. Este método deriva de la estrategia proteómica “*Bottom-up*” que consiste en analizar los péptidos de una mezcla compleja de proteínas, y en este contexto, la identificación de las proteínas se realiza por una aproximación “*Shotgun*” o de segunda generación, la cual consiste en un análisis directo y rápido de la mezcla de péptidos resultantes de una digestión enzimática [256].

Para este propósito se realizó la estrategia que se describe a continuación (**Fig. 12**). Se aisló el gen *pga1* y se construyó el alelo dominante de activación constitutiva *pga1*^{Q204L}, para posteriormente obtener cepas mutantes portando la subunidad G α Pga1 constitutivamente activa. Después de una selección de transformantes positivas se eligió la cepa 44_Pga1Q204L para el fosfoproteoma, la cual fue usada también en ensayos fenotípicos como extensión radial, respuesta a estrés oxidativo, conidiación y regulación de niveles intracelulares de cAMP (descrito en el Capítulo 2). Además de la cepa 44_Pga1Q204L, fueron incluidas en el análisis fosfoproteómico las cepas Wis54-1255 y Δ *pga1*, con el fin de comparar cepas con diferentes niveles de actividad de Pga1. Las cepas Δ *pga1*, Wis54-1255 y 44_Pga1Q204L fueron incubadas a 27°C en medio Power/agar durante 44, 48, y 72 h, respectivamente, tiempos que se corresponden con una producción del 5% de conidios respecto a su punto máximo de conidiación. Esta estrategia tenía como fin comparar el fosfoproteoma de las diferentes cepas en el momento en que se inicia en cada una de ellas el proceso de diferenciación para la formación de conidios.

Se extrajeron las proteínas intracelulares de las cepas y los extractos crudos fueron digeridos con tripsina en solución. Los péptidos fosforilados fueron enriquecidos con columnas de TiO₂ y cargados a cartuchos de C-18 de fase reversa para ser desalados. Los péptidos enriquecidos fueron secuenciados por nanoLC-MS/MS e identificados con el motor de búsqueda Comet. Las proteínas identificadas fueron anotadas funcionalmente usando bases de datos especializadas.

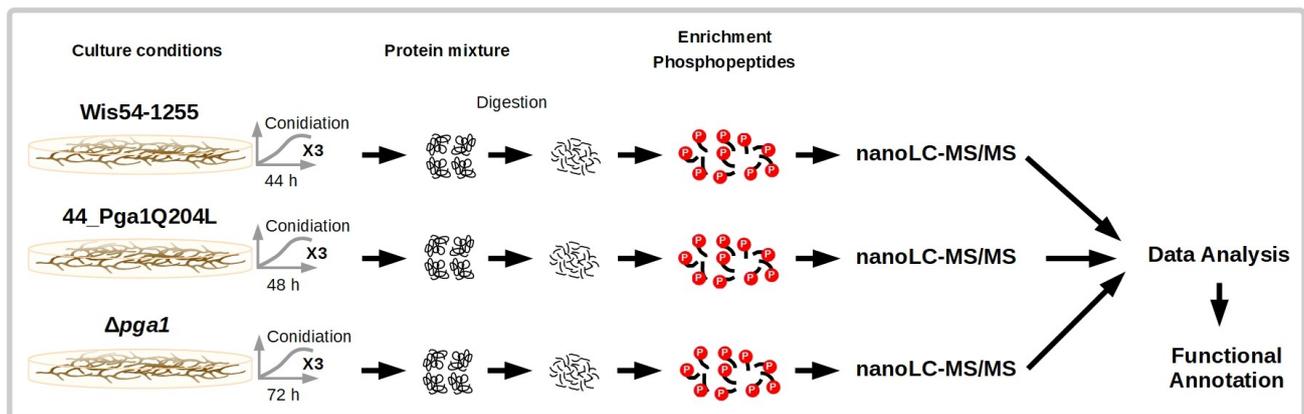


Fig. 12. Flujo de trabajo general del análisis fosfoproteómico.

El experimento se realizó por triplicado, partiendo de las cepas incubadas a 27°C en medio Power/agar. Para el análisis de los datos y la anotación funcional, todos los resultados fueron concatenados y analizados en un solo paquete de datos.

3.4.2. Asignación de péptidos a espectros

Los motores de búsqueda (“*search engines*”) son algoritmos que se encargan de asignar espectros a secuencias peptídicas [257]. Estos algoritmos elaboran patrones de digestión teóricos a partir de proteínas de alguna base de datos, generando secuencias peptídicas y espectros teóricos de fragmentación de las mismas. Para cada espectro de fragmentación experimental, el motor realiza una búsqueda de la secuencia peptídica que contenga el mismo patrón teórico de masas de fragmentación, o al menos similar. Finalmente, a la asignación de una secuencia a un espectro se le llama Asignación Péptido-Espectro (“*Peptide Spectrum Match*”). Existen varios motores de búsqueda, SEQUEST® es uno de ellos y el primero en correlacionar los espectros con secuencias de aminoácidos, y actualmente es uno de los más usados. Comet MS/MS [258], es un programa escrito en C++ diseñado para la búsqueda de espectros de masas de péptidos en bases de datos de secuencias con el fin de identificar péptidos y proteínas. Este programa está basado en SEQUEST®, y fue el motor de búsqueda usado en este trabajo (ver sección 3.3.6.3).

Los parámetros de búsqueda usados para la asignación de espectros a los fosfopéptidos obtenidos en este trabajo fueron: **1)** una base de datos Target/Decoy compuesta del proteoma de *P. chrysogenum* extraído de UniProtKB (con última actualización el 9 de noviembre de 2018), **2)** “*precursor mass tolerance*”: 10 Da, **3)** “*missed cleavages*”: 2, **4)** “*digest mass range*”: 300 – 8000 Da, **5)** “*static modification*”: +57.021464

Da en residuos de cisteína por formación de “*S-carboxamidomethyl-Cys*” por iodoacetamida, y 6) “*variable modifications*”: Met -17.026549 Da, S/T/Y +79.966331.

Una vez asignados los espectros a péptidos, esos fueron validados con los algoritmos de postprocesamiento PeptideProphet [250] y ProteinProphet [251], los cuales establecen probabilidades a partir de subpoblaciones de espectros correcta e incorrectamente asignados empleando un método de Bayes empírico (un procesamiento de inferencia estadística basada en la distribución de los datos).

3.4.3. Análisis global de calidad de los fosfopéptidos

3.4.3.1. Análisis de datos crudos

Los experimentos de proteómica mediante “*shotgun*” siempre generan grandes cantidades de datos, y es importante analizar su comportamiento para encontrar posibles irregularidades y/o tomar decisiones para análisis posteriores, ya que de estos dependen todos los resultados. Una ventaja para algunos, y/o desventaja para otros, es que el uso de programas de código abierto da acceso a toda la información que puede generar un análisis proteómico, por lo tanto, no se pierde información, lo cual siempre es deseable, sin embargo, al utilizar programas en entorno gráfico, debido a que tienen control total de los datos, la mayoría de las veces omiten información y el usuario no puede acceder a ella, lo cual puede ser una desventaja.

La calidad de los datos es un recurso importante cuando se realiza este tipo de experimentos: da confiabilidad y valor a los resultados. El primer análisis consistió en una exploración de los datos crudos de la secuenciación de fosfopéptidos, es decir, un análisis global del comportamiento de las réplicas, tomando todos los datos obtenidos con el motor de búsqueda Comet, y los algoritmos PeptideProphet y ProteinProphet, pero sin aplicar ningún filtro.

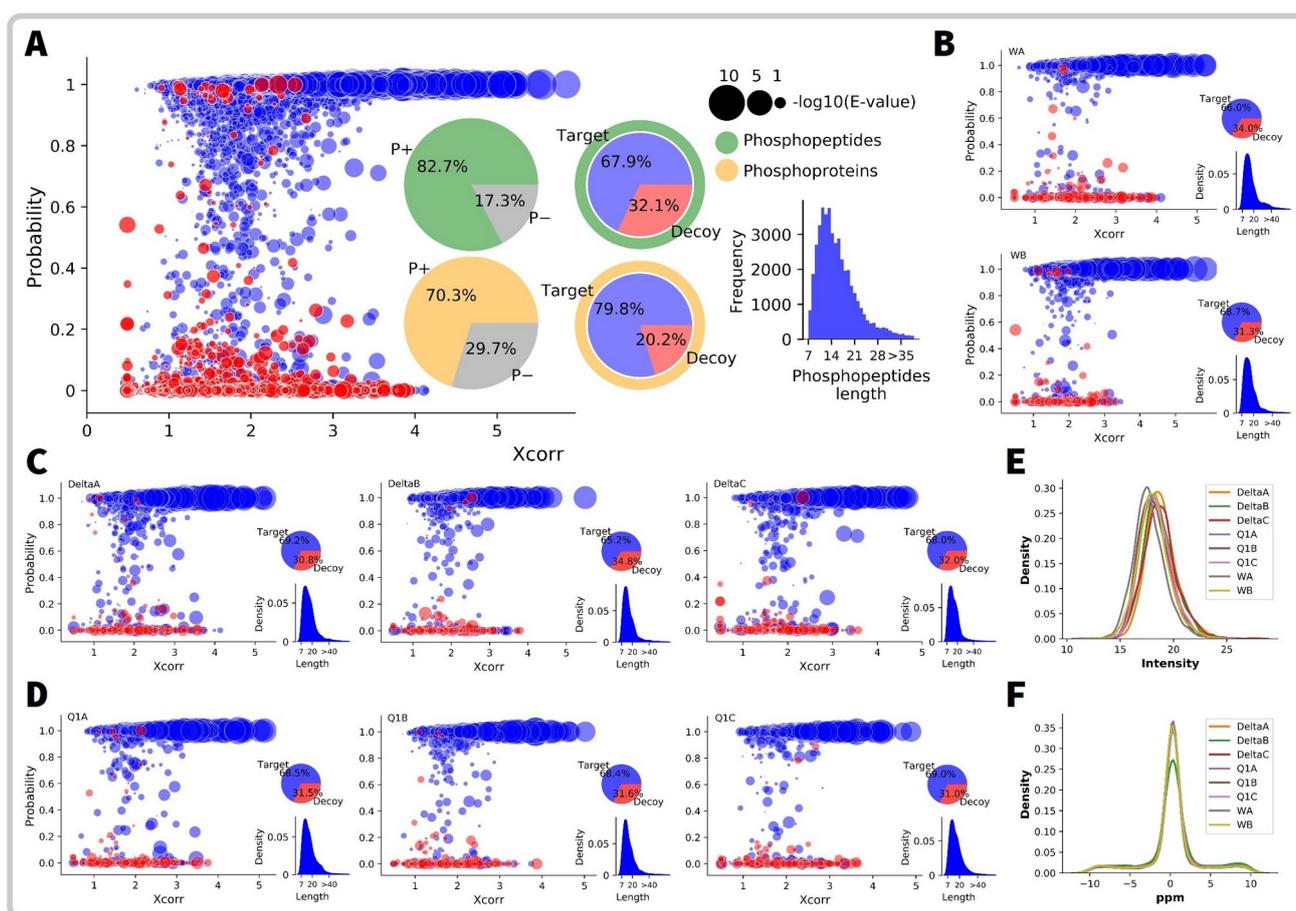
Para este análisis se consideraron los parámetros de probabilidad, E-value, Xcorr (“*cross correlation Score*”), intensidad del ion precursor, error de masa (ppm) y longitud de los péptidos. La probabilidad asignada a cada péptido por PeptideProphet es una puntuación de confianza de que un espectro se asignó correctamente. El factor paramétrico Xcorr es calculado por el motor de búsqueda Comet, y es una puntuación de correlación entre espectros teóricos y experimentales asignada a cada espectro. Este

factor es una medida de calidad para identificar falsos positivos, algunos autores recomiendan usar valores superiores a 1.5 [259]. Al relacionar la probabilidad y Xcorr se observa una separación entre péptidos asignados correctamente y péptidos incorrectos, encontrándose a la mayoría de los péptidos correctos por arriba del 80%, mientras que la mayoría de los incorrectos se encuentran por debajo del 20% (**Fig. 13A**, distribución de los puntos). También en los datos se observa una tendencia hacia los valores de mayor probabilidad, agrupándose aquellos péptidos con menor E-value, lo que quiere decir que es más probable que las asignaciones sean significativas (**Fig. 13A**, diámetro de los puntos).

Considerando la estrategia experimental y la especificidad del método de enriquecimiento de fosfopéptidos, se alcanzó un 82.7% de péptidos fosforilados y un 17.3% de péptidos no fosforilados, demostrando una alta especificidad el método de enriquecimiento. Resultados similares se han encontrado en otros enfoques fosfoproteómicos [260]. En este 82.7% de péptidos fosforilados, el 67.9% correspondió a péptidos asignados correctamente, y el 32.1% correspondió a péptidos asignados incorrectamente. Los péptidos asignados incorrectamente permiten hacer estimaciones estadísticas y obtener la mejor puntuación: aunque cerca del 50% sean incorrectos, se asume que la asignación de un espectro a cualquiera de estas secuencias fue al azar y son ignorados. Por otro lado, el 82.7% de péptidos fosforilados correspondió al 70.3% de proteínas fosforiladas, mientras que el 17.3% correspondió al 29.7% de proteínas no fosforiladas. Dentro de este 70.3%, el 79.8% correspondió a proteínas con péptidos correctamente asignados, mientras que el 20.2% fue para secuencias de proteínas creadas artificialmente (**Fig. 13A**, gráficos circulares). Se observó que la longitud de la mayoría de los péptidos osciló entre 7 y 22 aminoácidos, lo cual es consistente con las propiedades conocidas de los péptidos trípticos (**Fig. 13A**, histograma) [261].

Otra característica observada en los datos (solo péptidos fosforilados, a partir de 82.7%) es que hay reproducibilidad en las réplicas de cada una de las tres cepas (Wis54-1255, 44_Pga1Q204L y $\Delta pga1$), su comportamiento fue similar, tanto en los péptidos asignados correctamente como en las longitudes de los péptidos obtenidos, incluyendo los valores de significancia (E-value) (**Fig. 13B, C, D**). Estos resultados preliminares demuestran la calidad de los datos, con sesgos esperados en cuanto a probabilidades y significancias.

Tomando sólo los péptidos fosforilados de los datos crudos (el 82.7%, **Fig. 13A**), se observaron las distribuciones de las intensidades del ion precursor de los péptidos y el error de masa. La intensidad del ion precursor hace referencia al área bajo el pico MS1 de un péptido específico previo a la fragmentación, y en técnicas de “*label-free*” se emplean estos valores para hacer cuantificaciones y determinar proteínas diferencialmente expresadas. En este contexto, se observó que la distribución de las intensidades en todas las réplicas fue similar (**Fig. 13E**). Por otro lado, la distribución de error de masa fue cercano a 0 en todas las réplicas, y la mayoría fue menor de 10 ppm, equivalente a más del 99% de todos los péptidos obtenidos, lo cual habla de la precisión de las masas (**Fig. 13F**).



las proteínas con péptidos sin fosforilar (gris). El gráfico circular inferior derecho muestra los porcentajes de proteínas fosforiladas correctamente asignadas (azul) e incorrectas (rojo).

(B) Distribuciones de Xcorr, probabilidad, E-value y longitud de péptidos fosforilados en las réplicas de la cepa Wis54-1255: WA y WB. El gráfico circular representa la cantidad de péptidos fosforilados asignados correcta e incorrectamente.

(C) Distribuciones de Xcorr, probabilidad, E-value y longitud de péptidos fosforilados en las réplicas de la cepa $\Delta pga1$: DeltaA, DeltaB y DeltaC. El gráfico circular representa la cantidad de péptidos fosforilados asignados correcta e incorrectamente.

(D) Distribuciones de Xcorr, probabilidad, E-value y longitud de péptidos fosforilados en las réplicas de la cepa 44_Pga1Q204L: Q1A, Q1B y Q1C. El gráfico circular representa la cantidad de péptidos fosforilados asignados correcta e incorrectamente.

(E) Distribución de las intensidades de todas las réplicas normalizadas con la función \log_2 .

(F) Distribución de los errores de masa ("*ppm: parts-permillion*") en todas las réplicas.

3.4.3.2. Análisis global de los péptidos fosforilados

Las secuencias señuelo o "*Decoy*" permiten estimar la tasa de falsos descubrimientos ("*False Discovery Rate: FDR*") o falsos positivos [262], y este componente es la prueba estadística más ampliamente utilizada en experimentos de proteómica y fosfoproteómica. El concepto FDR en este análisis se refiere a la proporción de parejas péptido-espectro ("*Peptide-Spectrum Match: PSM*") incorrectos que se aceptan en todo el conjunto de PSM del experimento para un umbral elegido, por ejemplo 1%.

El conjunto de datos previamente descrito fue sometido a un corte de un FDR del 1% (equivalente a una probabilidad del 0.94 para fosfopéptidos), y además fueron eliminados los fosfopéptidos incorrectamente asignados (Decoy) y los péptidos no fosforilados. En un primer filtro se recuperaron 18530 fosfopéptidos, los cuales corresponden a 2187 fosfopéptidos únicos, obteniéndose un total de 1165 fosfoproteínas (**Fig. 14A**). Hasta este punto, la validación da cierta certeza de que los fosfopéptidos fueron asignados correctamente, obteniéndose una cuenta de fosfopéptidos considerable en todo el experimento, sin embargo, se observó que varios fosfopéptidos validados también aparecen en el conjunto de datos que no pasó el corte (fosfopéptidos con un FDR > 1%), aunque con probabilidades inferiores a 0.94, incluso algunos con probabilidad de 0. Debido a que los fosfopéptidos validados tienen un soporte estadístico y con el fin de no perder información, se procedió a recuperar fosfopéptidos idénticos a partir del conjunto de fosfopéptidos con FDR > 1%, usando un algoritmo personalizado. Después de realizar este procedimiento fueron recuperados 3538 fosfopéptidos, pasando de 18530 a 22068 fosfopéptidos en total. No obstante, la cantidad de fosfopéptidos únicos fue la inicial porque

no se recuperaron fosfopéptidos diferentes a los que ya se encontraban a un FDR del 1%, y la cantidad de fosfoproteínas tampoco cambió (**Fig. 14A**). Para el algoritmo PeptideProphet el FDR del 1% fue equivalente a una probabilidad de 0.94 para fosfopéptidos, y de 0.85 para proteínas con el algoritmo ProteinProphet (**Fig. 14B**). Varios enfoques proteómicos dependen del punto isoeléctrico para la asignación de péptidos, por lo que durante la secuenciación de estos péptidos se calcula un punto isoeléctrico teórico que es usado como criterio de identificación [263]. La distribución de los puntos isoeléctricos teóricos obtenidos a partir del motor de búsqueda permite observar una abundancia de péptidos fosforilados dependiente del punto isoeléctrico, obteniendo un sesgo hacia valores en el rango de 3 a 5 (**Fig. 14C**). Se ha demostrado que los puntos isoeléctricos de los péptidos decrecen después de la fosforilación debido a un reemplazo de los grupos hidroxilo en residuos de serina/treonina/tirosina por grupos fosfato cargados negativamente [264]. También se ha observado una reducción en los errores de masa de los péptidos fosforilados a un FDR del 1%: la mayoría se encontró con menos de 2 ppm, lo que refleja la precisión de las asignaciones péptido-espectro (**Fig. 14D**). Para saber las propiedades hidrofílicas de los fosfopéptidos, estos fueron sometidos a un análisis de hidrofobicidad (usando comandos de python) con base en dos escalas conocidas, la de Kyte y Doolittle (1982) [265], y la de Wimley y White (1996) [266] (**Fig. 14E**). Los resultados obtenidos de la iteración muestran una tendencia: la mayoría de los péptidos presentan valores de hidrofobicidad inferiores a 45% con la escala de Kyte y Doolittle (1982), e inferiores a 30% con la escala de Wimley y White (1996), y en general todos muestran un comportamiento hidrofílico. Estos resultados concuerdan con el método de enriquecimiento empleado que favorece la retención de péptidos hidrofílicos. Son considerados péptidos hidrofílicos si más del 25% de residuos son cargados y menos del 25% de residuos son hidrofóbicos, y se consideran péptidos hidrofóbicos si presentan entre el 50 y 75% de residuos hidrofóbicos (éstos podrían ser parcialmente solubles en solución acuosa aún si contienen un 25% de residuos cargados) [267].

Todas las réplicas presentaron fosfopéptidos y fosfoproteínas en común (**Fig. 14F, G**). Los datos fueron visualizados con el módulo UpSet [268], ahora implementado en Python. En estas visualizaciones se observan los grados de intersección y cantidad de fosfopéptidos, y fosfoproteínas obtenidas por cada réplica. Las tres cepas, Wis54-1255, 44_Pga1Q204L y $\Delta pga1$, compartieron 487 fosfopéptidos en total, las cepas 44_Pga1Q204L y $\Delta pga1$ compartieron 757 fosfopéptidos, Wis54-1255 y 44_Pga1Q204L

635 fosfopéptidos, y Wis54-1255 y $\Delta pga1$ 622 fosfopéptidos (**Fig. 14H**). Respecto a las proteínas, Wis54-1255, 44_Pga1Q204L y $\Delta pga1$ compartieron 397 fosfoproteínas en total, las cepas 44_Pga1Q204L y $\Delta pga1$ compartieron 530 fosfoproteínas, Wis54-1255 y 44_Pga1Q204L 488 fosfoproteínas, y Wis54-1255 y $\Delta pga1$ 465 fosfoproteínas (**Fig. 14I**).

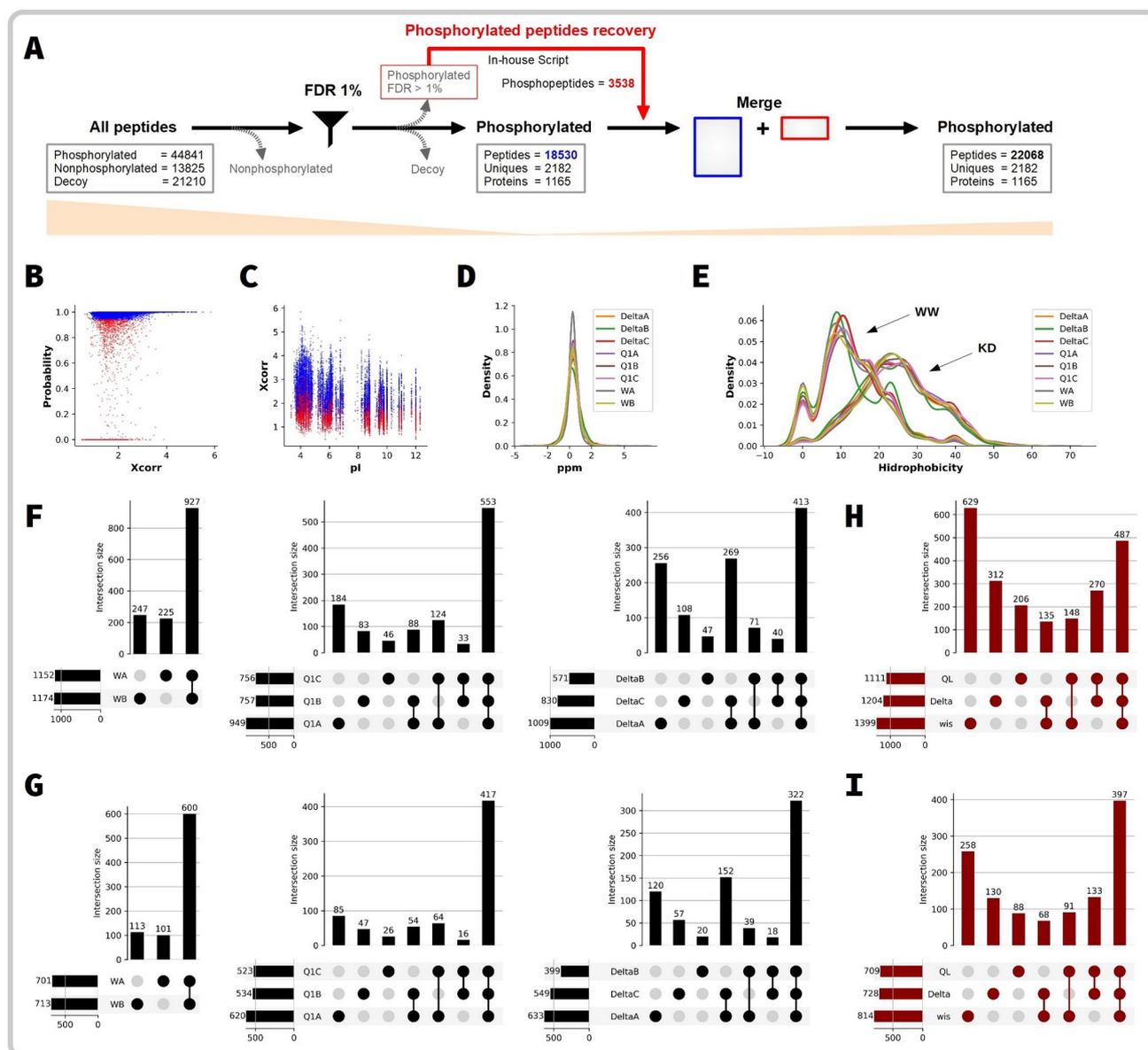


Fig. 14. Depuración y calidad de los datos después de aplicar un FDR del 1%.

(A) Obtención final de péptidos fosforilados a un FDR del 1%. También se muestra la recuperación de 3538 fosfopéptidos a partir de fosfopéptidos que no pasaron el corte de FDR.

(B) Distribución global de los fosfopéptidos usando los parámetros Xcorr y probabilidad. En azul se muestran los fosfopéptidos que superaron el FDR del 1%, y en rojo los fosfopéptidos recuperados.

(C) Distribución de los puntos isoeléctricos de todos los fosfopéptidos. En azul se muestran los fosfopéptidos que superaron el FDR del 1%, y en rojo los fosfopéptidos recuperados.

(D) Distribución del error de masa (ppm). Nomenclatura (para las figuras D, E, F, G y H) Wis: Wis54-1255, QL: 44_Pga1Q204L y Delta: $\Delta pga1$. Este gráfico muestra sólo fosfopéptidos con probabilidad mayor o igual a 0.94.

- (E) Distribución de los porcentajes de hidrofobicidad de los fosfopéptidos. Para la predicción se usaron dos escalas de hidrofobicidad: **KD**: Kyte y Doolittle (1982) y **WW**: Wimley y White (1996).
- (F) Intersecciones entre fosfopéptidos en todas las réplicas.
- (G) Intersecciones entre fosfoproteínas en todas las réplicas.
- (H) Intersecciones entre fosfopéptidos en las tres cepas.
- (I) Intersecciones entre las fosfoproteínas en las tres las cepas.

La distribución final de la longitud de los fosfopéptidos a un FDR del 1% osciló entre 7 y 32 residuos de aminoácidos, la mayoría entre 9 y 17, y el número más alto se observó en fosfopéptidos de 11 aminoácidos (**Fig. 15A**).

La fosforilación de las proteínas es un mecanismo de regulación sumamente importante en la mayoría de los procesos celulares. Más de un tercio de los eventos de fosforilación ocurren en los residuos de serina, treonina y tirosina, de los cuales el 86% ocurren en serina, el 12% en el residuo de treonina y el 2% en el residuo de tirosina [269] [270]. En este estudio se identificaron 2812 fosfositos únicos en las 1165 fosfoproteínas, de los cuales 2223 (79.1%) corresponden a fosforilaciones en residuos de serina, 510 (18.1%) en residuos de treonina y 79 (2.8%) en residuos de tirosina (**Fig. 15B**).

La fosforilación puede ocurrir en uno o más residuos de aminoácidos dentro de una proteína, encontrando proteínas mono-, di-, tri- o híperfosforiladas. Un trabajo reciente en el cual estudian la regulación de proteínas Tau, asociadas a microtúbulos neuronales ("*microtubule-associated protein: MAP*"), reveló que la híperfosforilación de estas proteínas está ligada a interacciones proteína-proteína y a la modulación de propiedades de regiones intrínsecas desordenadas ("*intrinsically disordered regions: IDRs*"). Además, en enfermedades como Alzheimer y otras tautopatías se exhibe una híperfosforilación de las proteínas Tau [271], este es un claro ejemplo de la importancia y el impacto del grado de fosforilación en las proteínas en general, ya que puede estar regulando múltiples procesos.

Con el fin de evaluar el grado de fosforilación, se realizó una clasificación de las fosfoproteínas con base a la cantidad de fosfositos únicos identificados en su secuencia. La clasificación permitió obtener 16 grupos de fosfoproteínas, es decir, fosfoproteínas con diferentes grados de fosforilación. Aproximadamente el 45% (524 fosfoproteínas) de las fosfoproteínas identificadas presentó un solo fosfosito en su secuencia, este incluye residuos de serina, treonina o tirosina. Otros grupos presentan de 2 a 9 fosfositos únicos, y un conjunto menor presenta 10 o más fosfositos (**Fig. 15C**). Algunos autores han reportado el conteo de fosfoproteínas en función del número de fosfopéptidos únicos

identificados. Sin embargo, este enfoque no brinda suficiente información sobre los sitios de fosforilación por proteína, es decir, este conteo no contempla si un fosfopéptido único presenta dos sitios de fosforilación. Por ello, en el presente trabajo se decidió realizar el análisis por número de fosfositos. Hasta este punto, llama la atención el haber identificado proteínas híperfosforiladas, ya que pueden estar implicadas en múltiples procesos relacionados con el desarrollo de *P. chrysogenum*.

A partir de esta clasificación se obtuvo un perfil global de todos los patrones de fosforilación identificados en todas las fosfoproteínas (**Fig. 15D**). Cabe mencionar que este perfil muestra la suma de todos los fosfositos identificados en el fosfoproteoma. El grupo 1 de 524 fosfoproteínas con un fosfositio está conformado por 460 proteínas fosforiladas en una única serina, 59 en una única treonina y 5 en una única tirosina. El segundo grupo de 260 fosfoproteínas con dos fosfositos únicos está conformado por 172 proteínas fosforiladas en dos serinas, 68 en una serina y en una treonina, 13 con una serina y una tirosina, 6 con dos treoninas, y 1 fosfoproteína con una treonina y una tirosina (**Fig. 15D**). En este fosfoproteoma se identificaron 64 combinaciones entre los 3 residuos de aminoácidos. Dentro de estas combinaciones, 27 fosfoproteínas presentaron fosforilación en los tres residuos de aminoácidos, y como es de esperarse, la fosforilación en un fosfositio es la más predominante.

La distribución de residuos fosforilados en las cepas fue similar (**Fig. 15E**), no se observa ninguna tendencia, a diferencia de Wis54-1255 que presentó un ligero incremento en el número de fosforilaciones en serina y una ligera reducción en fosforilaciones de treonina y tirosina respecto a las cepas 44_Pga1Q204L y $\Delta pga1$. Aunque las diferencias no son significativas, estas pequeñas diferencias pueden significar cambios importantes.

La distribución de los fosfositos y el perfil global de los patrones de fosforilación dan una idea de la complejidad de la fosforilación en las proteínas, y de su importancia en el desarrollo de *P. chrysogenum*. Como es de esperar, el grado de fosforilación fue diverso y diferente entre condiciones (**Fig. 15F**). Este análisis permite observar la presencia de fosfoproteínas únicas, con fosfositos únicos. Resultan interesantes aquellas proteínas únicas por condición ("*Phosphoprotein sets*"), ya que su ausencia en otra condición podría determinar el comportamiento de esa condición. Cabe señalar que esta distribución no refleja diferencias en las abundancias de las fosfoproteínas, ni fosforilación diferencial, es decir, diferencias dependientes de la cantidad de fosfopéptidos, aquí solo se muestran los distintos patrones de fosforilación identificados en el fosfoproteoma.

3.4.3.3. Análisis de residuos de aminoácidos flanqueando el sitio fosforilado

Los determinantes de la especificidad de las cinasas por su sustrato no son bien conocidos, aunque se sabe que el motivo de fosforilación (residuo fosforilado y aminoácidos circundantes) y la estructura tridimensional de la proteína diana contribuyen a esta especificidad [272]. Conocer la distribución de los residuos de aminoácidos circundantes al residuo fosforilado es el primer acercamiento hacia la predicción de las posibles cinasas implicadas en la fosforilación. En primer lugar, se revisó la distribución de frecuencias de residuos de aminoácidos en péptidos no fosforilados extraídos de todo el proteoma de *P. chrysogenum*, con residuos de serina/treonina/tirosina en la séptima posición ($X_{-1}X_{-2}X_{-3}X_{-4}X_{-5}X_{-6}[S/T/Y]X_{+1}X_{+2}X_{+3}X_{+4}X_{+5}X_{+6}$, donde x representa cualquier aminoácido). Este resultado permitió obtener una distribución inespecífica en las posiciones de los péptidos. A continuación, se determinó la abundancia relativa de residuos de aminoácidos en todos los fosfopéptidos prealineados ("*phospho 13-mer*") identificados en este estudio. En este análisis ya se observa un sesgo en la distribución de frecuencias, se logran identificar algunos residuos de aminoácidos altamente frecuentes en posiciones específicas (**Fig. 16A**).

Un análisis de enriquecimiento muestra con más detalle los residuos de aminoácidos sobrerrepresentados respecto al proteoma. En este estudio se observa que el residuo de prolina ("*Proline: P*") fue el más enriquecido en la posición +1 en péptidos fosforilados en serina/treonina, mientras que el residuo de arginina ("*Arginine: R*") fue enriquecido en la posición -3 en fosfopéptidos que contienen serina/treonina/tirosina. Además de estos residuos, se observan otros menos enriquecidos en posiciones específicas, sin embargo, sus valores se ven opacados con los altos niveles de prolina y arginina (**Fig. 16B**). Este resultado sugiere que la fosforilación es efectuada principalmente por un grupo de cinasas dirigidas por prolina y basófilas, las cuales pueden ser PKA, PKC y MAP cinasas, entre otras. A partir de todos los fosfopéptidos alineados se intentó representar la secuencia consenso en forma de "*Sequence Logos*" con el programa PhosphoLogo [273] con el fin de identificar visualmente los residuos de aminoácidos en cada posición en cada conjunto de fosfopéptidos, con serina/treonina/tirosina centralizada (**Fig. 16C**). El enriquecimiento y la representación "*Sequence Logos*" nos muestra los residuos más sobrerrepresentados, sin embargo, no permite identificar motivos de fosforilación.

El siguiente paso consistió en realizar una clasificación de los fosfopéptidos de acuerdo con sus propiedades hidrofílicas, esto permite un acercamiento hacia el tipo de cinasa implicada en la fosforilación (como se mencionó anteriormente, esta es una propiedad que contribuye con la especificidad de las cinasas). Esta clasificación fue obtenida a partir de los motivos de fosforilación reportados por Trecek *et al.* [274], donde se incluyen 83 motivos no redundantes para serina y 38 motivos no redundantes para treonina, todos con un valor de $P < 0.05$ y obtenidos con el programa Motif-X [275], el residuo de tirosina no fue incluido ya que la cantidad de fosfopéptidos fue muy reducida, y además los dominios de tirosina cinasa son menos conocidos. Este resultado mostró la presencia de motivos de fosforilación basofílicos, acidofílicos, dirigidos por prolina, hidrofóbicos y dirigidos por asparagina (“*Asparagine: N*”) (**Fig. 16D**). A partir de estos grupos se observan patrones en los motivos de fosforilación característicos de familias de cinasas como reporta Douglass *et al.* en ([273], **Fig. 7**). Tal es el caso de la proteína PKA de la familia de cinasas AGC, clasificada como basofílica. PKA fosforila residuos de serina y treonina en proteínas diana que poseen aminoácidos básicos como arginina y lisina (“*Lysine: K*”) en la posición -3 y -2 relativo al sitio de fosforilación, estos residuos se encuentran generalmente en la siguiente secuencia consenso: (R/K)-(R/K)-x-(pS/pT), donde x es cualquier aminoácido [273, 276].

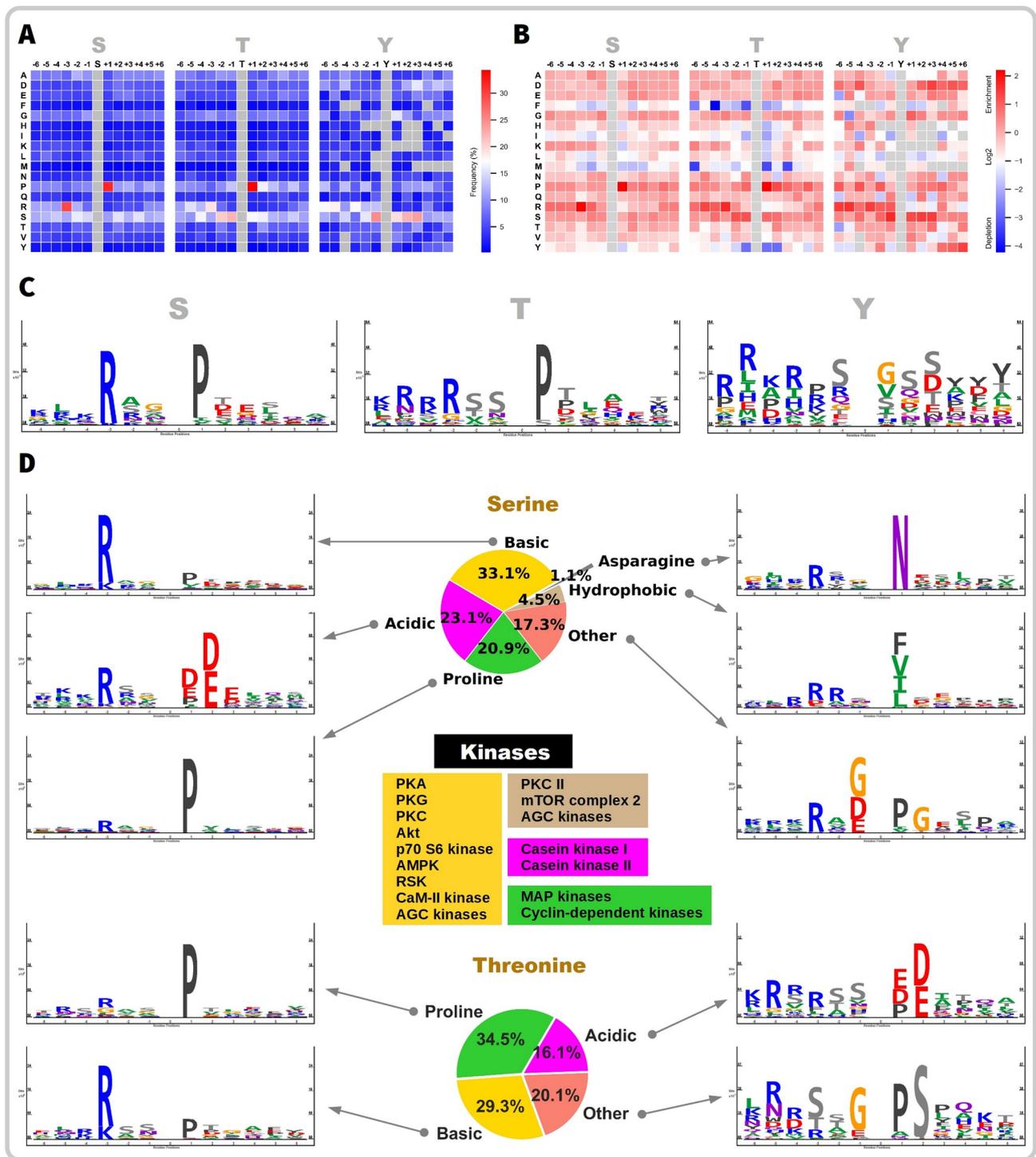


Fig. 16. Identificación de motivos de fosforilación.

(A) Distribución de frecuencias de aminoácidos circundantes al sitio de fosforilación en fosfopéptidos después de aplicar un FDR del 1%.

(B) Distribución de frecuencias de aminoácidos circundantes al sitio de fosforilación (serina, treonina y tirosina) después de un análisis de enriquecimiento.

(C) Visualización de secuencias consenso a partir de las frecuencias de la figura 16B.

(D) Secuencias consenso a partir de motivos de fosforilación basófilicos, acidófilicos, dirigidos por prolina, hidrofóbicos y dirigidos por asparagina. Los recuadros en el centro muestran algunas cinasas basófilicas, acidófilicas, hidrofóbicos y dirigidas por prolina.

3.4.3.4. Jerarquías funcionales de las fosfoproteínas

Un análisis funcional que incluye todos los conjuntos de proteínas con diferentes grados de fosforilación (como se describe en la sección 3.4.4.2.), usando la base de datos KEGG (*Release 94.2, June 1, 2020*), permitió observar varias jerarquías funcionales importantes que pueden estar relacionadas con el desarrollo de *P. chrysogenum*. La jerarquía funcional más sobrerrepresentada fue "**Protein families: genetic information processing**", con 329 fosfoproteínas. Además, se identificaron dos jerarquías funcionales relacionadas con la señalización celular: "**Protein families: signaling and cellular processes**" y "**Signal transduction**", con 132 y 40 fosfoproteínas, respectivamente. Otro grupo importante de jerarquías funcionales que sobresalen en este análisis está relacionado al metabolismo como: "**Protein families: metabolism**" (con 89 fosfoproteínas), "**Carbohydrate metabolism**" (47), "**Amino acid metabolism**" (29), "**Lipid metabolism**" (29), y dentro del metabolismo, pero menos representados fueron: "**Unclassified: metabolism**" (21), "**Energy metabolism**" (12), "**Nucleotide metabolism**" (9), "**Glycan biosynthesis and metabolism**" (4). Este análisis global permite observar la complejidad y el papel de la fosforilación en múltiples vías de señalización o rutas metabólicas dentro de *P. chrysogenum* (**Fig. 17A**).

Como era de esperarse, el grupo de fosfoproteínas con uno o dos fosfositos y con anotación en el KEGG resultó estar implicado en más vías o rutas metabólicas respecto a aquellas fosfoproteínas con más de dos fosfositos. También resulta interesante observar que la mayoría de las proteínas híperfosforiladas parecen estar más relacionadas con procesos de señalización celular y procesamiento de información genética (**Fig. 17B**). Cada una de las jerarquías descritas incluye varias vías o rutas metabólicas más específicas de acuerdo con KEGG, las cuales están más directamente relacionadas con los procesos celulares de los organismos. Por ejemplo la jerarquía funcional "**Protein families: genetic information processing**" incluye vías implicadas en el procesamiento de información genética como: "*Transcription factors*", "*Transcription machinery*", "*Messenger RNA biogenesis*", "*Spliceosome*", "*Ribosome*", "*Ribosome biogenesis*", "*Transfer RNA biogenesis*", "*Translation factors*", "*Chaperones and folding catalysts*", "*Membrane trafficking*", "*Ubiquitin system*", "*Proteasome*", "*DNA replication proteins*", "*Chromosome and associated proteins*", "*DNA repair and recombination proteins*" y "*Mitochondrial biogenesis*". Las siguientes jerarquías funcionales que fueron

sobrerrepresentadas, "**Protein families: signaling and cellular processes**" y "**Signal transduction**", incluyen vías como: "Exosome", "CD molecules", "Transporters", "Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins", "Two-component system", "GTP-binding proteins", "Cytoskeleton proteins", "Secretion system", "Ion channels", "MAPK signaling pathway – yeast" y "Phosphatidylinositol signaling system". Cabe destacar que la mayoría de las fosfoproteínas están implicadas en múltiples vías o rutas metabólicas, lo cual refleja su multifuncionalidad, en general debido a la presencia de múltiples unidades funcionales en su estructura (**Fig. 17C**). En este contexto una unidad funcional hace referencia a cualquiera de las siguientes categorías dentro de su estructura: Familia ("Family"), Dominio ("Domain"), Repetición ("Repeat"), Motivo ("Motif"), Hélice superenrollada ("Coiled-Coil") y Desordenada ("Disordered"), establecidas por la base de datos de familias de proteínas PFAM (<https://pfam.xfam.org/>) [277]. Dado que estas categorías presentan diferencias funcionales y estructurales importantes, en el texto se usará el término genérico "**unidad funcional**" para hacer referencia a cualquiera de las categorías mencionadas.

Las vías de señalización o rutas metabólicas identificadas en este análisis sólo comprenden el 51.2% de las fosfoproteínas identificadas, es decir, en la base de datos KEGG sólo están anotadas 597, lo cual representa una pérdida de información sobre las 568 fosfoproteínas restantes. Este problema podría ser parcialmente resuelto buscando ortólogos a partir de hongos filamentosos modelo como *N. crassa* o *A. nidulans*. Sin embargo, la información de estos hongos también es limitada en esta base de datos, por lo tanto, esto da pauta a investigar el papel de múltiples fosfoproteínas identificadas en este trabajo de las cuales no se tiene información alguna sobre su funcionamiento dentro de *P. chrysogenum* y otros hongos filamentosos.

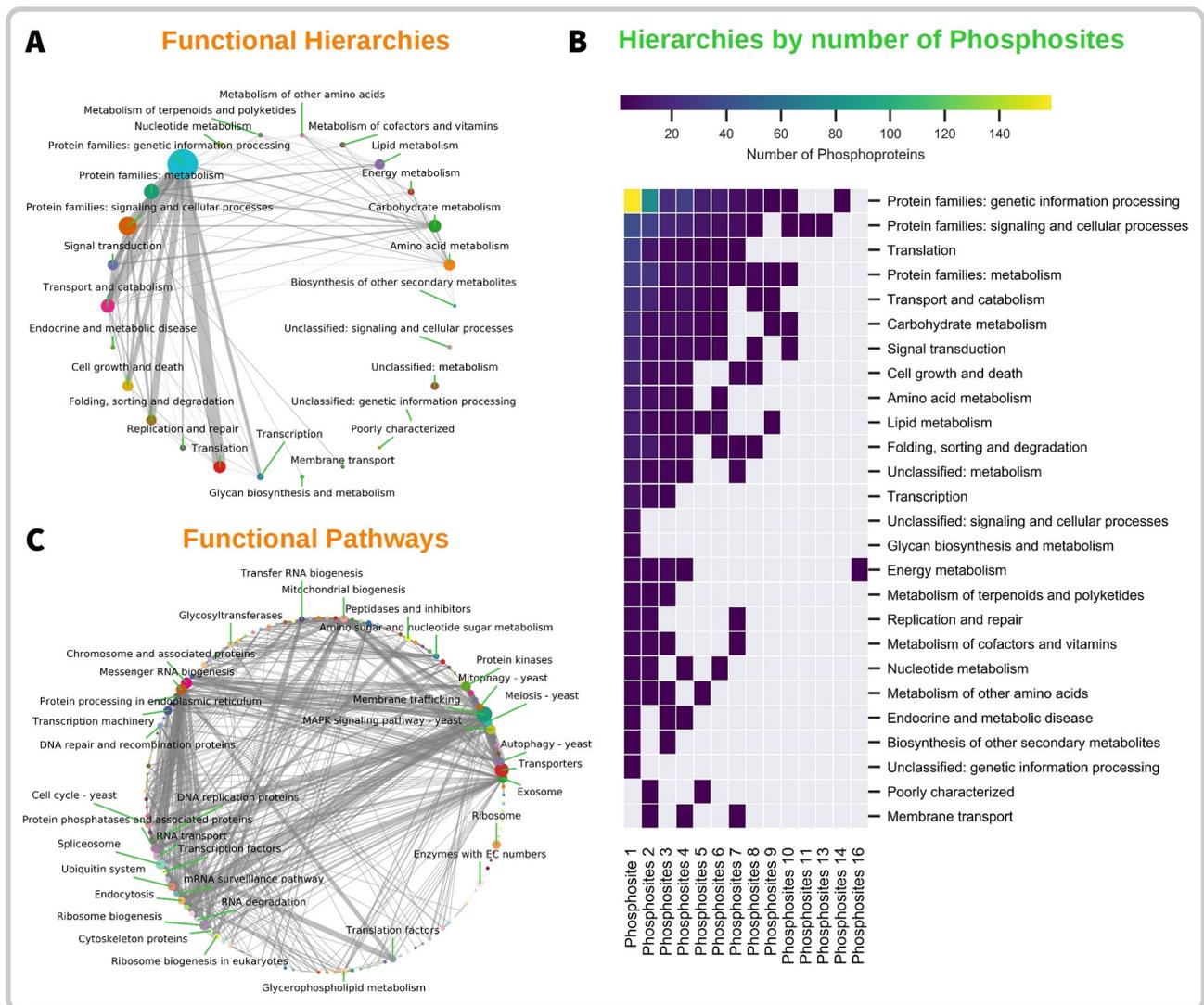


Fig. 17. Identificación de jerarquías funcionales.

(A) Red de intersecciones mostrando jerarquías funcionales de acuerdo con la base de datos KEGG.

(B) Distribución global de vías metabólicas y de señalización en función de número de fosfositos por proteína.

(C) Red de intersecciones mostrando aquellas vías funcionales con más de 10 fosfoproteínas, las vías con menos de 10 fosfoproteínas no son señaladas por estar menos sobrerrepresentadas.

3.4.4. Enriquecimiento funcional de fosfoproteínas

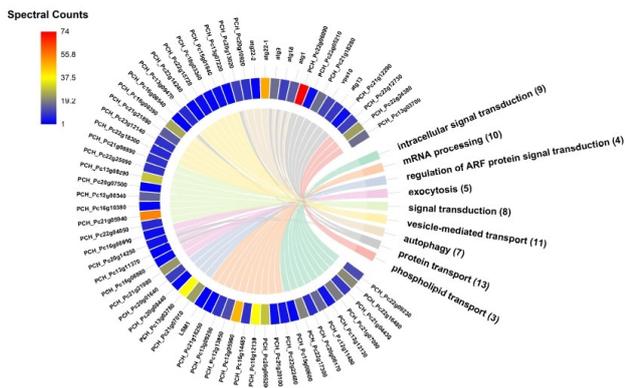
Se realizó un análisis global de enriquecimiento funcional usando el programa NeVOmics [278], a un FDR de 5%, usando todo el proteoma de *P. chrysogenum* como referencia, y usando las anotaciones de la ontología genética y KEGG. NeVOmics integra una metodología de sobrerrepresentación (“*Over-representation analysis: ORA*”), el cual permite identificar rutas metabólicas, vías de señalización, procesos biológicos, funciones

moleculares o componentes celulares estadísticamente significativos dentro de una lista de genes, transcritos o proteínas obtenida de algún análisis “Ómico” respecto a una referencia, donde la referencia puede ser un genoma, transcriptoma o proteoma. El objetivo principal de este análisis es encontrar anotaciones biológicas sobrerrepresentadas, es decir, si un conjunto de genes, transcritos o proteínas pertenecen a algún proceso o vía con algún papel significativo *in vivo*. NeVOmics también presenta la ventaja de generar visualizaciones en forma de redes con los resultados funcionales, lo que permite detectar proteínas multifuncionales/multiproceso/multicomponente.

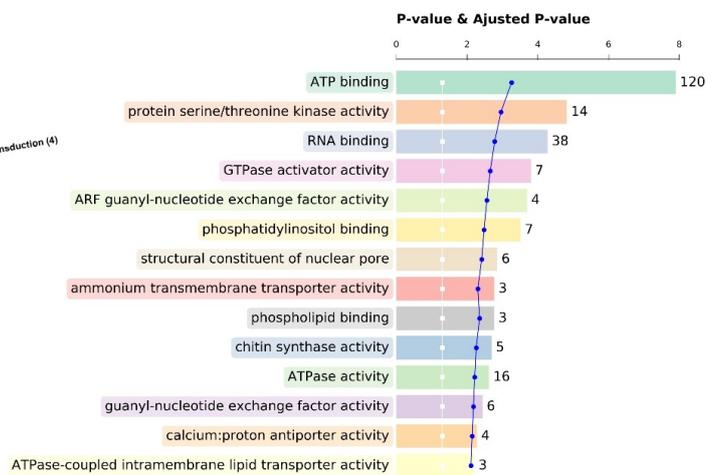
El análisis de enriquecimiento se realizó ingresando 1165 fosfoproteínas con sus correspondientes cuentas espectrales. Este análisis permitió identificar 63 fosfoproteínas implicadas en varios procesos celulares. Los procesos más enriquecidos a un FDR del 5% fueron “*intracellular signal transduction*”, “*mRNA processing*”, “*regulation of ARF protein signal transduction*”, “*exocytosis*”, “*signal transduction*”, “*vesicle-mediated transport*”, “*autophagy*” y “*protein transport*”. Todas estas fosfoproteínas propagan señales dentro de la célula provocando un cambio o estado en la función. Otros procesos celulares resultaron también enriquecidos, la mayoría de alguna forma relacionada con la señalización celular (**Fig. 18A**). Por otro lado, de acuerdo con la ontología genética, fueron enriquecidas 14 funciones moleculares, incluyendo entre todas a 199 fosfoproteínas. Dentro de este grupo las funciones más sobrerrepresentadas fueron “*ATP binding*”, “*protein serine/threonine kinase activity*”, “*RNA binding*” y “*ATPase activity*” (**Fig. 18B**). Era de esperarse que una de las funciones esté relacionada a la fosforilación, el término “*protein serine/threonine kinase activity*” incluye a tres clases de proteínas cinasas: “*Serine/threonine-protein kinases*”, “*Tyrosine-protein kinases*” y “*Dual specificity protein kinases (e.g. MEK - phosphorylates both Thr and Tyr on target proteins)*” [279].

Un análisis de enriquecimiento usando la anotación del KEGG reveló ocho vías sobrerrepresentadas reguladas por fosforilación de proteínas. Es interesante observar que la vía más sobrerrepresentada fue “*MAPK signaling pathway – yeast*”, la cual contiene varios módulos de proteínas cinasas que controlan respuestas por feromonas, estrés de pared celular, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes. Este resultado demuestra que la fosforilación juega un papel importante en vías de señalización que regulan el desarrollo en *P. chrysogenum*, así como algunos otros procesos relacionados con la resistencia a estrés. Además, esto demuestra el alto grado de conservación de los componentes que integran estas vías (**Fig. 18C**).

A Biological Process



B Molecular Function



C KEGG Pathways

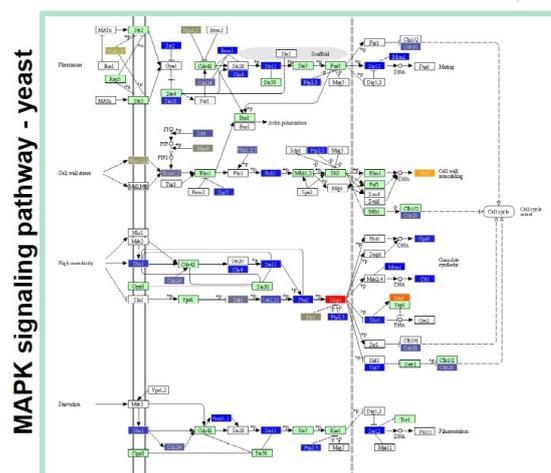
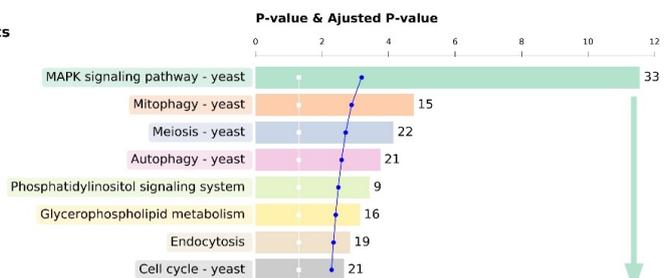
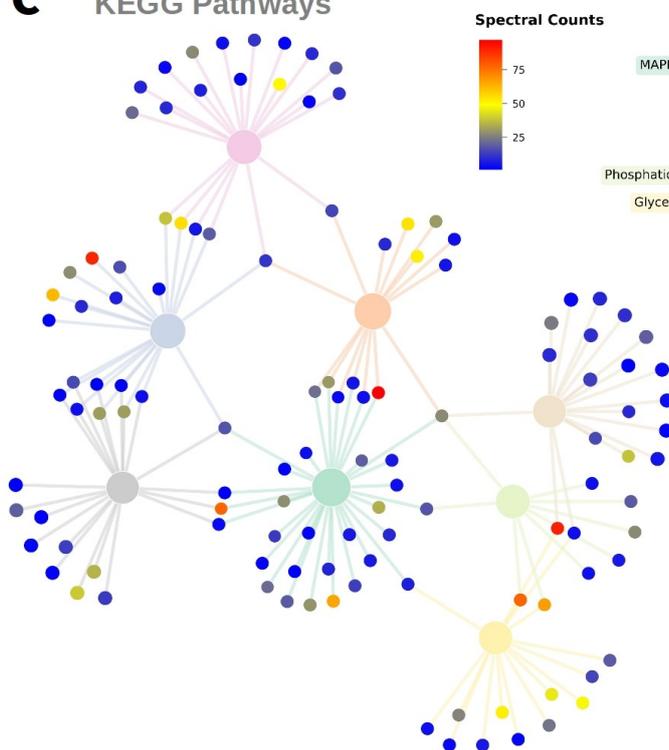


Fig. 18. Análisis global de enriquecimiento funcional.

(A) Procesos biológicos enriquecidos a partir de proteínas fosforiladas.

(B) Funciones moleculares enriquecidas a partir de fosfoproteínas.

(C) Vías metabólicas y de señalización reguladas por fosforilación. Del lado derecho se muestra un esquema con vías de señalización reguladas por proteínas cinasas, caracterizadas en *S. cerevisiae*. Todos estos resultados fueron realizados con NeVOmics.

3.4.5. Fosfoproteínas relacionadas a la conidiación

El desarrollo asexual de los hongos filamentosos se da por un proceso conocido como conidiación. Este proceso es una respuesta a factores ambientales como la luz, temperatura, pH, osmolaridad, nutrientes, lesiones físicas del micelio y presencia de compuestos volátiles [280]. Durante la conidiación los hongos filamentosos producen esporas asexuales llamadas conidios, formadas en estructuras especializadas conocidas como conidióforos [165]. En *P. chrysogenum*, la conidiación es abundante y los conidióforos presentan largas cadenas de conidios de color verde oscuro en sucesión basipétala. La conidiación es un tema interesante pues proporciona un modelo de estudio de regulación del desarrollo en hongos filamentosos, y, además, de este derivan varias aplicaciones como el uso de inóculos en la industria alimenticia y farmacéutica, como agentes de biocontrol, sin olvidar su impacto en la salud debido a la existencia de especies patógenas de *Penicillium* [219].

La conidiación es uno de los temas centrales en este trabajo, por ello se planteó una estrategia que permitiera diferenciar proteínas que presentan fosforilación al inicio del proceso de diferenciación/conidiogénesis y que puedan estar reguladas (mediante fosforilación) por la vía de las proteínas G heterotriméricas/Pga1, con el fin de identificar patrones de fosforilación en reguladores de la conidiación que tengan una significancia funcional en la regulación de este proceso en *P. chrysogenum*.

3.4.5.1. Fosfoproteínas ortólogas de la conidiación en *P. chrysogenum*

La base de datos AspGD (<http://www.aspergillusgenome.org/>) (2008-2020) recopila 469 registros relacionados con la conidiación en varias especies de *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. fumigatus* y *A. niger*), los cuales incluyen 289 genes únicos con múltiples fenotipos observados en varios estudios. Esta base de datos fue complementada con 43 genes obtenidos mediante una búsqueda manual en literatura reciente que no están registrados en el sitio AspGD [281].

En primer lugar, se construyó una base de datos con 332 secuencias de proteínas (relacionadas directamente con la conidiación) compatible con el programa BLAST v2.8.1. A continuación se realizó un alineamiento local de secuencias con el algoritmo Blastp para obtener los mejores “hits” por proteína, para esto se usó todo el proteoma de *P. chrysogenum* como “background”. Este primer análisis permitió obtener posibles ortólogos

de los genes de *Aspergillus* spp. relacionados con la conidiación en *P. chrysogenum*, sin embargo, en este punto no es recomendable usar el porcentaje de identidad o algún otro atributo del programa Blastp como parámetro definitivo ya que esto no resuelve de manera eficiente la identificación de verdaderos ortólogos y se corre el riesgo de obtener falsos positivos, sobre todo porque la base de datos está construida a partir de proteínas con múltiples arquitecturas, lo que puede resultar en alineamientos no deseados. Lo recomendable es usar perfiles construidos a partir de secuencias alineadas, o incluir alineamientos globales considerando la arquitectura de las proteínas. El siguiente paso consistió en la búsqueda de unidades funcionales dentro de la secuencia de las proteínas tanto de la base de datos como de los mejores “hits”, usando información actualizada de los servidores PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) y SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [282]. Una vez realizada la asignación de unidades funcionales se procedió a hacer comparaciones múltiples entre las arquitecturas de proteínas (**Fig. 19A**).

Penicillium chrysogenum y *Aspergillus nidulans* pertenecen al mismo Orden (Eurotiales), por lo tanto se espera que la arquitectura de la mayoría de sus proteínas esté conservada. Partiendo de esta premisa, se consideró un verdadero ortólogo I) si la proteína fue incluida dentro de los mejores “hits” después de alineamiento local con el algoritmo Blastp, y II) si comparte una arquitectura similar o idéntica en su estructura, es decir, que presente las mismas unidades funcionales con el mismo arreglo. El análisis de asignación de ortólogos fue refinado con un alineamiento múltiple de arquitecturas, descartando regiones con secuencias desordenadas y hélices súperenrolladas. En este proceso se extraen todas las unidades funcionales de las proteínas y son concatenadas para formar una nueva estructura artificial, estas son alineadas de forma global y se obtienen las proteínas con el Qratio más cercano a 1. En el caso de proteínas sin unidad funcional identificada se tomó el porcentaje de identidad más alto, siempre y cuando sea mayor al 50%. Con el fin de validar la asignación de ortólogos se construyó una red de coocurrencias (“Co-occurrence”) con todas las unidades funcionales (dominios, familias, hélices súperenrolladas, repeticiones y regiones desordenadas) identificadas. En estas redes los nodos (“nodes”) corresponden a unidades funcionales y los vértices (“edges”) representan la existencia de proteínas con alguna unidad funcional que coocurre. Estas redes son útiles para estudiar la función e interacción de proteínas, o para encontrar grupos de proteínas con funciones similares [283, 284].

Este enfoque permitió identificar 87 proteínas ortólogas reguladas por fosforilación relacionadas directamente con la conidiación. Esta fracción equivale al 33% de las proteínas con una posible participación en la conidiación del proteoma de *P. chrysogenum*. Por otro lado, las redes de coocurrencia de unidades funcionales a partir de las proteínas ortólogas son similares en *A. nidulans* y *P. chrysogenum*, lo cual refleja un alto grado de conservación en las arquitecturas, incluso la distribución de las longitudes es similares (**Fig. 19B**). En este mismo conjunto de proteínas, en ambos hongos, se identificaron cuatro tipos de unidades funcionales las cuales fueron: dominios, familias, hélices súperenrolladas, repeticiones y regiones desordenadas, además este análisis permitió identificar la presencia de péptidos señal y regiones transmembrana. También resulta interesante observar que la mayoría de los sitios de fosforilación se encuentran dentro de alguna de las unidades funcionales identificadas y que en pocos casos la fosforilación ocurre en regiones con ausencia de unidades funcionales (**Fig. 19B**).

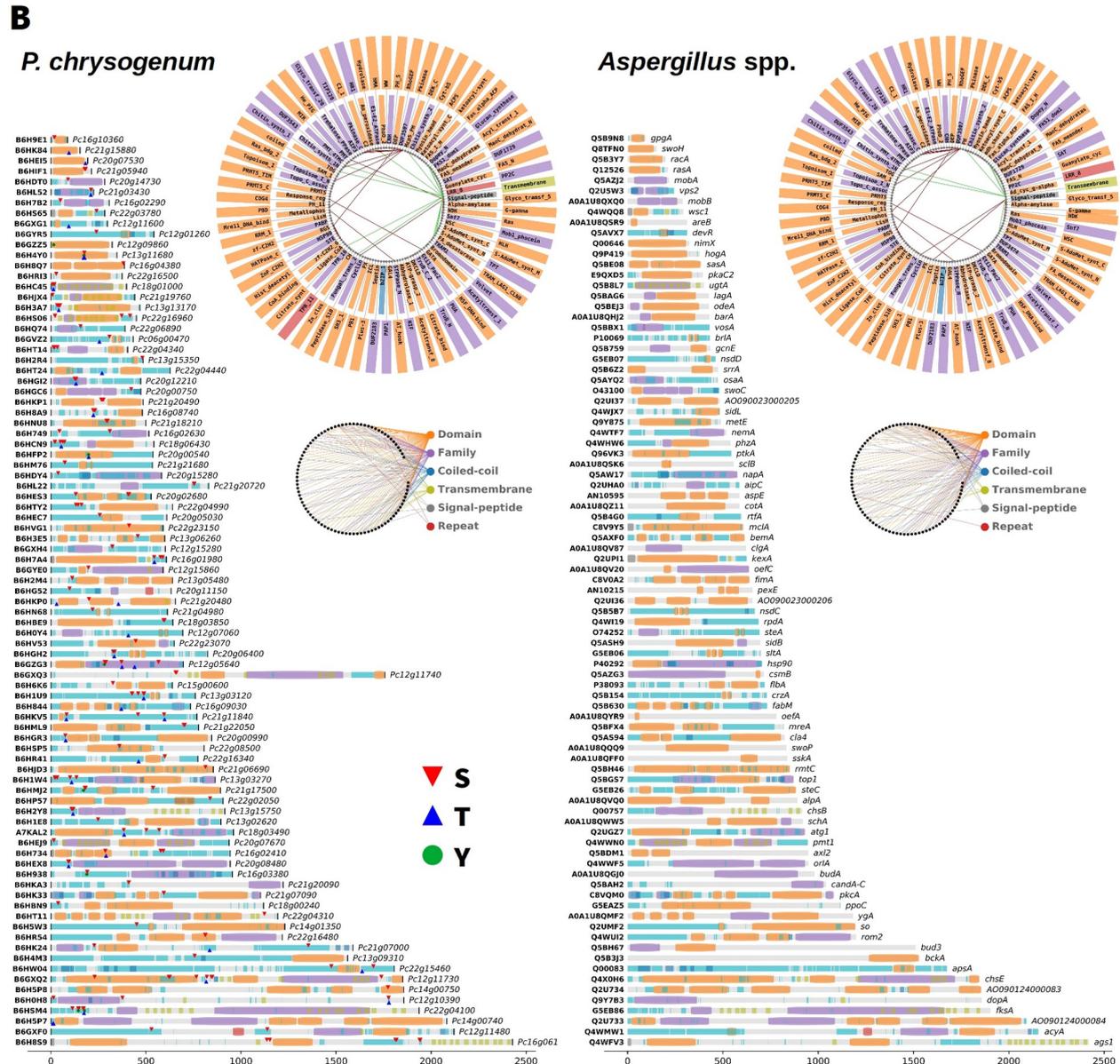
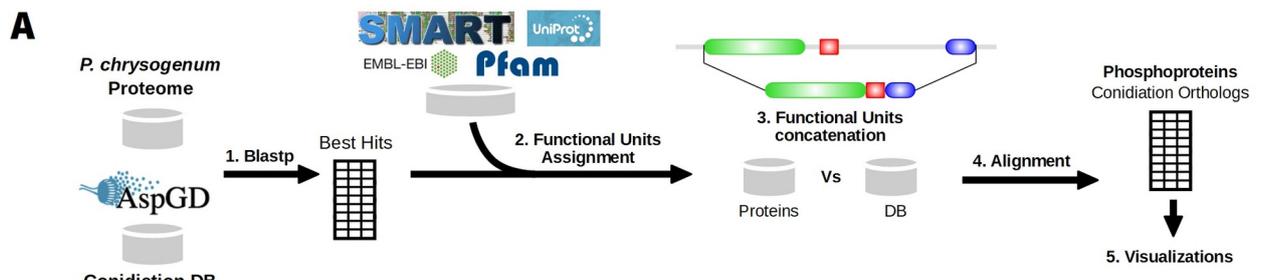


Fig. 19. Identificación de proteínas ortólogas implicadas en la conidiación.
(A) Enfoque bioinformático implementado para la búsqueda de proteínas ortólogas.
(B) Análisis basados en secuencias de proteínas. Arquitecturas (arreglo de las unidades funcionales) de proteínas relacionadas directamente a la conidiación en *A. nidulans* y sus ortólogos en *P. chrysogenum*. Las fosfoproteínas de *P. chrysogenum* incluyen los sitios de fosforilación identificados en este trabajo. Las letras S/T/Y corresponden a residuos de aminoácidos fosforilados.

 : corresponde a regiones desordenadas. Las redes circulares muestran las coocurrencias de unidades funcionales identificadas en las 87 proteínas ortólogas relacionadas a la conidiación. Las redes inferiores muestran las distribuciones de las categorías de unidades funcionales identificadas.

3.4.5.2. Análisis funcional de fosfoproteínas reguladoras de la conidiación

La conidiación es un proceso fisiológico efectuado en hongos filamentosos por un conjunto de proteínas que coordinan el desarrollo de conidióforos. La regulación de este proceso es altamente compleja y, como se mencionó anteriormente, es multifactorial. Un análisis funcional por GO Slim de 87 fosfoproteínas relacionadas con la conidiación mostró que están implicadas en múltiples procesos, presentan múltiples funciones y se localizan en varios compartimentos subcelulares.

Dentro de los procesos más representados se encuentran el término “**regulation of biological process**” (GO:0050789), el cual es definido por “*Gene Ontology*” como cualquier proceso que modula la frecuencia, tasa o extensión de un proceso biológico; en este sentido, los procesos biológicos son regulados de varias formas, incluyendo el control de la expresión de genes, modificación o interacciones proteína-proteína o proteína-sustrato. El segundo término sobrerrepresentado fue “**cellular protein modification process**” (GO:0006464), el cual es definido como aquellas modificaciones covalentes de uno o más aminoácidos que ocurren en las proteínas, péptidos o cadenas de polipéptidos nacientes, como modificaciones cotraduccionales y postraduccionales. Los subtérminos de GO:0006464 fueron: “*protein phosphorylation*”, “*protein O-linked glycosylation*”, “*protein methylation*”, “*peptidyl-arginine N-methylation*”, “*histone deacetylation*”, “*protein dephosphorylation*”, “*histone acetylation*” y “*stress-activated MAPK cascade*” (Fig. 20A). El tercer término sobrerrepresentado en este análisis fue “**signal transduction**” (GO:0007165), y es definido como aquellos procesos celulares en los que se transmiten señales para desencadenar cambios en la actividad o estado de una célula. La señalización comienza con la recepción de una señal y termina con la regulación de algún proceso. Los subtérminos de GO:0007165 en este análisis fueron: “*signal transduction*”, “*intracellular signal transduction*”, “*phosphorelay signal transduction system*”, “*stress-activated MAPK cascade*”, “*small GTPase mediated signal transduction*”, “*G protein-coupled receptor signaling pathway*” y “*pheromone-dependent signal transduction involved in conjugation with cellular fusion*”. Se obtuvieron otros procesos menos sobrerrepresentados como: “*transport*”, “*carbohydrate metabolic process*”, “*developmental*”

process”, “*lipid metabolic process*”, “*response to stress*”, “*DNA metabolic process*”, “*RNA metabolic process*”, entre otros (**Fig. 20A**).

Dentro del mismo grupo de fosfoproteínas se identificaron múltiples funciones moleculares, siendo “***transferase activity***” (GO:0016740) el término más sobrerrepresentado. Este término describe la catálisis de la transferencia de grupos funcionales, de un compuesto (donador) a otro (aceptor). La actividad transferasa incluye cualquier enzima de clase 2 (“*Enzyme Classification: EC 2.-.-.-*”). Este término incluyó 21 subterminos todos con funciones relacionadas. El segundo término sobrerrepresentado fue “***protein kinase activity***” (GO:0004672), en este grupo se encuentran todas las proteínas cinasas. Esta función es definida como la catálisis de la fosforilación de residuos de aminoácidos en una proteína en un proceso dependiente de ATP. Este término incluyó los subterminos “*protein kinase activity*”, “*protein serine/threonine kinase activity*”, “*protein kinase C activity*” y “*MAP kinase activity*”. Otro grupo de fosfoproteínas fue incluido dentro de la función “***protein binding***” (GO:0005515). Esta función define la interacción selectiva no covalente con cualquier proteína o complejo de proteínas. Este complejo puede incluir moléculas no proteicas. Dentro de esta función se encontró el subtermino “*G-protein beta-subunit binding*”, el cual incluye a la subunidad Gy de las proteínas G heterotriméricas de *P. chrysogenum* identificada en este trabajo y ortóloga de GpgA de *A. nidulans*, la cual interacciona con la subunidad G α Pga1 y la subunidad G β . Otras funciones identificadas fueron menos sobrerrepresentadas, aunque no dejan de ser importantes (**Fig. 20B**).

La localización de las proteínas y su participación en complejos moleculares también son de crucial importancia, ya que ofrecen una visión espacial de un proceso. En este análisis se identificaron siete compartimentos celulares (“*membrane*”, “*nucleus*”, “*Golgi apparatus*”, “*cell cortex*”, “*chromosome*”, “*cytosol*” y “*plasma membrane*”) de acuerdo con la anotación del “*Gene Ontology*”, de los cuales “***membrane***” y “***nucleus***” fueron los más sobrerrepresentados. Sin embargo, la anotación para componente celular es limitada; de las 87 proteínas sólo fueron incluidas 29 con este método. Por otro lado, se realizó una predicción de la sublocalización celular con el programa ProComp v9.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) usando un “*Integral score*” mayor o igual a 5, con el fin de obtener una predicción más completa de las 87 fosfoproteínas. Este programa combina varios métodos de localización celular basados en redes neuronales (“*Neural Networks*”) y localizaciones conocidas de proteínas homólogas. Este análisis permitió identificar la sublocalización de 57 fosfoproteínas, siendo “***Nuclear***”, “***Cytoplasmic***” y

"Plasma membrane" las más sobrerrepresentadas, seguido de *"Membrane bound Mitochondrial"*, *"Membrane bound Endoplasmic reticulum"*, *"Membrane bound Golgi"* y *"Membrane bound Peroxisoma"* que fueron menos sobrerrepresentadas (**Fig. 20C**). La desventaja de ProComp es que asigna una sublocalización por proteína. Por lo tanto, se empleó el programa WoLF PSORT II (<https://wolfpsort.hgc.jp/>), específico para hongos, animales y plantas [285]. Este programa clasifica las proteínas en más de 10 sublocalizaciones, e incluye la localización dual, permitiendo predecir la sublocalización de proteínas que se desplazan entre el citosol y el núcleo, u otros compartimentos. En este análisis se usó un "Score" mayor o igual a 5 para cada fosfoproteína. Con WoLF PSORT se identificaron 13 sublocalizaciones, de las cuales **"Nuclear"**, **"Cytosol"**, **"Cytosolic or nuclear"**, **"Mitochondria"**, **"Plasma membrane"** fueron las más sobrerrepresentadas, seguidas por *"Peroxisome"*, *"Cytosol or mitochondria"*, *"Cytoskeleton"*, *"Extracellular"*, *"Cytosolic or peroxisome"*, *"Endoplasmic reticulum"*, *"Golgi apparatus"* y *"Mitochondria or nuclear"* (**Fig. 20D**). La sublocalización **"Nuclear"** fue la más sobrerrepresentada en todos los casos, esto concuerda con el número de factores de transcripción y proteínas cinasas identificadas dentro del conjunto de ortólogos de la conidiación.

Estos resultados demuestran la multifuncionalidad de las fosfoproteínas y su importancia en el control de la conidiación. Las unidades funcionales dentro de las proteínas determinan en gran medida su funcionalidad, sin embargo, los cambios postraduccionales como la fosforilación agregan un nivel más de regulación lo cual incremental la complejidad del proceso, función o sublocalización.

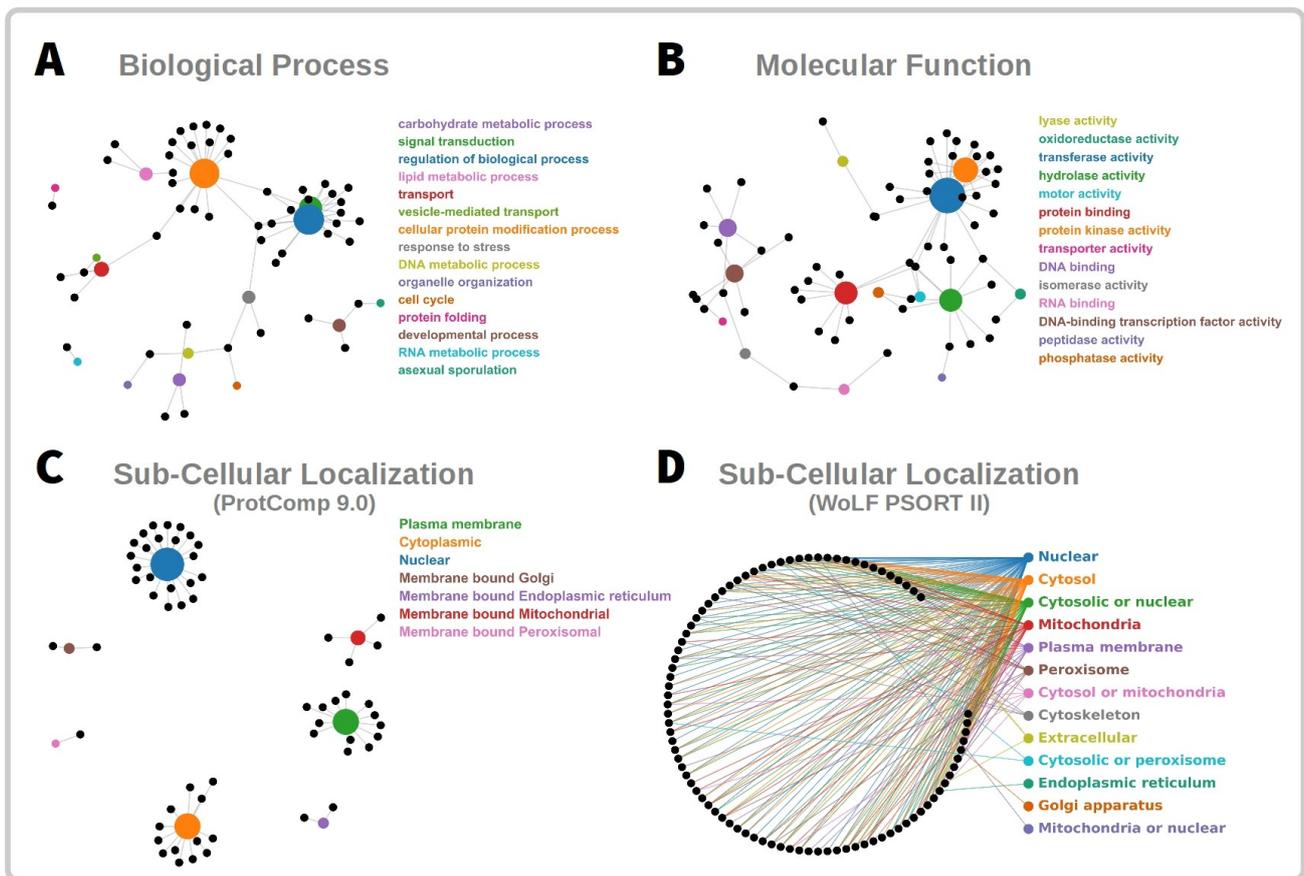


Fig. 20. Análisis funcional de fosfoproteínas implicadas en la conidiación.

(A) Procesos biológicos asociados con la conidiación.

(B) Funciones moleculares asociadas con la conidiación.

(C) Sublocalizaciones celulares de fosfoproteínas asociadas con la conidiación usando el programa ProtComp v9.0.

(D) Sublocalizaciones celulares de fosfoproteínas asociadas con la conidiación usando el programa WoLF PSORT VII.

3.4.5.3. Vías de señalización implicadas en la conidiación

Como se mencionó anteriormente, se identificaron 87 fosfoproteínas relacionadas directamente con la conidiación, las cuales equivalen a apenas el 7.5% de las 1165 fosfoproteínas identificadas en el fosfoproteoma. El 92.5% restante, como se describió en la sección 3.4.5, participa en otros procesos del desarrollo como autofagia, tráfico vesicular, procesamiento de ARN mensajero y transporte, entre otros.

De las 87 fosfoproteínas, 13 corresponden a proteínas cinasas que incluyen a PKA, PKC y MAP cinasas (MAPKKK [MAP3K], MAPKK [MAP2K] y MAPK), 15 factores de transcripción, y 59 fosfoproteínas con múltiples funciones desde enzimas, transportadores, adaptadores, sensores, entre otros (Fig. 21). En *S. cerevisiae* se han descrito ampliamente

cuatro vías de señalización controladas por varias proteínas cinasas: integridad de la pared celular, crecimiento filamentoso, adaptación a alta osmolaridad y respuesta a feromonas [286]. Estas vías de señalización han sido el punto de partida para la identificación y caracterización de vías para la mayoría de los hongos filamentosos, aunque se han encontrado varias diferencias.

En esta sección se describe el papel de varios de estos reguladores y su relación directa e indirecta con Pga1. Con el fin de entender estos mecanismos también se incluyen los patrones de fosforilación identificados en el fosfoproteoma de *P. chrysogenum*, así como el de otros hongos filamentosos en los que han aplicado este enfoque proteómico. Varios de estos reguladores presentaron fosforilación diferencial, es decir, que el grado de fosforilación (número y cantidad de fosfositos o patrones) se encuentra disminuido o aumentado respecto de una condición control. La identificación de una fosforilación diferencial puede representar cambios en la expresión de la proteína o en los niveles de fosforilación de esta, o ambas cosas simultáneamente, por lo tanto, ambas mediciones podrían permitir distinguir una fosforilación diferencial a partir de expresiones alteradas de proteínas. En algunos trabajos se ha cuantificado el grado de fosforilación en función de los cambios de expresión en las proteínas [287]; sin embargo, en otros estudios se comparan abundancias de proteínas y niveles de fosforilación revelando que muchas proteínas son reguladas por fosforilación, independientemente de sus niveles de expresión [288].

3.4.5.3.1. Integridad de la pared celular

En primer lugar, se identificó la MAP3K cinasa **Pc13g09310**, ortóloga de BckA en *A. nidulans*, con un porcentaje de identidad de 91.7% a nivel de arquitectura, ambas con el dominio “*Pkinase*”. BckA pertenece a un grupo de cinasas (BckA, MkkA [MAP2K] y MpkA [MAPK]) que controlan la vía de señalización de integridad de la pared celular (“*cell wall integrity: CWI*”), una vía análoga a la vía de integridad de la pared en *S. cerevisiae*, la cual responde a diferentes tipos de estrés hacia la pared, incluyendo medicamentos antimicóticos dirigidos a la pared celular, y regula la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de α -1,3-glucanos [289, 290]. Estudios funcionales en *A. nidulans* mostraron que la ausencia de BckA provoca una morfología irregular en las colonias acompañado de un fenotipo apoptótico a 42°C, y en consecuencia la ausencia de conidios. En cepas con

BckA ausente la conidiación es restaurada en presencia de algún estabilizador osmótico (ejemplo 1M de sacarosa o 1M NaCl) [186]. Aunque estos estudios comprenden la delección de *bckA*, y no existe alguna evidencia de la importancia de la fosforilación, se puede especular que la fosforilación de BckA es esencial, ya que le da continuidad a la vía que mantiene la integridad de la pared celular, así como a impedir el proceso apoptótico. Pc13g09310 fue fosforilada en S756, específicamente en una región estructural de la proteína. En otro estudio fosfoproteómico en *A. nidulans* se identificaron dos sitios de fosforilación en BckA, S719 y S1003 [234]. Por otro lado, un alineamiento de secuencias mostró que ninguno de estos sitios identificados en *A. nidulans* se corresponde con el que se identificó en *P. chrysogenum*. En *S. cerevisiae*, se demostró *in vitro* que Pkc1 fosforila a Bkc1 en los sitios S939, T1119 y S1134 [291], sin embargo, estos resultados no garantizan que esto ocurra *in vivo*.

Se identificó la cinasa **Pc21g07090**, ortóloga de PkcA en *A. nidulans* y Pkc1 en *S. cerevisiae*, con un porcentaje de identidad del 93.5% a nivel de arquitectura respecto a PkcA de *A. nidulans*, y ambas con los Dominios C2, C1_1 y Pkinase, y las Familias HR1 y Pkinase_C. El Dominio C2 es requerido para la localización en la punta de las hifas y en los sitios de septación [292]. Se ha sugerido que PKC juega un papel clave en la vía CWI, sin embargo, varios reportes han demostrado que PKC está implicada en varios procesos en hongos filamentosos: en *N. crassa* y *C. herostrophus* es esencial para la viabilidad [293] [294], en *A. nidulans* regula la apoptosis, el crecimiento y la conidiación, incluso en la producción de penicilina [295]. En *S. cerevisiae* la delección de *pkc1* es letal en condiciones normales; sin embargo, este efecto se suprime bajo condiciones osmóticamente estabilizadas [291], aunque en *A. nidulans* este efecto no se suprime con alta osmolaridad [186]. En *P. chrysogenum* se identificaron los sitios S593 y S594, específicamente cerca del segundo Dominio C1_1 hacia el extremo C-terminal. Un estudio demostró que tras la exposición de *S. cerevisiae* a metilglioxal, el complejo TORC2 fosforila a Pkc1 en T1125 y S1143, y que la fosforilación de S1143 está implicada en la activación de la vía CWI [296].

Fue identificado otro grupo de fosfoproteínas implicadas en la vía CWI, que de acuerdo a los registros de la base de datos AspGD están implicadas en la conidiación, estas incluyen el sensor de superficie **Pc22g03780** (S240), ortólogo de Wsc1 en *A. fumigatus* [297], un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (“*guanine nucleotide exchange factors: GEFs*”) **Pc22g16480** (S811, S812 y S813), ortólogo de Rom2 en *A. fumigatus* [297], y la α -1,3-glucano sintasa **Pc16g06130** (S1136, S1939, S1818, S1152, S1812 y

S1943), ortólogo de Ags1 en *A. fumigatus* [298]. Se ha demostrado que Wsc1 y MidA responden al estrés oxidativo [299], y son necesarios para promover el crecimiento radial y la conidiación, posiblemente por la vía CWI [300]. También se ha demostrado que la fosforilación de MpkA provoca su translocación al núcleo y fosforila al factor de transcripción RlmA [301], el cual regula varios genes: en primer lugar, se encuentran aquellos implicados en la biosíntesis y remodelación de la pared celular, como *agsA* y *agsB* [302], y en segundo lugar genes relacionados directamente con la conidiación, incluyendo *flbB*, *flbC*, *brlA*, *abaA* y *rasB* [303]. Ags1 de *A. fumigatus*, es ortólogo de AgsB en *A. nidulans* implicado en el 50% de los α -1,3-glucanos de la pared celular [304].

El proceso conidiogénico va acompañado de una remodelación de la pared celular. Durante esta fase, su composición cambia en función del morfotipo diferenciado, ya sea hifas o conidios. En un estudio se demostró que la fosforilación de MpkA y RlmA es un proceso activo durante el desarrollo asexual, además se observó que MpkA interacciona físicamente con las proteínas FlbB, FlbC, BrlA, y RasB, lo cual puede explicar la conexión entre la vía CWI y la conidiación o desarrollo de conidióforos [303]. Además, en este trabajo se identificó el factor de transcripción bHLH **Pc12g01260**, ortólogo de DevR en *A. nidulans* y *A. fumigatus*. Estudios recientes en *A. fumigatus* han demostrado que los factores de transcripción RlmA y DevR tienen una actividad bifuncional, reprimiendo y activando la expresión de seis genes de la ruta biosintética de DHN-melanina (“*dihydroxynaphthalene: (DHN)-melanin*”), un pigmento característico de conidios, el cual juega un papel importante en la virulencia [305]. La delección de alguno de estos dos factores de transcripción, RlmA o DevR, interfiere con la conidiación y reduce la expresión de genes de la ruta biosintética de DHN-melanina [305].

En hongos se han identificado seis proteínas quitina sintasa (ChsA, ChsB, ChsC, ChsD, CsmA y CsmB), las cuales están clasificadas en seis grupos de acuerdo a sus características estructurales, II, III, I, IV, V y VI, respectivamente [306]. Dentro de las 87 proteínas ortólogas se identificaron tres quitina sintasas reguladas por fosforilación, **Pc13g15750**, ortóloga de ChsB en *A. nidulans*, **Pc12g11730**, ortóloga de ChsE en *A. fumigatus* y de CsmA en *A. nidulans*, y **Pc12g11740**, ortóloga de CsmB en *A. nidulans*. La quitina sintasa ChsB de clase III se localiza en hifas y conidióforos, y juega un papel importante en la integridad de la pared, así como en el desarrollo de conidióforos y conidios [307]. Pc13g15750 fue fosforilada en los sitios S109, S114, T116 y S118, y en *A. nidulans* se identificó el sitio S115 en ChsB [234], equivalente al sitio S109

(VPGRVASPYARSE). Por otro lado, respecto a CsmA y CsmB, se ha demostrado que la ausencia de alguno de estos genes reduce la producción de conidióforos, y en ocasiones provoca anomalías en la estructura del conidióforo, por ejemplo, conidióforos ramificados, tallos cortos con vesículas no hinchadas y deslocalización de mótulas [306]. CsmA y CsmB también ayudan a mantener la integridad de la pared celular [308]. Las regiones promotoras de CsmA y CsmB contienen secuencias consenso reconocidas por factores de transcripción, como RlmA y AbaA, este último, es un factor de transcripción necesario para la conidiación, regulando la expresión de genes requeridos para la diferenciación de mótulas y fiálides [306]. Se ha propuesto que la expresión de *csmA* y *csmB* es inducida por AbaA en condiciones que favorecen la conidiación, y que juegan un papel importante en la conidiación [306].

Al parecer, *P. chrysogenum* mantuvo la vía CWI de forma activa durante la etapa conidiogénica. Este evento permitió identificar varias proteínas reguladas por fosforilación, desde sensores de superficie, proteínas cinasas, hasta un factor de transcripción implicado en la biosíntesis de componentes esenciales para el desarrollo de conidióforos. Por otro lado, un estudio en *P. chrysogenum* mostró que la ausencia o inactivación de Pga1 incrementa la resistencia de la pared celular a compuestos como el detergente SDS, blanco de calcoflúor y rojo Congo. Estos resultados claramente indican que Pga1 causa cambios en la integridad de la pared celular, al parecer Pga1 bloquea parcialmente mecanismos que hacen que la pared celular resista a diferentes condiciones de estrés [111]. Es posible que estos efectos sean provocados por Pga1 de forma indirecta regulando la fosforilación de remodeladores de la pared celular, o por una posible interacción directa con PKC, un elemento clave de la integridad de la pared celular.

3.4.5.3.2. Septación

Se identificó otro grupo de cinasas en *P. chrysogenum*, **Pc22g23070** y **Pc12g09860**, ortólogas de SidB y NimX en *A. nidulans*, respectivamente. Los porcentajes de identidad fueron 90.1% para SidB y 88.4% para NimX, SidB presentó el Dominio Pkinase y la Familia Pkinase_C y NimX presentó el Dominio Pkinase. En *A. nidulans* se ha reportado una red de iniciación de la septación (“*septation initiation network: SIN*”) compuesta por las cinasas SidB, SepH, SepL y NimX [186, 234]. La serina/treonina cinasa Pc22g23070 fue fosforilada en S446 dentro del Dominio Pkinase, el mismo sitio también fue identificado en SidB de *A.*

nidulans pero en S453 [234]. Un alineamiento múltiple de secuencias mostró que los sitios fosforilación en ambas proteínas son equivalentes, [Q/E]V[N/D]YAK**S**IVGSPD. Por otro lado, la cinasa Pc21g04360 fue fosforilada en S403 (PPRKVV**S**SPVGSKP). La fosfoproteína Pc12g09860 es una cinasa dependiente de ciclina (CDK), y como con NimX, es posible que en *P. chrysogenum* también controle el ciclo celular además de regular la septación [186]. En Pc12g09860 se identificó el sitio de fosforilación Y15 (KIGEGT**Y**GVVYKA), y el mismo sitio fue identificado en *A. nidulans* [309], lo cual demuestra la importancia de este único fosfosito en ambos hongos filamentosos. NimX es un regulador esencial del ciclo celular en *A. nidulans*, por ello es clasificada como letal [234]. Se ha demostrado que la cinasa Wee1 fosforila a NimX, lo cual provoca una regulación negativa sobre el ciclo celular y la septación, mientras que la fosfatasa NimT lo regula positivamente [309]. SidB, SepH, SepL y NimX controlan la septación y la conidiación en *A. nidulans*, y su ausencia reprime drásticamente la conidiación, y además provoca sensibilidad a estrés osmótico, comprometiendo la integridad celular [186, 310]. Aunque se ha demostrado que NimX es letal en *A. nidulans*, no está claro por qué no es esencial en *N. crassa* [311].

Relacionado con el proceso de septación, también fue identificado el cofactor **Pc20g14730**, ortólogo de MobA en *A. nidulans*, el cual interacciona físicamente con SidB [312]. Pc20g14730 presentó un porcentaje de identidad del 91.2% a nivel de arquitectura respecto a MobA, ambos portando la Familia Mob1_phocein, y fue fosforilado en S90. Se ha demostrado que MobA es necesario para la septación y la conidiación en *A. nidulans* [313]. Por lo tanto, es posible que la fosforilación juegue un papel importante sobre Pc20g14730 en la vía SIN. Además de MobA, en *P. chrysogenum* se identificó una septina regulada por fosforilación e implicada en la formación de septos. La fosfoproteína en cuestión fue **Pc20g02680**, ortóloga de AspE en *A. nidulans*. AspE es encontrada únicamente en hongos filamentosos, y pertenece a una familia de septinas (AspA, AspB, AspC, AspD y AspE) implicadas en la citocinesis, tráfico vesicular y organización del citoesqueleto, y localizadas en citoplasma, septos, puntas de hifas y en conidióforos [314] [315]. Pc20g02680 se encontró fosforilada en S131, S406 y S411, y presentó un 78.2% de identidad a nivel de arquitectura respecto a AspE.

3.4.5.3.3. Estrés osmótico y oxidativo

En *S. cerevisiae* la vía de señalización HOG es activada por estrés osmótico, mientras que en *A. nidulans* es activada por estrés oxidativo y osmótico, incluso se ha observado que las señales de luz entran a la vía HOG, de esta forma comparte componentes con vías de respuesta a señales de luz [316, 317]. La vía HOG es sumamente importante, ya que se ha demostrado que regula más de 80 genes, todos implicados en la respuesta al estrés osmótico [318], y varios están relacionados con la conidiación [319]. La vía de señalización por estrés osmótico en *A. nidulans* consta de un sistema de dos componentes (“two-component system: TCS”, o también conocido como sistema “His-Asp phospho-relay signaling”), y una cascada HOG compuesta por tres proteínas cinasas, SskB, PbsB y SakA, ortólogos de Ssk1, Pbs2 y Hog1 en *S. cerevisiae*, respectivamente [320]. El mecanismo de regulación de la vía HOG se ha descrito principalmente en *S. cerevisiae*. En condiciones de baja osmolaridad el sensor extracelular Sln1 es autofosforilado en un residuo de histidina (H) dentro del Dominio “Histidine Kinase”, posteriormente, el fosfato es transferido a un residuo de ácido aspártico dentro del Dominio de respuesta “Response_reg”, después el fosfato es transferido a Ypd1 en un residuo de histidina, y después a Ssk1 en un residuo de ácido Aspártico, y aquí se detiene el proceso de fosforilación, lo cual apaga la vía HOG [321]. En condiciones de alta osmolaridad Sln1 es desactivado (no fosforilado), y en consecuencia Ypd1 y Ssk1 no son fosforilados. Ssk1 no fosforilado se une a Ssk2/Ssk22, posteriormente Ssk2 es activado por fosforilación y activa a Pbs2, la cual a su vez activa a Hog1 [321]. Se ha demostrado en *A. nidulans* que la fosforilación de SakA depende solamente del sistema TCS, lo cual difiere de la vía HOG de *S. cerevisiae*, donde Pbs2 puede ser activado por el sensor Sho1, una vía alternativa de activación de Hog1, esta ruta es llamada vía dependiente de Sho1 [316]. Por otro lado, se ha demostrado que Sho1 es más que un solo sensor, ya que también participa como proteína adaptadora conectando señales de la pared celular y la vía HOG [321]. Además de SakA, *A. nidulans* tiene otro homólogo de Hog1, la MAP cinasa MpkC, la cual es indispensable para la supervivencia en estrés osmótico, y también es fosforilada por PbsB [316]. En estrés osmótico, Sho1 activa a Ste20, la cual activa a Ste11, con ayuda de Ste50, así Ste11 puede activar la vía HOG mediante Pbs2 [321]. Se ha demostrado que Pbs2 interacciona físicamente con Sho1, Ste20, Ste11, Ste50 y Ssk2 [320]. En *S. cerevisiae*, Sho1 requiere de la activación del sensor Msb2 o Hkr1 para interactuar con Sho1 y Ste20

[321]. Cuando Msb2 se encuentra activado, interacciona con Bem1, la cual recluta a Ste20 y Cla4 para complementar el complejo y activar a Ste11 [322]. Se ha demostrado que BemA en *A. nidulans*, ortólogo de Bem1, es esencial para la conidiación y el desarrollo de las hifas [323]. Finalmente, la fosforilación de Hog1 provoca su translocación al núcleo donde modula la actividad de factores de transcripción por fosforilación. Se ha encontrado que Hog1 en *S. cerevisiae* regula la expresión de más de 300 genes, pero únicamente un grupo pequeño afecta a las concentraciones de glicerol [321]. La regulación negativa de Hog1 se lleva a cabo por un grupo de fosfatasa tanto en el núcleo como en el citoplasma [319]. En *A. nidulans* se ha demostrado que SakA y PbsB son esenciales para mantener la viabilidad y supervivencia de los conidios en altas concentraciones de H₂O₂ [324].

SskA es un regulador de respuesta, y en *A. nidulans* media la activación de la vía HOG en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. SskA coordina esta regulación junto con el regulador de respuesta llamado SrrA, ortólogo de Skn7 en *S. cerevisiae*, el cual es un factor de transcripción implicado en la resistencia a estrés oxidativo [325]. Se ha demostrado que SrrA responde a H₂O₂ y regula la expresión de la enzima catalasa CatB. SrrA, al igual que SskA, son requeridos para una conidiación normal y para la viabilidad de los conidióforos [326]. Además de SrrA, un estudio reciente ha demostrado que el factor de transcripción AtfA, también está implicado en la respuesta a estrés oxidativo y regulación del gen de catalasa, así como en el desarrollo de conidióforos, además AtfA juega un papel crucial en la respuesta a estrés térmico en conidios, pero no en micelio [327, 328, 329]. Junto con estos factores de transcripción se suma NapA, ortólogo de Yap1 en *S. cerevisiae*, el cual regula genes implicados en la resistencia a H₂O₂ y radicales superóxido, estos genes incluyen a *catB* (“*mycelia-specific catalase*”), *trxB* (“*thioredoxin reductase*”), *thiO* (“*thioredoxin*”) y *glrA* (“*glutathione reductase*”) [325]. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que NapA juega un papel importante en la conidiación, además, se estima que regula la expresión de al menos 214 genes, implicados en la utilización de etanol, destoxificación de compuestos, utilización de carbohidratos y metabolismo secundario [327]. En *A. nidulans*, se ha observado que SskA regula la expresión de genes implicados en la tolerancia a estrés en conidios, incluyendo genes implicados en el metabolismo de glicerol (“*glycerol-3-phosphate dehydrogenases: gfdA y gfdB*”, “*glycerol dehydrogenase: gldB*”) y trehalosa (“*trehalose-6-phosphate synthase: tpsA*”, “*trehalose-6-phosphate phosphatase: orlA*”, y “*neutral trehalase: treB*”) [319].

Como puede observarse la vía HOG es altamente compleja, y no es una vía independiente ya que comparte componentes con múltiples vías como de respuesta a la luz, pared celular, respuesta a feromonas, y diferentes tipos de estrés. Después de *S. cerevisiae*, *A. nidulans* es el hongo filamentoso más estudiado, sin embargo, la mayoría de los estudios comprende regulaciones a nivel transcripcional.

El fosfoproteoma de *P. chrysogenum* realizado en este trabajo permitió identificar varias proteínas de la vía HOG reguladas por fosforilación, algunas relacionadas directamente con la conidiación y otras relacionadas con el desarrollo. Las fosfoproteínas identificadas fueron: **Pc22g16370/ShoA** (S137), **Pc22g16340/SskA** (T461 y S599), **Pc22g04440/SrrA** (T269), **Pc16g11860/CatB** (S475), **Pc16g13300/PbsB** (S35), **Pc13g11680/HogA/SakA** (T172, Y174, S176 y T177), **Pc21g17500/Ste11/SteC** (Y171, S178, S182 y S537), **Pc20g00990/Cla4** (S76 y T78), **Pc20g15280/NapA** (S38), **Pc13g09580/AtfA** (S278), **Pc13g06260/BemA** (S457), **Pc22g22110/GfdA** (S205, S207, S209 y T210) y **Pc20g08480/OrlA** (S91, T93, S84 y S96), todas ortólogas de *A. nidulans*. A pesar de que *A. nidulans* y *P. chrysogenum* pertenecen al mismo Orden, es posible que existan diferencias funcionales en los componentes de la vía HOG y rutas alternas de señalización. Sin embargo, su presencia, la alta identidad en las secuencias y arquitectura son un fuerte indicio de que la vía en ambos hongos se encuentra altamente conservada.

Varios estudios realizados en *P. chrysogenum* han demostrado que la ausencia o inactivación de Pga1 incrementan la resistencia a diferentes tipos de estrés (osmótico, oxidativo y térmico) [112, 108, 109, 110, 111], por lo tanto, es posible que Pga1 regule efectores encontrados en la vía HOG.

3.4.5.3.4. Regulación del desarrollo

En *S. cerevisiae* se ha estudiado ampliamente una vía de señalización sexual que responde a feromonas e induce un proceso de diferenciación que provoca la fusión celular [330]. Esta vía es regulada por un módulo de tres proteínas cinasas: Ste11 (MAP3K), Ste7 (MAP2K) y Fus3 (MAPK), y una proteína Ste5 (“scaffold”), que mantiene juntas a las tres cinasas favoreciendo la fosforilación [331]. La señalización comienza con la unión de feromonas a receptores de membrana (Ste2 o Ste3), los cuales están acoplados a proteínas de unión a nucleótidos de guanina (por ejemplo, proteínas G heterotriméricas), las cuales inician la transducción de señales. Esta señal mediada por feromonas induce la

liberación del dímero $G\beta\gamma$ a partir del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$. Posteriormente, Ste5 se une al dímero activado $G\beta\gamma$ y recluta al módulo Ste11-Ste7-Fus3 hacia la membrana cerca de la cinasa Ste20, donde esta última inicia la cascada de señalización por fosforilación de Ste11 [332]. A este complejo se une un segundo adaptador, Ste50, el cual es requerido para la localización y activación de Ste11 [333]. La fosforilación de Fos3 provoca su liberación de Ste5 y translocación al núcleo, donde fosforila factores de transcripción como Ste12, el cual es necesario para activar la vía sexual [334].

Esta misma vía ha sido estudiada en hongos filamentosos y no sólo está involucrada en el desarrollo sexual, sino también en el desarrollo asexual y procesos relacionados con el mismo, como la patogenicidad, producción de metabolitos secundarios y conidiación. El módulo Ste11-Ste7-Fus3 es conservado en hongos filamentosos, a excepción de Ste5, el cual está ausente. En *A. nidulans* SteC, MkkB, MpkB, SteD y SteA son ortólogos de Ste11, Ste7, Fus3, Ste50 y Ste12, respectivamente [183]. *N. crassa*, otro hongo filamentoso modelo, también conserva el mismo módulo de cinasas (NRC-1-MEK-2-MAK-2), el cual regula la germinación y fusión de hifas [335]. En *N. crassa* y *A. nidulans* se ha identificado un adaptador que hace la función de Ste5, llamado HAM-5 y HamE, respectivamente, el cual funciona de “scaffold” para el módulo Ste11-Ste7-Fus3, y además interacciona físicamente con el adaptador Ste50 [336, 337]. En *P. chrysogenum* fue identificado un ortólogo de HamE, **Pc21g03110**, fosforilado en las posiciones S1037, S1039, S1040 y S1045, y es posible que como ocurre en *A. nidulans*, Pc21g03110 realice la función de “scaffold” para el módulo Ste11-Ste7-Fus3.

Se ha observado que la delección de *steC* en *A. nidulans* trae consigo una tasa de crecimiento lenta, hiperramificación de hifas y morfología de conidióforos alterada [182]. En *A. flavus* se reportó que los sitios de fosforilación S187 en Ste11 son esenciales para la formación de los conidióforos ya que la sustitución de serina por ácido Aspártico provoca conidióforos cortos y reducción en la cantidad de conidios. Además, la fosforilación está implicada en la biosíntesis de aflatoxinas [235]. En *P. chrysogenum* se identificó la proteína **Pc21g17500** fosforilada en los sitios Y171, S178, S182 y S537, ortóloga de SteC en *A. nidulans*. El sitio de fosforilación S182, se corresponde con el sitio S187 identificado en *A. flavus*. Un alineamiento múltiple de secuencias muestra la secuencia consenso [S/P][L/P]SRP[A/G]**S**P[P/L][A/R][G/A][D/Q][S/R].

En *A. nidulans* se ha demostrado que MpkB fosforila a SteA y VeA, para regular el desarrollo y metabolismo secundario [183]. VeA pertenece a la familia de proteínas Velvet

compuesta por cuatro subfamilias (VeA, VelB, VelC y VosA) encontradas en hongos ascomicetos y basidiomicetos, y ausentes en levaduras [338, 280]. Los heterodímeros Velvet VeA-VelB y VosA-VelB tienen funciones diferentes en el desarrollo, VeA-VelB promueve el desarrollo sexual, mientras que VelB-VosA inhibe la diferenciación asexual [338]. VosA es un factor de transcripción que se une a más de 1500 secuencias promotoras y regula negativamente la conidiación durante el crecimiento vegetativo, al reprimir la expresión temprana de los genes *brlA* y *sclB* (este último un antagonista de VosA) [339]. Esta familia se conoce por controlar el metabolismo secundario y el desarrollo dependiente de luz en hongos filamentosos [340, 341]. El complejo VelB-VosA decrece en presencia de luz, lo cual favorece el desarrollo asexual, mientras que en oscuridad la cantidad del complejo aumenta y se favorece el desarrollo sexual [342]. Los genes *vosA* y *velB* son activados en las fiálides por AbaA (proteína regulada por BrlA) en oscuridad y transportados al núcleo de los conidios para formar el complejo dimérico VelB-VosA [343]. El gen *vosA* es expresado específicamente durante la formación de esporas sexuales y asexuales, y sus niveles de ARN mensajero son altos en ambos tipos de esporas [342]. Otro papel fundamental de VosA y VelB es la regulación de genes biosintéticos de trehalosa en conidios y ascosporas, la trehalosa confiere mayor viabilidad y tolerancia a estrés térmico y oxidativo a los conidios [344]. En *P. chrysogenum* fue identificada la proteína **Pc22g06890**, ortóloga de VosA, regulada por fosforilación en el sitio S156. Hasta el momento no existe ningún reporte sobre alguna posible regulación de VosA por fosforilación, por lo tanto, resulta interesante haber identificado esta proteína fosforilada, y sobre todo por jugar un papel tan importante en la conidiación. SclB es otro factor de transcripción regulado por VosA. Se ha demostrado que SclB es esencial para la conidiación, ya que su ausencia reduce drásticamente la producción de conidióforos [339]. Además, SclB funciona como antagonista de VosA, es decir, induce la expresión temprana de genes activadores de diferenciación asexual como *flbC*, *flbD* y *brlA* [339]. Se ha demostrado que la represión de la conidiación durante el crecimiento vegetativo ocurre por la unión de VosA y NsdD al promotor de *brlA* [345]. NsdC y NsdD son requeridos para el desarrollo asexual; estos factores de transcripción regulan la expresión de genes requeridos para el desarrollo temprano de los conidióforos, previo a la formación de conidios [346]. Después de la etapa de germinación de conidios ocurre una desrepresión de *brlA*, y esta se caracteriza por la deslocalización de VosA, NsdC y NsdD del promotor de *brlA*, lo cual permite que las proteínas Flb ("*fluffy low brlA*: *FlbB*, *FlbC*, *FlbD* y *FlbE*")

activen la expresión de *brlA* [347]. Se ha descrito una quinta proteína Flb, FlbA, la cual regula el desarrollo de forma indirecta, participando como antagonista de la represión de la conidiación por la vía de las proteínas G heterotriméricas, y por tanto reprimiendo el crecimiento vegetativo [68]. Se ha identificado otro conjunto de represores de la conidiación ("*suppressor of fluG*": SfgA, SfgB, SfgC y SfgD), los cuales regulan negativamente la expresión de genes *flb* [348]. Como se ha venido mencionando BrIA es un regulador esencial de la conidiación. BrIA junto con dos factores de transcripción más, AbaA y WetA, regulan la vía central del desarrollo ("*central developmental pathway: CDP*") en hongos filamentosos, controlando la expresión de genes específicos de la conidiación. BrIA se encarga de regular la expresión de genes implicados en la conidiación, AbaA regula genes requeridos en las etapas media y terminal del desarrollo de los conidióforos, incluida la formación de fiálides, y WetA se encarga de regular genes implicados en el ensamblaje de la pared conidial [174, 349]. Además de FlbA, las proteínas G heterotriméricas regulan el proceso de conidiación indirectamente, como se describió en la sección [2.4.5](#). Curiosamente, en este trabajo se identificó la fosforilación S18 en la subunidad Gy (**Pc16g10360**, ortóloga de GpgA en *A. nidulans*) de las proteínas G heterotriméricas, en *M. oryzae* también fue identificada la fosforilación S21 en la misma subunidad (MGG_10193T0) [229], la cual después de realizar un alineamiento múltiple de secuencias resultó que son equivalentes ([I/V][R/K][R/N][N/K]KQ**S**[M/V]ADLK[L/Y]). Por estudios funcionales en *A. nidulans* y en otros hongos filamentosos se sabe que la subunidad Gy es necesaria para una conidiación normal y el crecimiento vegetativo [350], pero se desconoce qué papel tendría la fosforilación en estos procesos, lo cual resultaría interesante investigar. En la vía de señalización por proteínas G heterotriméricas, interviene otro elemento importante, la proteína PKA. En *A. nidulans* se han caracterizado dos PKAs, PkaA y PkaB, de las cuales, PkaA juega un papel importante en el crecimiento vegetativo y germinación de los conidios, pero controla negativamente la conidiación y producción de micotoxinas [351]. PkaB está implicada en la germinación de conidios, lo cual sugiere que PkaB funciona como respaldo de PkaA, sin embargo, se ha observado que la delección de ambas PKAs es letal, indicando que PkaA y PkaB son esenciales para la viabilidad de *A. nidulans* [351, 352].

Además de haber identificado los ortólogos de HamE, SteC y VosA, en este trabajo se identificaron otros reguladores del desarrollo, principalmente implicados en la conidiación, descritos previamente: **Pc06g00470**/BrIA (T255 y S308), **Pc21g21680**/ScIB (S73),

Pc21g04980/NsdC (S219), **Pc13g15350**/NsdD (S481), **Pc15g00600**/FibA (S236), **Pc22g16500**/PkaB (S28).

3.4.5.3.5. Otras fosfoproteínas implicadas en la conidiación

Además de cinasas y factores de transcripción, existe un amplio grupo de proteínas implicadas en la conidiación que no deja de ser importante: a continuación, se describen varias de estas proteínas, y su posible papel en *P. chrysogenum*.

Pc21g06690 (S813) ortólogo de RtmC en *A. nidulans*. RmtC es una arginina metiltransferasa específica de histonas, homóloga de RmtA [353]. RmtA está implicada en la regulación epigenética por metilación de histonas. Se ha demostrado que esta regulación epigenética afecta a una variedad de procesos celulares, incluyendo la morfogénesis y el metabolismo secundario. También se ha demostrado que la ausencia de *rmtA* provoca hiperconidiación, indicando que RmtA es un represor del desarrollo asexual, esto fue sustentado con la alta expresión de *brlA*, *abaA* y *wetA* comparada con la cepa silvestre [354]. **Pc18g03850** (S592 y S598) es ortólogo de RpdA en *A. nidulans*. RpdA es una histona desacetilasa (“*histone deacetylase activity: HDAC*”) implicada en la regulación epigenética de la conidiación, metabolismo secundario y patogenicidad [355, 356]. **Pc18g03490** (S383, T385, S502 y S569) ortóloga de Atg1 en *A. nidulans*. En un análisis fosfoproteómico en *M. oryzae* se identificaron cinco proteínas de la autofagia (MoAtg1, MoAtg2, MoAtg3, MoAtg17, y MoAtg18) reguladas por fosforilación durante la formación de apresorios [229]. En *B. bassiana* se demostró que BbATG1, ortólogo de Atg1 en *A. nidulans*, es requerido para la producción de conidios aéreos [357]. **Pc13g02620** (S248) ortólogo de la proteína cinasa SchA en *A. nidulans*, y ortólogo de SCH9 en *S. cerevisiae*, controla la cinética de degradación de trehalosa y la germinación conidial [224]. SchA de *A. nidulans* fue fosforilada en los sitios (S285, S298 y S827) [234], de los cuales S285 es equivalente con S248 de acuerdo con un alineamiento múltiple de secuencias. **Pc12g11480** (S529 y S1138) ortólogo de CyaA en *A. nidulans* y *AcyA* en *A. fumigatus*. En estudios funcionales se demostró que la delección de *acyA* junto con *gpaB* provoca una conidiación reducida [358]. Por otro lado, la delección de *cyaA* provoca un deterioro en la degradación de trehalosa en conidios y un decaimiento en la emergencia del tubo germinal [224]. Fac1 en *Fusarium verticillioides*, ortólogo de CyaA, está implicado en la virulencia, y en la tolerancia a estrés térmico y oxidativo, también en los niveles de expresión de los

genes *HYD1* y *HYD2* de hidrofobinas, importantes en la formación de microconidios [359]. **Pc12g10390** (S13, S376, S1776 y T1778) ortólogo de DopA en *A. nidulans*. La ausencia de DopA en *A. nidulans* provoca morfología anormal en hifas vegetativas y altera drásticamente la morfología de los conidióforos. Además, altera los patrones de expresión de reguladores clave de la conidiación como *brlA*, *abaA* y *steA* [360]. **Pc21g07000** (S228, T835 y S1354), ortólogo de Bud3 en *A. nidulans*, juega un papel importante en el desarrollo del conidióforo. Estudios funcionales han revelado que su delección provoca defectos en la estructura del conidióforo, incluyendo elongación de la métula y fiálides, por lo tanto, probablemente Bud3 es requerido en múltiples pasos del desarrollo del conidióforo [361]. **Pc16g03380** (Y189 y S191) es ortólogo de BudA en *A. nidulans* y Bud6 en *N. crassa*. BudA está implicada en la formación de septos, sin embargo, se ha mostrado que su delección causa una drástica reducción de la tasa de crecimiento respecto a la cepa parental, provoca la aparición de colonias compactas y no desarrolla conidióforos [362], lo cual indica su importancia en la etapa conidiogénica. **Pc16g02410** (S286, T290, S577 y S591) es ortólogo de Axl2 en *A. nidulans*. Esta proteína es requerida para la regulación de la morfogénesis de las fiálides durante la conidiación. Además, Axl2 se localiza en la unión fiálide-espora, donde recluta septinas, y se ha demostrado que su expresión es regulada por BrlA y AbaA [363]. **Pc13g05480** (S112) es ortólogo de FimA en *A. nidulans*. Esta proteína es importante para la diferenciación de los conidióforos, se localiza principalmente en vesículas, métulas, fiálides y conidios, y es tan importante que su ausencia provoca deformaciones estructurales del conidióforo [364]. El crecimiento polarizado es una propiedad de todas las células desde neuronas hasta hongos filamentosos. En *A. nidulans* se ha identificado el complejo MobB y CotA (ambas proteínas cinasas), implicado en la segregación nuclear en los conidios, formación de septos, elongación de las hifas, y en la conidiación [365]. En *P. chrysogenum* se identificaron proteínas ortólogas de este complejo, **Pc16g02290** (S50) y **Pc22g04990** (S132, S143 y S161), las cuales están reguladas por fosforilación.

Fig. 21. Vías de señalización implicadas en la conidiación de *P. chrysogenum*.

“*This study*”: fosfoproteínas ortólogas de *A. nidulans* implicadas directamente en la conidiación.

“*Reference*”: Proteínas caracterizadas en *A. nidulans* que intervienen en vías de señalización.

“*Protein interaction*”: Interacciones proteína-proteína descritas en especies de *Aspergillus*.

“*Putative protein interaction*”: posibles interacciones proteína-proteína, principalmente con la subunidad Gα Pga1.

“*Phosphorylated*”: Describe si hay sitios de fosforilación en la cepa Wis54-1255, en caso contrario solo si hay en 44_Pga1Q204 o en $\Delta pga1$.

La Barra de color indica el grado de fosforilación ($\log_2(44_Pga1Q204/Wis54-1255)$, $\log_2(\Delta pga1/Wis54-1255)$) respecto a Wis54-1255, o ($\log_2(44_Pga1Q204/\Delta pga1)$, $\log_2(\Delta pga1/44_Pga1Q204)$) respecto a 44_Pga1Q204 o $\Delta pga1$.

3.4.5.3.6. Efectores de Pga1 y fosforilación diferencial

Una proteína efectora es definida como cualquier proteína que es regulada directamente por otra que se encuentra corriente arriba dentro de un proceso/vía de regulación (definición modificada de [366]). Existen efectores directos e indirectos, sin embargo, en la forma indirecta, la regulación puede comprender múltiples pasos e interacción y/o participación de otras proteínas que actúan sobre la proteína efectora, o proteínas efectoras previas. Pga1, al igual que las subunidades $G\alpha$ de otros hongos filamentosos y otros organismos, se localiza en la cara interna de la membrana plasmática. Aunque esto no se ha estudiado en hongos filamentosos, en organismos superiores se ha demostrado que la subunidad $G\alpha$ se localiza en membranas de otros compartimentos subcelulares incluyendo mitocondria [367], retículo endoplásmico y aparato de Golgi [368]. Se ha demostrado que la asociación de las subunidades $G\alpha$ a la membrana depende de la miristilación y/o palmitoilación, y de su asociación al dímero $G\beta\gamma$. Algunas subunidades $G\alpha$ (como $G\alpha_i$ y $G\alpha_o$) presentan ambas, mientras que otras solo son palmitoiladas o miristiladas ($G\alpha_q$ y $G\alpha_s$) [369]. La localización de las subunidades $G\alpha$ puede representar una limitación, ya que el estar exclusivamente unidas a la membrana restringe, obviamente, su movilidad e interacción con otras proteínas. Pero, por otro lado, esto puede contribuir a una señalización eficiente y específica. Como se mencionó anteriormente, la subunidad $G\alpha$ y el dímero $G\beta\gamma$, en su forma activa, regulan efectores directos localizados en la cara interna de la membrana plasmática, como adenilato ciclasa, fosfolipasas y canales iónicos, entre otros.

Un análisis funcional usando STRING muestra que Pga1 interacciona con 8 proteínas fosforiladas (**Fig. 22**) implicadas directamente en la conidiación (identificadas en este trabajo). Cabe mencionar que varias de estas interacciones son determinadas a partir de enfoques experimentales y con homólogos en otros hongos u otros organismos. Estos efectores fosforilados directos de Pga1 implicados en la conidiación fueron **Pc22g16500** (PkaB), **Pc16g10360** (GpgA), **Pc12g11480** (AcyA), **Pc21g05940** (RasA), **Pc15g00600** (FlbA), **Pc21g07090** (PkcA), **Pc16g13300** (PbsB) y **Pc21g17500** (SteC). Además, se identificaron efectores indirectos que regulan procesos como el crecimiento vegetativo, la respuesta a estrés osmótico y oxidativo, germinación y la conidiación, y cabe mencionar que este efecto indirecto se refleja en varios niveles de regulación como el transcripcional y

postraducciona (Fig. 21). Además de estos efectores, se identificó una fosfoproteína que podría ser un efector directo de Pga1, **Pc16g04070** (fosforilada en los sitios T842, T844, S846 y S1288), ortólogo de SCP160 en *S. cerevisiae*. Hasta el momento no existe reporte alguno de esta proteína en hongos filamentosos, y en consecuencia se desconoce su papel en la conidiación. SCP160 es un efector de GPA1 en *S. cerevisiae*, y está implicado en el crecimiento polarizado [370]. La posible interacción de Pc16g04070 con Pga1 puede explicarse ya que se ha demostrado en *S. cerevisiae* que SCP160 está asociada a la membrana y ribosomas [371]. Además de SCP160, en *S. cerevisiae* se identificó otro efector directo de la subunidad G α , Fus3, ortólogo de PkcB en *A. nidulans*, donde se demuestra una interacción entre GPA1 y Fus3 [372]. Recientemente, en un estudio en *Phytophthora sojae* se identificó un efector directo de la subunidad G α PsGPA1, la serina-treonina cinasa PsYPK1 [373], ortóloga de PkcB en *A. nidulans*. Se demostró que PsGPA1 es un regulador negativo de la formación de esporangios y, además, se observó que la interacción entre PsGPA1 y PsYPK1 impide la localización nuclear de PsYPK1, el cual es requerido para la formación de esporangios. Otro estudio anterior en *P. sojae* también identificó otro efector directo de PsGPA1, la proteína PsHint1, implicada en la quimiotaxis y patogenicidad [374]. Aunque *P. sojae* no es un hongo ascomiceto, estos trabajos aportan información relevante sobre la funcionalidad de la subunidad G α y su papel en el desarrollo.

Como se puede observar, en este trabajo se identificaron varias fosfoproteínas implicadas directa e indirectamente en la conidiación de *P. chrysogenum*. Varias fosfoproteínas presentaron fosforilación diferencial exclusiva de condición/cepa (Wis54-1255, 44_Pga1Q204 o $\Delta pga1$), lo que demuestra que algunos resultados observados en los estudios fenotípicos dependen de estas fosforilaciones. Como primer ejemplo se puede mencionar el comportamiento que presentaron las cepas 44_Pga1Q204 y $\Delta pga1$ en la conidiación y respuesta a estrés oxidativo. La sensibilidad de 44_Pga1Q204 y la resistencia de $\Delta pga1$ al estrés oxidativo debe depender en gran medida de la regulación de la vía HOG y/o rutas alternas con las que comparte componentes. En primer lugar, la sensibilidad en 44_Pga1Q204 podría explicarse en parte a que la proteína **Pc22g04440/SrrA**, uno de los elementos principales en la respuesta a estrés oxidativo no fue identificada. Por otro lado, la proteína **Pc13g09580/AtfA**, catalogada como uno de los reguladores centrales de la respuesta a estrés oxidativo, tampoco fue identificada en 44_Pga1Q204, mientras que en $\Delta pga1$ fue fosforilada por **Pc13g11680/HogA**, lo que

sugiere que AftA no está activando genes responsables de la respuesta a estrés oxidativo y biosíntesis de trehalosa en 44_Pga1Q204, lo cual explica la sensibilidad y poca viabilidad de esta cepa en presencia de H₂O₂. Adicional a estos resultados, se identificaron tres fosfoproteínas (**Pc20g13800**/SipA, **Pc20g12780**/SipC y **Pc18g02160**/SipF) que posiblemente pertenecen al complejo STRIPAK (“*striatin-interacting phosphatase and kinase*”), recientemente caracterizado en los hongos filamentosos *S. macrospora* [375] y *A. nidulans* [376], pero no descrito en ninguna especie de *Penicillium*. Este complejo está constituido por siete proteínas (StrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SipE y SipF), y en *A. nidulans* están implicadas en la localización nuclear de la cinasa MpkB, en la expresión de *brlA*, *abaA*, *steA* y *nsdD*, y además regula la expresión de genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo. Curiosamente ninguna de las tres fosfoproteínas identificadas fue fosforilada en la cepa 44_Pga1Q204, lo cual puede estar relacionado con su sensibilidad a estrés oxidativo. También resulta interesante observar en $\Delta pga1$ que dos fosfatasa que regulan negativamente a HogA tengan patrones de fosforilación opuestos al resto de cepas. En primer lugar, la fosfatasa **Pc13g05710**/PtpA no fue encontrada en $\Delta pga1$, mientras que en las cepas Wis54-1255 y 44_Pga1Q204 se identificaron dos sitios de fosforilación, de los cuales S204 resultó sobrerrepresentado respecto a Wis54-1255. Por otro lado, en **Pc21g03560**/PtcA se identificaron cinco sitios de fosforilación, de los cuales cuatro no se identificaron en $\Delta pga1$, S98, el único sitio identificado en las tres cepas mostró estar sobrerrepresentado en 44_Pga1Q204 respecto a Wis54-1255, mientras que entre $\Delta pga1$ y Wis54-1255 no hubo diferencia. Curiosamente también se identificaron tres enzimas reguladas por fosforilación implicadas en la biosíntesis (**Pc20g08480** “*trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase*” y **Pc21g04930** “*trehalose 6-phosphate synthase complex regulatory subunit*”) e hidrólisis de trehalosa (**Pc22g03670** “*alpha, alpha-trehalase*”), relacionadas con la integridad de la pared celular.

Por otro lado, se identificaron fosfoproteínas exclusivas de cepa; por ejemplo el factor de transcripción **Pc12g01260**/DevR fue fosforilado e identificado sólo en la cepa $\Delta pga1$. DevR regula la biosíntesis de melanina, compuesto implicado en la resistencia a varios tipos de estrés en varios hongos filamentosos. Además de DevR, también se identificaron los factores de transcripción **Pc06g00470**/BrlA, **Pc21g21680**/SclB, **Pc21g17500**/NsdC y **Pc22g06890**/VosA, y además la subunidad Gy **Pc16g10360**/GpgA de las proteínas G heterotriméricas, todos presentes únicamente en la cepa $\Delta pga1$. Esto resulta interesante ya que la presencia de estos factores de transcripción (DevR, BrlA, SclB, NsdC y VosA) en

la cepa $\Delta pga1$ está estrechamente relacionada con su fenotipo híperconidiante y resistente a estrés oxidativo.

En muchos trabajos se ha demostrado que estas proteínas juegan un papel esencial en la conidiación y desarrollo de conidióforos, sin embargo, hasta este punto se desconoce el objetivo de la fosforilación en de estas proteínas, ya que este cambio postraducciona puede jugar dos roles: el de activar o desactivar la funcionalidad de la proteína. Como puede observarse están implicadas varias vías de señalización (vía de integridad de la pared celular, vía HOG y vía de respuesta a feromonas) y la posible conexión entre ellas puede encontrarse en el módulo de cinasas SteC/Ste11-MkkB/Ste7-MpkB/Fus3, mediante la fosforilación de SteC/Ste11, la cual también participa de manera activa activando la vía HOG (**Fig. 21**).

Como puede observarse la fosforilación es un proceso altamente complejo y de alguna forma permite obtener una visión general de otro nivel de regulación que ocurre en todos los organismos, incluyendo los hongos filamentosos. Sin embargo, la confirmación del verdadero papel de las fosforilaciones sólo se puede obtener mediante estudios puntuales de esos sitios de fosforilación, de esa forma se podrían responder las hipótesis sobre la funcionalidad de la proteína y su papel en los procesos fisiológicos del hongo. Cabe mencionar que varias de estas fosforilaciones provocan cambios fenotípicos indetectables, mientras que otros provocan efectos drásticos.

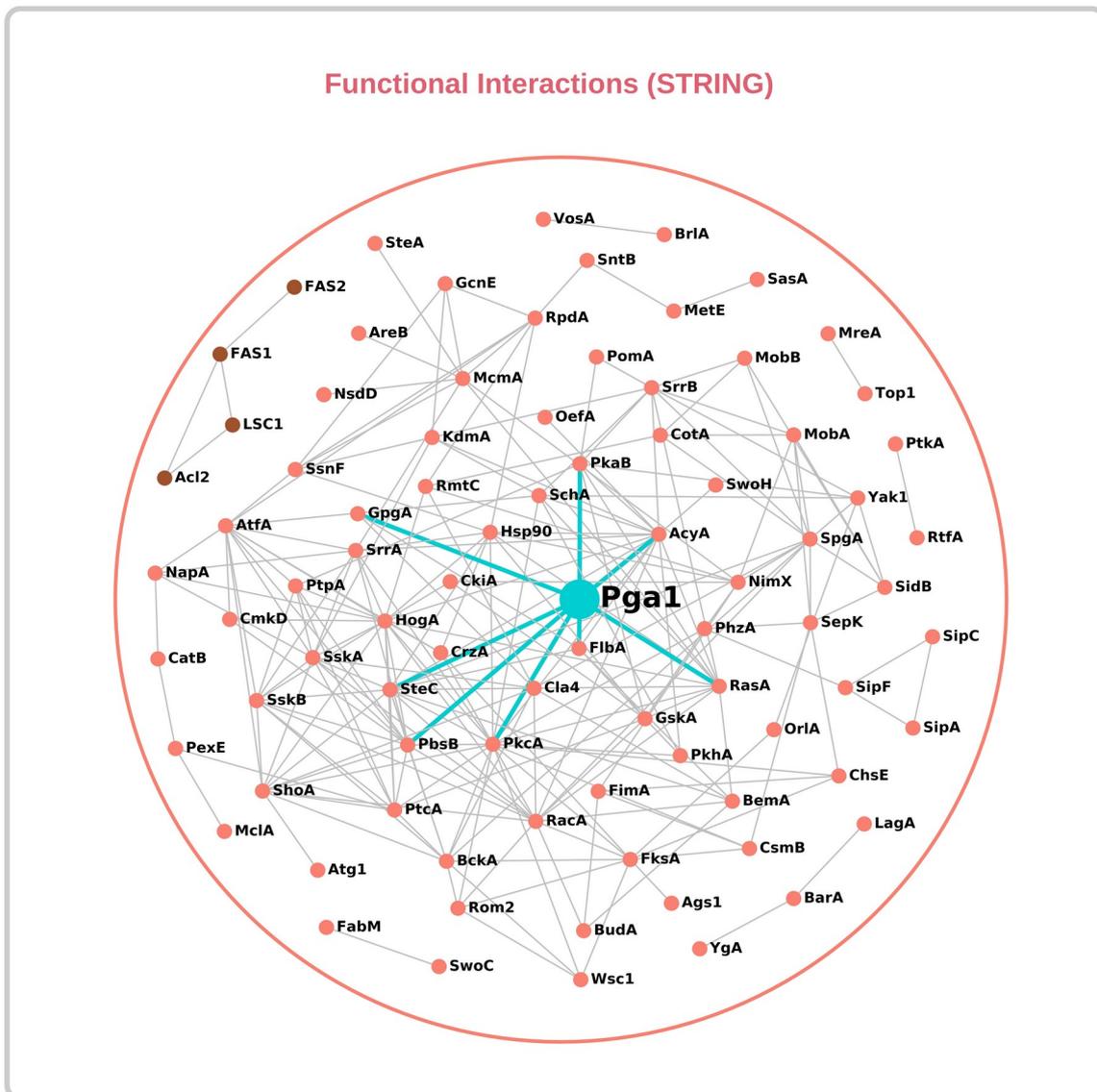


Fig. 22. Efectores de Pga1.
 Interacciones de un análisis *in silico* usando la base de datos de STRING de todas las proteínas fosforiladas implicadas en la conidiación.

3.5. Conclusiones

1. En total se identificaron 1165 proteínas fosforiladas entre las cepas Wis54-1255, 44_Pga1Q204 y $\Delta pga1$.
2. De las 1165, 87 fosfoproteínas participan directamente en la conidiación y desarrollo de conidióforos.
3. Las condiciones experimentales y la metodología de enriquecimiento de péptidos permitieron enriquecer proteínas implicadas directamente en la conidiación, comprobado con un análisis *in silico* usando todo el proteoma de *P. chrysogenum*.
4. Se identificaron cuatro vías de señalización (inicio de la septación, integridad de la pared celular, respuesta a estrés oxidativo y osmótico, y desarrollo asexual) altamente conservadas en hongos filamentosos, incluyendo la identificación de tres (Pc20g13800/SipA, Pc20g12780/SipC y Pc18g02160/SipF) componentes del complejo STRIPAK recientemente caracterizado en *A. nidulans*.
5. Se observa un marcado fenómeno “*crosstalk*” en las vías de señalización de *P. chrysogenum*, todas de alguna forma relacionadas con el desarrollo de conidióforos al modificar los patrones de fosforilación de reguladores esenciales del desarrollo asexual como BriA, VosA, SclB, SteA, OsaA, BemA, NapA, MobA, CrzA, RtfA, DopA, NsdC y NsdD.
6. La fosforilación diferencial muestra cambios importantes en reguladores importantes de la conidiación y desarrollo de conidióforos. Además, también se observan cambios en múltiples fosfoproteínas implicadas en otras vías de señalización que contribuyen a la viabilidad, integridad y desarrollo de los conidios y conidióforos.
7. Fueron identificados cuatro posibles efectores directos de Pga1: Pc21g07090/PkcA, Pc21g05940/RasA, Pc16g04070/SCP160 y Pc21g17500/SteC.

Capítulo 4

***“Software”* Bioinformático**

4.1. NeVOmics: An Enrichment Tool for Gene Ontology and Functional Network Analysis and Visualization of Data from OMICs Technologies

El manejo, procesamiento y análisis de grandes volúmenes de datos es un desafío. Actualmente, la disponibilidad y acceso a las nuevas tecnologías ha permitido realizar estudios globales (“Ómicos”) con mayor frecuencia, con el fin de obtener más información sobre un determinado estado fisiológico de la célula. Aunque existen numerosos programas y plataformas para analizar múltiples tipos de datos, con diferentes formatos, siempre presentan sus limitaciones, sobre todo porque hay un sesgo que recae en los objetivos del desarrollador. La mejor forma de procesar, analizar e interaccionar con los datos provenientes de estos enfoques es usando herramientas poderosas como lenguajes de programación (Python, Perl, R, M, entre otros) que saquen el mayor provecho de los datos e información; sin embargo, esta no es una tarea fácil. Con el fin de contribuir al análisis de datos obtenidos de enfoques “Ómicos” se desarrolló una herramienta bioinformática en lenguaje Python (“*Network-based Visualization for Omics: NeVOmics*”, <https://github.com/bioinfproject/bioinfo/>) que permite procesar grandes listas de genes/transcritos/proteínas. Esta herramienta se enlaza a servidores en tiempo real para extraer la información actualizada y, además, cuenta con visualizaciones alternativas de los datos procesados, lo cual ayuda a digerir e interpretar mejor la información.

NeVOmics es un programa bioinformático de interfaz gráfica (“*graphical user interface: GUI*”, **Fig. 22**) que emplea una distribución hipergeométrica para identificar rutas metabólicas, vías de señalización, procesos biológicos, funciones moleculares o componentes celulares estadísticamente significativos a partir de una lista de genes/transcritos/proteínas obtenida de alguna tecnología “Ómica” [278].

NeVOmics fue depositado en GitHub, una de las plataformas más grandes del mundo donde se llevan a cabo múltiples trabajos colaborativos entre desarrolladores. En este sitio se encuentra toda la documentación incluyendo “*scripts*” de Python, “*scripts*” de R, material suplementario, y manual de instalación y uso.

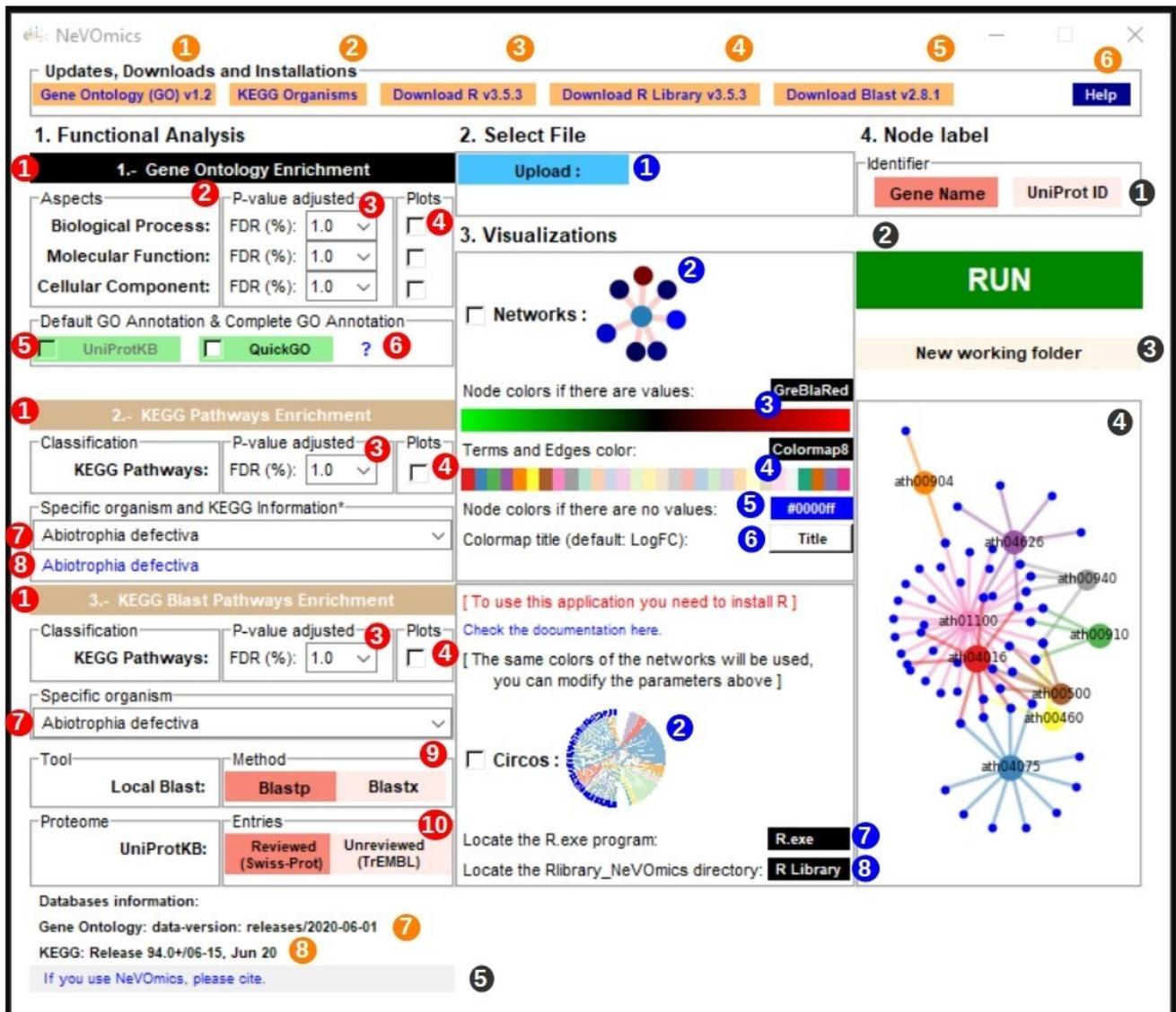


Fig. 23. Interfaz gráfica del programa bioinformático NeVOmics.

1. Link to download and update the Gene Ontology.
2. Link to update the KEGG organisms.
3. Link to download R v3.5.3.
4. Link to download Library for R v3.5.3.
5. Link to download and install Blast v2.8.1.
6. Recommendations for downloads, installations and updates of programs and databases.
7. Version of Gene Ontology.
8. Version of KEGG organisms.
1. Radio button with analysis options (Gene Ontology Enrichment, KEGG Pathways Enrichment and KEGG BLAST Pathways Enrichment). You can only select one in each run.
2. Aspects of Gene Ontology.
3. Scroll values box to select an FDR (from 0.05 to 20%).
4. Check box to activate graphics creation.
5. Type of Annotation for Gene Ontology (UniProtKB and Complete Annotation). The download of the complete entry can take from 10 min to 2 h, depending on the organism and the internet speed.
6. Link to the explanation of the difference between the two types of annotation.

7. All organisms annotated in KEGG Database are included, approximately 6221 (2019/11/8) organisms (534 eukaryotes, 5383 bacteria, 304 archaea).
 8. Link with information about organisms deposited on KEGG Database.
 9. Radio button to select an BLAST method (you need to install BLAST).
 10. Swiss-Prot (reviewed) is a high quality manually annotated and non-redundant protein sequence database, which brings together experimental results, computed features and scientific conclusions. TrEMBL (unreviewed) contains protein sequences associated with computationally generated annotation and large-scale functional characterization (<https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>).
1. File in tabular format. NeVOmics accepts only UniProtKB identifiers. NeVOmics does not accept lists with duplicate identifiers.
 2. NeVOmics builds two types of visualizations including Networks and Chords, also creates Bar and Pie charts, in PNG and SVG formats (SVG figures included links to KEGG and UniProtKB Databases). Open SVG figures with a web browser of your preference.
 3. Button to select an color scale to assign them to numerical values associated with genes/proteins. Below this button the select scale is displayed.
 4. Button to select a colormap to assign them to enriched terms and their edges. Below this button the select scale is displayed.
 5. Button to select a color to genes/proteins when no numerical values are included in the list.
 6. Button to select a title of color scale.
 7. Button to search and define the location of R.exe program.
 8. Button to search and define the location of R Library (Rlibrary_NeVOmics). The library "Rlibrary_NeVOmics" downloaded was built with R-3.5.3, therefore it is recommended that R-3.5.3 be installed.
1. Node label type for genes/proteins, this can be the name of the gene (according to KEGG and UniProtKB) or the UniProtKB identifier.
 2. Button to run the analysis, each run is done in a separate window.
 3. The work done will be shown here and a button will appear to open the created new folder.
 4. Example of a Network Created by NeVOmics.
 5. Link to NeVOmics paper.

Article

NeVOmics: An Enrichment Tool for Gene Ontology and Functional Network Analysis and Visualization of Data from OMICs Technologies

Eduardo Zúñiga-León , Ulises Carrasco-Navarro and Francisco Fierro * 

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Ciudad de Mexico 09340, Mexico; pgen10@hotmail.com (E.Z.-L.); ulises.c.n@gmail.com (U.C.-N.)

* Correspondence: degfff@yahoo.com or fierrof@xanum.uam.mx

Received: 26 September 2018; Accepted: 16 November 2018; Published: 23 November 2018



Abstract: The increasing number of OMICs studies demands bioinformatic tools that aid in the analysis of large sets of genes or proteins to understand their roles in the cell and establish functional networks and pathways. In the last decade, over-representation or enrichment tools have played a successful role in the functional analysis of large gene/protein lists, which is evidenced by thousands of publications citing these tools. However, in most cases the results of these analyses are long lists of biological terms associated to proteins that are difficult to digest and interpret. Here we present NeVOmics, Network-based Visualization for Omics, a functional enrichment analysis tool that identifies statistically over-represented biological terms within a given gene/protein set. This tool provides a hypergeometric distribution test to calculate significantly enriched biological terms, and facilitates analysis on cluster distribution and relationship of proteins to processes and pathways. NeVOmics is adapted to use updated information from the two main annotation databases: Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). NeVOmics compares favorably to other Gene Ontology and enrichment tools regarding coverage in the identification of biological terms. NeVOmics can also build different network-based graphical representations from the enrichment results, which makes it an integrative tool that greatly facilitates interpretation of results obtained by OMICs approaches. NeVOmics is freely accessible at <https://github.com/bioinformproject/bioinfo/>.

Keywords: Gene Ontology; KEGG pathways; enrichment analysis; proteomic analysis; plot visualization

1. Introduction

Omics technologies are revolutionizing biological research by enabling genome-scale analysis of complex biological systems and processes [1]. Functional annotation of data from these approaches is essential to reduce the huge complexity of lists with hundreds to thousands of genes/proteins to a few processes or pathways in which they are involved, which will have more explanatory power than a simple list of identifiers. Several bioinformatic tools have been developed to perform functional annotations [2,3]. Over-representation analysis (ORA) is the most popular bioinformatic methodology to obtain significant functional information (enrichment) from sets of related genes/proteins [4]. The ORA method consists of searching in biological databases (e.g., Gene Ontology, GO [5] or Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG [6]), using statistical testing to find biological terms, and functional annotations that are significantly enriched in a list of genes/proteins. The aim of the enrichment analysis is finding biological annotations that are over-represented in the query gene/protein list compared to what would be expected in a reference list (usually the whole proteome) [7]. In other words, if in a set of proteins certain biological processes or pathways are

significantly enriched, the proteins with such signatures are likely to play these roles *in vivo*. However, in most cases, the results of these analyses are very long lists of biological terms or pathways associated to genes/proteins that are difficult to digest and interpret. Most available enrichment tools do not include comprehensible graphical visualizations and present the results as simple bar or pie chart plots, which do not allow insight into the functional relationships existing between the identified genes/proteins and the enriched GO terms and pathways [8]. As an example, a protein could be involved in three or more relevant biological processes or pathways, and a bar or pie chart plot cannot provide such information.

Network analysis has become an increasingly popular tool to deal with the complexity of large datasets of all sorts. The importance of using networks lies in their ability to reveal relationships between factors, rather than seeing them as isolated entities [9]. Intersection networks are bipartite networks which, when applied to biological systems, allow detection of multifunctional proteins, i.e., genes/proteins with more than one function and involved in more than one process or pathway.

Here we present NeVOmics (Network-based Visualization for Omics), a bioinformatic tool that facilitates the functional characterization of data from OMICs technologies such as transcriptomics and proteomics. NeVOmics has been developed in programming language Python, it integrates ORA methodology and network-based visualization with R packages, allowing the generation of four different types of graphical visualization to show the enrichment results. NeVOmics applies a hypergeometric statistical test to identify significantly enriched GO terms and pathways in a list of genes or proteins. The tool supports all organisms deposited in UniProt Knowledgebase (UniProtKB) and KEGG databases, and incorporates a functionality to assign pathways to organisms with no annotated genome information available from orthologous gene pathways deposited in the KEGG database.

2. Materials and Methods

2.1. General Features

NeVOmics has been developed in programming language Python. It integrates ORA methodology to obtain significantly over-represented GO terms and pathways in a list of genes/proteins. In addition, it uses R packages to provide network-based visualization to show the enrichment results. The code is configured to use updated information from UniProt-Gene Ontology Annotation (UniProt-GOA) [10,11], UniProtKB [12], and KEGG [6] databases. NeVOmics can be used in both Linux and Windows operating systems and it provides 13 additional protein lists from diverse organisms for the user to have the optionality to test the tool.

2.2. Usage

The flowchart for data processing is depicted in Figure 1. NeVOmics documentation is available for download from GitHub (<https://github.com/bioinfproject/bioinfo/>). It includes NeVOmics Python script, instructions for use, system requirements, and some examples.

NeVOmics can perform three different enrichment analyses using updated databases (Figure S1). The first analysis (1) is Gene Ontology using all information stored in UniProt-GOA (Complete GO Annotation) and UniProtKB Annotations. The second analysis (2) uses all annotations stored in the KEGG database to find relevant pathways. Finally, the third analysis (3) is more flexible because it can identify KEGG pathways from protein sequences by performing identity searches, and thus independent of the availability or not of annotated genome information for a particular organism. After executing each of the previous analyses, the information is stored in specific directories.

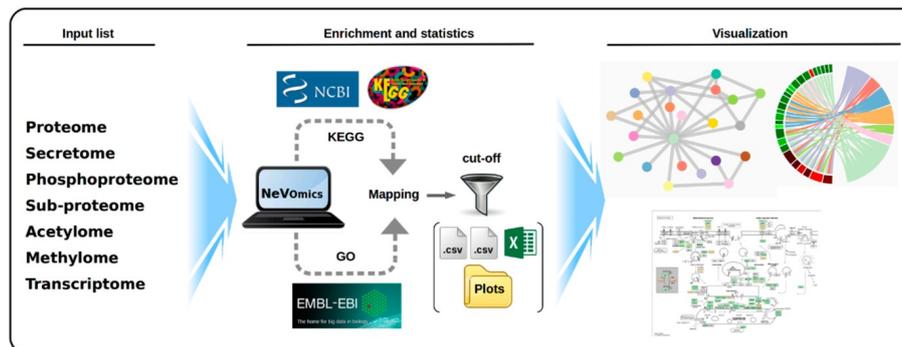


Figure 1. Schematic overview of the steps performed by NeVOmics (Network-based Visualization for Omics). The tool is composed of three main sections: input list, enrichment/statistics, and visualization. A connection is made to the UniProt-Gene Ontology Annotation (UniProt-GOA) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databases, and then the content of the input list is analyzed. The enrichment/statistics section organizes and analyzes the data from the input list, retrieves information for all genes or proteins in the list, and the results are stored in files in .xlsx format. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) logo indicates the source from which the reference proteomes are obtained by the KEGG database. The visualization section provides four types of graphical representation in .png format and high definition.

2.3. Input File

NeVOmics uses an input file in plain text containing a list of genes (KEGG gene ID) or proteins (UniProt Entry ID) obtained by any OMICS approach, such as comparative transcriptomics, proteomics, or proteome-specific methodologies (phosphoproteomics, acetylomics, etc.). The file can contain up to three columns (in Tabular format) depending on the results obtained in the “OMICS” experiment. The first column corresponds to the list of genes or proteins to be analyzed, for example a set of proteins showing abundance changes in a particular condition with respect to the control. The second column contains numerical values of expression/abundance or any other quantifiable value related to the study. The third column corresponds to a background list (e.g., all genes or proteins identified in the study) used as reference for statistics in the enrichment analysis; if the third column is absent in the input file the program automatically uses the entire proteome (UniProt-GOA) or KEGG pathways of the corresponding organism. In order to avoid ambiguities or inconsistencies in identifiers, NeVOmics allows only identifiers compatible with UniProtKB.

2.4. Annotations Sources

The Gene Ontology Annotation (GOA) database provides high quality electronic (mapping and automatic transfer of annotation to orthologous gene products) and manual (based on the literature) annotations to the UniProtKB (Swiss-Prot, TrEMBL, and PIR-PSD) using the standardized vocabulary of Gene Ontology. The GOA database contains information of nearly 60,000 species and more than 160,000 taxa, with more than 32 million annotations. NeVOmics uses the Gene Ontology of the Gene Ontology Consortium (GOC) [5], which is downloaded from: <http://purl.obolibrary.org/obo/go.obo>. It also uses the GOA association files, which are downloaded from File Transfer Protocol (FTP) in tab-delimited format (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/GO/goa/>), and GO annotation in UniProtKB, which is provided as flat files that are downloaded from: <http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>. In Swiss-Prot entries, only the manually annotated information is displayed. To view the complete GO annotation for a Swiss-Prot entry, the master copy of the data in the GOA association files is downloaded. GOA updates its annotation information weekly, while UniProtKB does it every four weeks. KEGG database covers information at different molecular levels. The KEGG Pathways

database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) is a collection of manually curated pathways, including information on molecular interactions, reactions, and network relationships. The KEGG database contains more than 24 million annotated genes and 530 pathways with more than six million pathway-linked genes.

2.5. Background

A background list of genes or proteins is essential for performing an adequate enrichment analysis and must be carefully chosen; a list with all the genes/proteins detected in any condition of the OMICs experiment is usually a valid background list. If the column of the background list (third column in the input file) is absent the program automatically uses the entire proteome in the case of UniProt-GOA or the entire KEGG database. For Gene Ontology analysis, NeVOmics builds background lists organized by category (Biological Process, Molecular Function, Cellular Component) of a specific organism for mapping the query protein list. NeVOmics downloads a GOA association file (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/GO/goa/proteomes/>) from which it extracts all GO terms. For KEGG Pathways analysis NeVOmics builds a background file with all genes of a specific organism for mapping the query gene list.

2.6. Enrichment Analysis

NeVOmics analyzes the input list against the user's preferred background and retrieves over-represented terms in the three GO categories (molecular function, biological process, cellular component) or in the KEGG pathways, with the genes/proteins classified by term or pathway. The tool adopts GeneMerge statistical algorithm to obtain the over-represented functions or categories in the input list [13]. A hypergeometric distribution test is performed to calculate the discrete probability of x (term or pathway) in a sample (gene/protein input list) of size k drawn from a background of size N (entire proteome by default or a background list provided by the user in the third column of the input file), where m corresponds to the total number of genes/proteins associated with a term or pathway (Figure S2). An FDR or modified Bonferroni correction of p -value is applied to identify the statistically more represented function annotations.

2.7. Output Files

NeVOmics generates three output files, stored in specific directories, containing lists of particular functions or KEGG pathways over-represented with statistical significance (Figure 1): (I) An edges file with two columns as 'Source' and 'Target', which contain the values of individual nodes that are linked together. (II) A nodes file with information of nodes ID, expression values, p -value and additional information for building plots. (III) Finally, an .xlsx file with enrichment analysis results for plotting in other network-based tools like Cytoscape [14] and Gephi [15]. NeVOmics automatically provides four types of graphical representations in high definition to facilitate the analysis and interpretation of results, these are: circular and random network, chord diagram [16], and UpSet plot [17]. These graphics are built with R packages as tidyverse, tidygraph, ggraph, igraph, viridis, circlize, RcolorBrewer, cowplot, networkD3, gridBase, ComplexHeatmap, and UpSetR. The graphics are configured according to the amount and type of data that resulted over-represented in the enrichment analysis.

2.8. Comparison of NeVOmics with Other Functional Enrichment Bioinformatic Tools

Gene Ontology and annotation sources for the analyses with NeVOmics were indicated in Section 2.4. GO terms from UniProt-GOA correspond to the version released on 18 October 2018. GOrilla and WebGestalt use GOC (<http://www.geneontology.org/>) for GO terms and as annotation source (<http://geneontology.org/page/go-consortium-contributors-list>); the update of 20 October 2018 was used in our analyses. g:Profiler uses also GOC for GO terms, and the annotation sources

are Ensembl v93 (<http://jul2018.archive.ensembl.org/index.html>) and Ensembl Genomes v40 (<http://ensemblgenomes.org/>).

It is recommended that NeVOmics users make reference to the date of the analysis when publicizing their results, so that other researchers have information on the version of the UniProt-GOA release used for the analysis.

3. Results

NeVOmics is an integral tool with two major features: it allows enrichment analysis from a given list with data from some 'OMICS' experiment, and it builds different graphical representations in network form from the enrichment results. To test the functionality of NeVOmics we performed two case studies, using datasets from two different experimental OMICS procedures recently published. The first dataset comes from a platelet proteome of patients with early-stage cancer [18], and the second comes from a transcriptome analysis of mutants in tail module subunits of Mediator in *Arabidopsis thaliana*, a model system for research in plant biology [19].

3.1. Case Study 1: Enrichment Analysis of Differentially Expressed Platelet Proteins in Early-Stage Cancer

Platelets play an important role in tumor angiogenesis, growth and metastasis [20]. A study from Sabrkhany et al. [18] identified 4384 unique proteins expressed in platelets, of which 85 showed a significant abundance change (criteria $F_c > 1.5$ and $p < 0.05$) in early-stage cancer as compared to the control. Samples from 12 cancer patients (eight with lung cancer and four with pancreatic cancer) and 11 controls were used in the study. We analyzed with NeVOmics an input list with 61/24 platelet proteins which were ≥ 1.5 -fold more abundant/ ≥ 1.5 -fold less abundant, respectively, in platelets from individuals with early-stage cancer as compared to platelets from healthy individuals. As background we used a list with the total 4384 platelet-expressed proteins identified in this study. We carried out an enrichment analysis for Gene Ontology (with an FDR of 0.02) and KEGG Pathways (FDR 0.1). Nineteen biological processes were identified as enriched (Figure 2A), these fall mainly within the areas of inflammatory response, immune response, and cancer, according to UniProtKB annotations. In this category, 19 proteins were identified, of which nine (P08311, P06702, P05109, P04196, O75594, P03973, P06899, Q29960, and Q95365) are involved in more than two processes: P06702 has been shown to be differentially expressed in various types of cancer such as breast, colon, liver, gastric and non-small cell lung cancer, and is crucial for promoting cancer growth by recruitment of myeloid-derived suppressor cells. P06702 and P05109 usually form a heterodimer and are involved in inflammatory response and cancer development and progression, which explains their simultaneous presence in several enriched processes. In addition, five proteins were identified which are directly related to the angiogenesis process (GO:0001525), relevant in the early stages of cancer. For its part, in the category of molecular function, six functions resulted enriched (Figure 2A). In this category, 21 proteins were identified, of which two (P06702 and P05109) are involved in more than two functions. In the analysis with the KEGG database, 11 pathways were identified as enriched, mainly related to the immune response (Figure 2B). Only 12 proteins from the input list share pathways: Q95365/3106 and Q29960/3107 are involved in seven of the enriched pathways, whereas the other 10 are involved in one or two pathways.

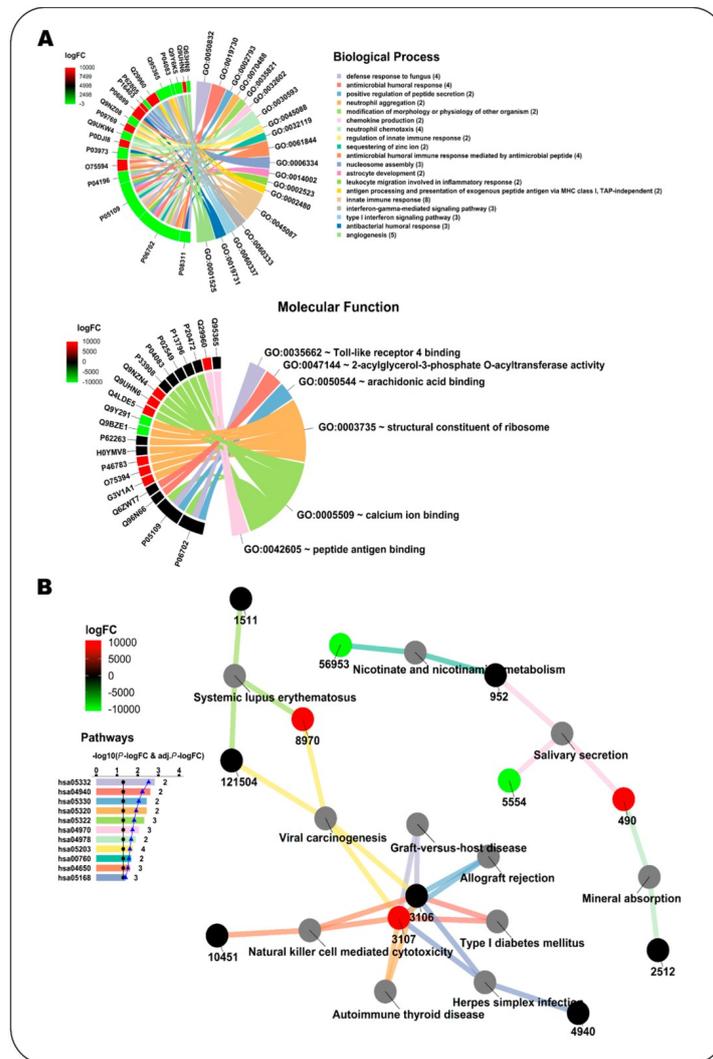


Figure 2. Enrichment analysis with NeVOmics of a dataset of platelet proteins showing significant abundance change (≥ 1.5 -fold) in early-stage cancer vs. healthy condition (study conducted by Sabrkhanly et al. [18]). (A) Chord diagram clustered by colors. Colors in the chords correspond to enriched biological processes (upper) or molecular functions (lower) (GO terms), linking each protein to the processes/functions to which it is related. Colors appearing in the sections of the outer circle beside each protein correspond to the abundance fold-change found in the study and are according to the heat map scale (logFC: log2 fold-change). (B) Network clustered by colors. Colors in the bar plot and the lines correspond to the identified enriched KEGG pathways, whereas colors in the protein identifier nodes correspond to the fold-change found in the study and are according to the heat map scale. The identifiers at the protein nodes are those provided by NCBI-GeneID. The bar plot indicates the $-\log_{10}$ of the p -value of each GO term, and the numbers at the end of the bars correspond to the total number of proteins detected for each term. The black line in the bar plot corresponds to the $-\log_{10}$ of 0.05, used as reference for p -value. The blue line on the bar plot corresponds to the $-\log_{10}$ of the adjusted p -value.

3.2. Case Study 2: Enrichment Analysis of Gene Datasets from a Transcriptomic Study of *Arabidopsis thaliana* Mutants in Mediator Subunits

The mediator complex is a central component of transcriptional regulation in *Eukaryotes*. Whitney and Clint [19] studied the role of four *Arabidopsis* Mediator tail module subunits (MED2, MED5a/b, MED16, and MED23) by analyzing the transcriptome of mutants in each of the subunit-encoding genes. We used NeVOmics to perform an enrichment analysis of GO terms and KEGG pathways in four gene datasets corresponding each to the up- and downregulated genes found in a tail subunit mutant: med2 (341 genes), med5ab (283), med16 (723), and med23 (35). The total number of expressed genes identified in the Whitney and Clint's study [19] was 18,842; we used this gene list to obtain compatible identifiers with the UniProtKB from The Arabidopsis Information Resource (TAIR) database, mapping 17,626 genes successfully. This list of 17,626 gene products was used as background in the enrichment analysis.

To compare our results with those obtained by Whitney and Clint [19], we used an FDR of 0.05 to consider a GO term enriched, the same they used when performing their enrichment test with DAVID v6.8 [21]. In total, 137 unique GO terms were enriched with NeVOmics in the four conditions, they are represented in a clustered heatmap that includes all up- or downregulated identified gene products (Figure S3 and Table S1). In Figure 3 is shown a clustered heatmap elaborated with 42 enriched GO terms that contained more than five proteins each (data also in Table S2). The raw data generated by NeVOmics are stored in several .xlsx format output files from which information can be extracted and used to make custom visualizations using other packages or programs. Whitney and Clint [19] identified only one enriched GO term (response to bacterium) in the condition of "downregulated genes in the med2 mutant", and none in the "upregulated genes", whereas with NeVOmics we were able to detect 54 GO terms in the "downregulated genes" condition and five in the "upregulated genes" one (Figure S3 and Table S1). Regarding the med5 mutant, Whitney and Clint [19] detected 16 GO terms in "downregulated genes", and five in "upregulated genes", whereas with NeVOmics we found 53 GO terms in "downregulated genes" and 12 GO terms in "upregulated genes". In all cases, all GO terms identified by Whitney and Clint [19] with DAVID v6.8 were also detected with NeVOmics. In the new GO terms identified by NeVOmics there are more processes associated with the regulation of transcription along with different response mechanisms, for example: regulation of transcription by RNA polymerase II, DNA-templated regulation of transcription, DNA-templated response to oxidative stress, response to water deprivation, response to salt stress, and response to abscisic acid (Figure S3 and Table S1). In the med16 mutant, NeVOmics detected 22 enriched GO terms in "downregulated genes" and 53 in "upregulated genes". In Figure 3, the cluster 1 contains several enriched GO terms detected mainly in the mutants med2, med5 ("downregulated genes") and med16 ("upregulated genes"). The GO terms included in cluster 1 represent processes involved in response and defense to several factors. Finally, in the med23 mutant, whose transcriptome revealed only 35 downregulated genes, NeVOmics identified several GO terms that are absent in the Whitney and Clint work (Figure S3 and Table S1). In summary, most of the terms detected by NeVOmics are related mainly to some response and defense to several factors, or related to small molecules such as auxins, gibberellins, abscisic acid, ethylene, brassinosteroids, jasmonic acid, and salicylic acid (Figure S3 and Table S1), which play a major role in seed maturation and germination, as well as in adaptation to abiotic environmental stresses [19].

Regarding the Pathway analysis, Whitney and Clint [19] identified enriched pathways in both "upregulated" and "downregulated genes" conditions from all med mutants, except in the med23 mutant. They found a total of eight enriched KEGG pathways: ath04075 (Plant hormone signal transduction) and ath00945 (Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis) were found in the condition of "downregulated genes in the med2 mutant"; ath01110 (Biosynthesis of secondary metabolites), ath00073 (Cutin, suberine and wax biosynthesis) and ath00904 (Diterpenoid biosynthesis) were found in "downregulated genes in the med16 mutant"; ath00940 (Phenylpropanoid biosynthesis) was found in "upregulated genes in the med5 mutant"; and two other pathways were found additionally, ath04626 (Plant-pathogen interaction) and ath00592 (alpha-Linolenic acid metabolism).

In our analysis, NeVOmics identified all pathways described by Whitney and Clint [19] except for ath00945, and additionally it detected three more pathways: ath00270 (Cysteine and methionine metabolism), ath00130 (Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis), and ath04016 (MAPK signaling pathway plant) (Figure 4).

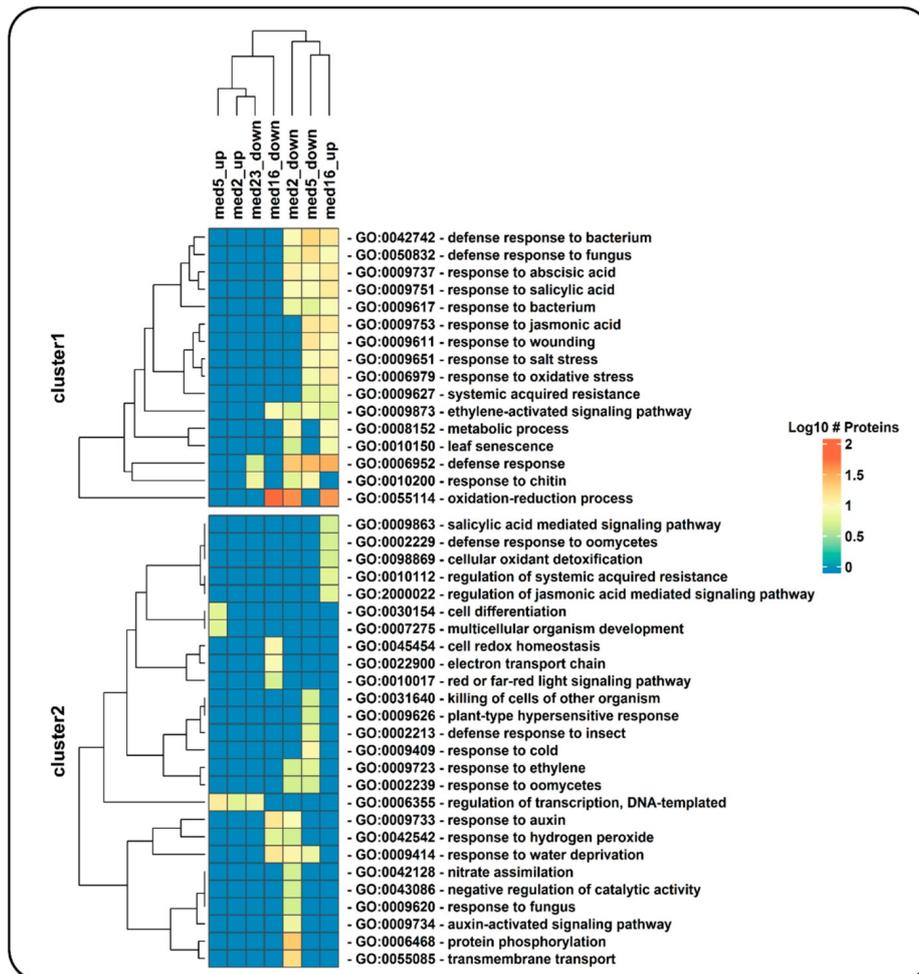


Figure 3. Hierarchical clustering of enriched GO terms in four gene datasets corresponding to up- and downregulated genes identified in a transcriptomic analysis of mutants of Mediator tail module subunits from *Arabidopsis* (study conducted by Whitney and Clint [19]). Only GO terms belonging to the category of ‘biological process’ are shown, and among them only those including more than five genes from the datasets. Each cell in the heatmap is colored according to the number of proteins (log10 of this number) detected by NeVOmics in the corresponding enriched GO term (rows) and in the specific condition (columns); “up” and “down” tags in column names correspond to “upregulated genes” and “downregulated genes”, respectively.

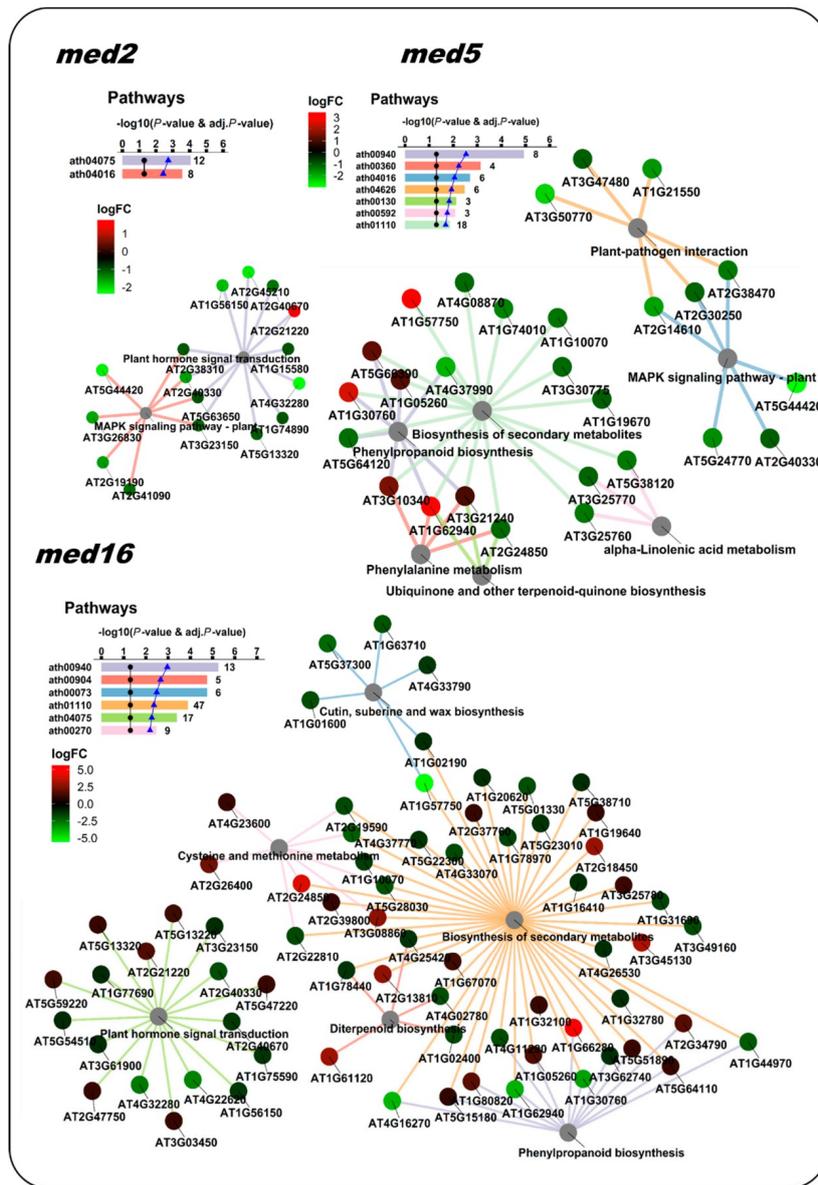


Figure 4. NeVomics enrichment analysis of KEGG pathways using the same datasets as in Figure 3. *med5* and *med16* mutants shared several enriched pathways. These networks enable the effective representation of associated data, such as the number of elements in the aggregates and intersections, and the quick identification of proteins involved in more than one process or pathway. The ratio of each gene product abundance in the corresponding mutant over the control is indicated by the node color, according to the fold-change color scale (logFC: log₂ fold-change). The bar plot indicates the $-\log_{10}$ of the *p*-value and the number of proteins found for each of the enriched pathways.

3.3. Comparison and Advantages of NeVOmics over Other Function Enrichment Analysis Tools

NeVOmics is designed to perform enrichment analysis using updated information of the two main annotation databases (GO and KEGG) automatically, making it unnecessary to have to update the information by other means. NeVOmics has the versatility to use UniProt-GOA and UniProtKB separately as databases, to obtain complete (electronic + manually-curated) and only manually-curated information, respectively, in order to get as much information as possible. There exist other available tools that can perform enrichment analysis on gene or protein datasets, however, these tools update their information on Gene Ontology less frequently and thus are less reliable for performing function enrichment analysis [22]. Some of these tools do not include more than two databases, or do not offer graphical representations to aid in the visualization of results (Table S3).

NeVOmics is also very versatile regarding the organisms that can be submitted to analysis, it supports all organisms deposited in UniProtKB (<https://www.uniprot.org/protomes/>) and KEGG (https://www.kegg.jp/kegg/catalog/org_list.html) databases, and actually any organism can be used, even those lacking annotated genome information, due to NeVOmics functionality to assign pathways searching orthologous gene pathways deposited in the KEGG database (see Materials and Methods, Section 2.2). In contrast, other tools such as g:Profiler [23], GOrilla [24], GOEAST [25], and WebGestalt [26] have the limitation of excluding non-model organisms (Table S3).

To test whether NeVOmics is able to offer different and/or more complete/accurate results in enrichment analysis when compared to other tools, we performed a comparison test between NeVOmics and some publicly available enrichment tools: g:Profiler (version beta), GOrilla (version not available), GOEAST (version 1.20), and WebGestalt (version 2019 beta). Unlike NeVOmics and WebGestalt, GOrilla, and g:Profiler present flexibility limitations in the adjustment of some parameters during the analyses, for instance they control the *p*-value threshold not allowing to set up other custom-chosen FDR values. Despite these differences, we tried to make the analyses as comparable as possible. In the comparison test we searched for enriched GO terms in the category of Biological Processes using the data of Case Study 1, with an FDR of 0.05 for NeVOmics. Although WebGestalt allows to control several parameters, when selecting an FDR of 0.05 it does not detect enriched GO terms, therefore, in order to include this tool in the analyses we used its "TOP" option for 10 GO enriched terms. As shown in Figure 5, NeVOmics attained greater coverage of identified GO terms in comparison to other tools. With NeVOmics some GO terms were detected which went undetected to other tools, and the opposite also occurred in some cases. The terms detected by NeVOmics and absent in the analyses with other the tools were: GO:0002523 (leukocyte migration involved in inflammatory response), GO:0050727 (regulation of inflammatory response), GO:0030890 (positive regulation of B cell proliferation), GO:0030307 (positive regulation of cell growth), GO:0001525 (angiogenesis), GO:0070555 (response to interleukin-1), and GO:0060333 (interferon-gamma-mediated signaling pathway), all of them related to immune response processes and cancer. On the other hand, NeVOmics, GOrilla, and WebGestalt did not detect GO terms related to response to environmental stimulus (GO:0009607, GO:0043207, and GO:0009605), which appeared highly enriched in g:Profiler. Therefore, there are differences between tools in the number and identity of detected GO terms and also in the amount of proteins that each program identifies. Three possible reasons that could determine these differences are: the source of annotation and GO definitions, the regularity with which these databases are updated, and the statistical approach to obtain enriched terms. All the other tools detected fewer proteins than NeVOmics: WebGestalt covered 41% of the total number of proteins detected by NeVOmics, g:Profiler covered 52% and GOrilla 61%, which indicates that our tool can provide more complete functional information. In addition, NeVOmics automatically generates a set of graphs to facilitate the visualization of results. NeVOmics can generate four different graphics per analysis depending on the type and amount of data, whereas some of the analyzed tools generate only simple visualizations.

4. Discussion

NeVOmics is an enrichment analysis tool executable in the command line, able to analyze from five to thousands of identifiers in gene/protein datasets. It can perform three different types of analyses (described in Section 2.2), using automatically updated information from the main annotation resources for Gene Ontology and pathways (GOA and KEGG). There is no requirement to download additional databases or any other resources.

NeVOmics uses ORA methodology and has been designed to facilitate the analysis and interpretation of large amounts of data, such as those obtained by high-throughput OMICs techniques, from a very wide range of organisms. The tool also allows the inclusion of expression/abundance data or any other experimentally-obtained quantifiable value, such as phosphorylation or other protein modifications, which provides information about how genes/proteins are up/downregulated in different biological conditions, thus allowing a better understanding of their role in the processes and pathways that are enriched.

As proof of concept, we performed different tests with datasets from distantly related organisms such as humans and *Arabidopsis thaliana*, with similarly successful results. In addition, we compared our tool to other available enrichment tools by analyzing a protein dataset from platelets of early-stage cancer patients. NeVOmics proved to be more sensitive and was able to identify a higher number of cancer-related processes (GO terms) and proteins participating in these processes than any of the other tools. Nevertheless, we encourage researchers to use more than one tool when performing Gene Ontology and pathway enrichment analysis, in order to make comparisons and verification of results and thus be able to make more accurate conclusions.

In addition to its capabilities for functional annotation by enrichment analysis, NeVOmics builds and provides different types of network-based graphical visualizations to get a better comprehension of experimental results from OMICs technologies, and to illustrate and communicate the information in an integral form. In future versions, we aim to include the Reactome (<https://reactome.org/>) and NCG (<http://ncg.kcl.ac.uk/>) databases (only for *Homo sapiens*). We will also work to include new features such as enrichment of protein domains and building of networks based on protein-protein interactions.

Supplementary Materials: The following materials are available online at: <http://www.mdpi.com/2073-4425/9/12/569/s1> and <https://github.com/bioinfproject/bioinfo/>. Figure S1: Description on how to run NeVOmics on the command line in Windows and Linux. Figure S2: Hypergeometric distribution. Figure S3: Heat map of all GO terms detected by NeVOmics generated with Table S1. Table S1: Data matrix in .csv format with 137 unique GO terms enriched by NeVOmics in Case Study 2. Table S2: Data matrix in .csv format with GO terms enriched by NeVOmics in Case Study 2, with more than five proteins each. Table S3: Comparison of NeVOmics features with other functional enrichment tools. The supplementary material also includes thirteen files (File_S1–File_S13) in .tsv format with protein lists from *Homo sapiens* and *Arabidopsis thaliana* used in Case Studies 1 and 2, respectively, to test NeVOmics.

Author Contributions: Conceptualization, E.Z.-L., U.C.-N., and F.F.; Formal analysis, E.Z.-L. and U.C.-N.; Methodology, E.Z.-L., U.C.-N., and F.F.; Resources, E.Z.-L.; Software, E.Z.-L.; Supervision, E.Z.-L., U.C.-N., and F.F.; Validation, E.Z.-L. and U.C.-N.; Visualization, E.Z.-L., U.C.-N., and F.F.; Writing—original draft, E.Z.-L., U.C.-N., and F.F.; Writing—review & editing, E.Z.-L., U.C.-N., and F.F.

Funding: This research was funded by the CONACyT through the research project CB-2013-01-222207. EZL received an individual grant from the CONACyT (scholarship no. 401684). UCN holds a postdoc grant associated to the CONACyT research project CB-2013-01-222207.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Karahalil, B. Overview of systems biology and omics technologies. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 4221–4230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Villavicencio-Diaz, T.N.; Rodriguez-Ulloa, A.; Guirola-Cruz, O.; Perez-Riverol, Y. Bioinformatics tools for the functional interpretation of quantitative proteomics results. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 435–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Tipney, H.; Hunter, L. An introduction to effective use of enrichment analysis software. *Hum. Genom.* **2010**, *4*, 202–206. [[CrossRef](#)]
4. Khatri, P.; Sirota, M.; Butte, A.J. Ten years of pathway analysis: Current approaches and outstanding challenges. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; Davis, A.P.; Dolinski, K.; Dwight, S.S.; Eppig, J.T.; et al. Gene Ontology: Tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 25–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kanehisa, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D457–D462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Schmidt, A.; Forne, I.; Imhof, A. Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Syst. Biol.* **2014**, *8*, S3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Thomas, P.D.; Campbell, M.J.; Kejariwal, A.; Mi, H.; Karlak, B.; Daverman, R.; Diemer, K.; Muruganujan, A.; Narechania, A. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2129–2141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ma, X.; Gao, L. Biological network analysis: Insights into structure and functions. *Brief. Funct. Genom.* **2012**, *11*, 434–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Huntley, R.P.; Sawford, T.; Mutowo-Meullenet, P.; Shypitsyna, A.; Bonilla, C.; Martin, M.J.; O'Donovan, C. The GOA database: Gene Ontology annotation updates for 2015. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D1057–D1063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Camon, E.; Magrane, M.; Barrell, D.; Lee, V.; Dimmer, E.; Maslen, J.; Binns, D.; Harte, N.; Lopez, R.; Apweiler, R. The Gene Ontology Annotation (GOA) Database: Sharing knowledge in Uniprot with Gene Ontology. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 262D–266D. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D158–D169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Castillo-Davis, C.I.; Hartl, D.L. GeneMerge—Post-genomic analysis, data mining, and hypothesis testing. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 891–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bastian, M.; Heymann, S.; Jacomy, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks Visualization and Exploration of Large Graphs. In Proceedings of the Third International AAAI Conference on Weblogs and Social Media, San Jose, CA, USA, 17–20 May 2009; AAAI Publications.
16. Gu, Z.; Gu, L.; Eils, R.; Schlesner, M.; Brors, B. *circlize* Implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2811–2812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Conway, J.R.; Lex, A.; Gehlenborg, N. UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2938–2940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Sabrkhany, S.; Kuijpers, M.J.E.; Knol, J.C.; Olde Damink, S.W.M.; Dingemans, A.C.; Verheul, H.M.; Piersma, S.R.; Pham, T.V.; Griffioen, A.W.; Oude Egbrink, M.G.A.; et al. Exploration of the platelet proteome in patients with early-stage cancer. *J. Proteom.* **2018**, *177*, 65–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Dolan, W.L.; Chapple, C. Transcriptome analysis of four *Arabidopsis thaliana* mediator tail mutants reveals overlapping and unique functions in gene regulation. *Genes Genomes Genet.* **2018**, *9*, 3093–3108.
20. Gay, L.J.; Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 123–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kellner, R. Proteomics. Concepts and perspectives. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 517–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Reimand, J.; Arak, T.; Adler, P.; Kolberg, L.; Reisberg, S.; Peterson, H.; Vilo, J. g:Profiler—A web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W83–W89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Eden, E.; Navon, R.; Steinfeld, I.; Lipson, D.; Yakhini, Z. GOrrilla: A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinform.* **2009**, *10*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Zheng, Q.; Wang, X.J. GOEAST: A web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W358–W363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhang, B.; Kirov, S.; Snoddy, J. WebGestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W741–W748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5 Trabajos derivados de esta tesis:

1. Eduardo Zúñiga-León, Ulises Carrasco-Navarro, Francisco Fierro. (2018). 'An integrative bioinformatic tool for gene ontology characterization and construction of functional networks from OMICs-derived data - Application to the phosphoproteomic - based study of a signal transduction pathway', 'Frontiers in Computational biology & Bioinformatics'. Suzhou, 03-07 September. China: Cold Spring Harbor Asia. [https://www.nature.com/natureevents/science/events/77595-Frontiers_in_Computational_Biology_Bioinformatics].

2. Zúñiga-León E, Carrasco-Navarro U, Fierro F. NeVOmics: An Enrichment Tool for Gene Ontology and Functional Network Analysis and Visualization of Data from OMICs Technologies. Genes. 2018; 9(12):569. [[10.3390/genes9120569](https://doi.org/10.3390/genes9120569)].

6 ANEXO 1

Tabla1. Subunidades Gal en hongos filamentosos.

Hongo filamentosos	Identificar UniProtKB (secuencia fasta)	Referencia
<i>Alternaria alternata</i>	Q2PEN1	[378]
<i>Aspergillus flavus</i>	B8N4X5	[71]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	E9QVH0	[379]
<i>Aspergillus nidulans</i>	Q00743	[63]
<i>Aspergillus niger</i>	A2QR12	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	Q2UC14	[81]
<i>Aspergillus parasiticus</i>	A0A0F0IEH7	[74]
<i>Aspergillus terreus</i>	Q0D0M5	-
<i>Beauveria bassiana</i>	J4USZ8	-
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	C5GIJ0	-
<i>Blumeria graminis</i>	A0A061HNC3	-
<i>Botrytis cinerea</i>	G2YP38	[134]
<i>Chaetomium globosum</i>	Q2H8Y3	[160]
<i>Coccidioides immitis</i>	J3K8Z9	-
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	O74227	[377]
<i>Colletotrichum graminicola</i>	B2Z3E2	[142]
<i>Colletotrichum trifolii</i>	O42784	[141]
<i>Cordyceps militaris</i>	A0A2H4SJZ4	-
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Q00580	[124]

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	A0A0D2D9V6	-
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Q96T18	[92]
<i>Fusarium graminearum</i>	I1RNF9	[95]
<i>Fusarium oxysporum</i>	A0A0C4DHV0	[88]
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Q7LK93	[67]
<i>Histoplasma capsulatum</i>	A6QTN6	-
<i>Leptosphaeria maculans</i>	E4ZYZ5	-
<i>Magnaporthe oryzae</i>	O13315	[42]
<i>Metarhizium acridum</i>	E9E5A8	[53]
<i>Metarhizium anisopliae</i>	E9ETY9	[53]
<i>Monascus ruber</i>	D8L2S9	[154]
<i>Neurospora crassa</i>	Q05425	[19]
<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	A0A2A9PHM8	-
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	C1GJ45	-
<i>Paracoccidioides lutzii</i>	C1HD34	-
<i>Penicillium camemberti</i>	A0A0G4P8P2	[117]
<i>Penicillium chrysogenum</i>	B6H598	[108]
<i>Penicillium marneffei</i>	B6QCL4	[120]
<i>Penicillium roqueforti</i>	W6PXS3	[116]
<i>Rosellinia necatrix</i>	Q9HFA2	[150]
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	A7F345	-
<i>Septoria tritici</i>	A7IT72	[152]
<i>Sordaria macrospora</i>	B3KYI8	[60]
<i>Sporothrix schenckii</i>	A0A0F2LYH8	[164]
<i>Stagonospora nodorum</i>	Q6EH42	[145]
<i>Trichoderma atroviride</i>	Q96VN7	[102]
<i>Trichoderma harzianum</i>	H6VTT1	[220]
<i>Trichoderma reseei</i>	A0A024S4M1	[99]
<i>Trichoderma virens</i>	Q875J4	[104]
<i>Trichophyton interdigitale</i>	A0A059IYL1	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	F2SZ62	-
<i>Valsa mali</i>	A0A194VKM7	[380]

7 Referencias

- [1] Poonia S, Chawla S, Kaushik S, Sengupta D. Pathway Informatics. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 2019:796–804. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20288-4
- [2] Kehrl JH. Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity*. 1998;8(1):1-10. doi:10.1016/s1074-7613(00)80453-7
- [3] Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*. 1991;252(5007):802-808. doi:10.1126/science.1902986
- [4] Sprang SR. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:639-678. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.639
- [5] Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):60-71. doi:10.1038/nrm2299
- [6] Rens-Domiano S, Hamm HE. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J*. 1995;9(11):1059-1066. doi:10.1096/fasebj.9.11.7649405
- [7] Wright SJ, Inchausti R, Eaton CJ, Krystofova S, Borkovich KA. RIC8 is a guanine-nucleotide exchange factor for Galpha subunits that regulates growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 2011;189(1):165-176. doi:10.1534/genetics.111.129270
- [8] Barren B, Artemyev NO. Mechanisms of dominant negative G-protein alpha subunits. *J Neurosci Res*. 2007;85(16):3505-3514. doi:10.1002/jnr.21414
- [9] Li L, Wright SJ, Krystofova S, Park G, Borkovich KA. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:423-452. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093432
- [10] Malbon CC. G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(9):689-701. doi:10.1038/nrm1716
- [11] Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*. 1994;265(5177):1405-1412. doi:10.1126/science.8073283
- [12] Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1(Suppl 1):S46-S55. doi:10.1038/sj.bjp.0706405
- [13] Oldham WM, Hamm HE. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys*. 2006;39(2):117-166. doi:10.1017/S0033583506004306
- [14] Bölker M. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet Biol*. 1998;25(3):143-156. doi:10.1006/fgbi.1998.1102
- [15] Liu H, Suresh A, Willard FS, Siderovski DP, Lu S, Naqvi NI. Rgs1 regulates multiple Galpha subunits in *Magnaporthe* pathogenesis, asexual growth and thigmotropism. *EMBO J*. 2007;26(3):690-700. doi:10.1038/sj.emboj.7601536
- [16] Jain S, Akiyama K, Takata R, Ohguchi T. Signaling via the G protein alpha subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243(1):165-172. doi:10.1016/j.femsle.2004.12.009

- [17] Kozak KR, Ross IK. Signal transduction in *Coprinus congregatus*: evidence for the involvement of G proteins in blue light photomorphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179(3):1225-1231. doi:10.1016/0006-291x(91)91703-f
- [18] Alvaro CG, Thorner J. Heterotrimeric G Protein-coupled Receptor Signaling in Yeast Mating Pheromone Response. *J Biol Chem*. 2016;291(15):7788-7795. doi:10.1074/jbc.R116.714980
- [19] Turner GE, Borkovich KA. Identification of a G protein alpha subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the Gi family. *J Biol Chem*. 1993;268(20):14805-14811.
- [20] Servin JA, Campbell AJ, Borkovich KA. G Protein Signaling Components in Filamentous Fungal Genomes. *Biocommunication of Fungi*. 2012:21–38. doi:10.1007/978-94-007-4264-2_2
- [21] Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012;4(165):165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404
- [22] Köhler JR, Casadevall A, Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5(1):a019273. doi:10.1101/cshperspect.a019273
- [23] Franceschetti M, Maqbool A, Jiménez-Dalmaroni MJ, Pennington HG, Kamoun S, Banfield MJ. Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid Diversity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017;81(2):e00066-16. doi:10.1128/MMBR.00066-16
- [24] Yuasa Y, Srivastava SK, Dunn CY, Rhim JS, Reddy EP, Aaronson SA. Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within c-bas/has human proto-oncogene. *Nature*. 1983;303(5920):775-779. doi:10.1038/303775a0
- [25] Cooper GM, Lane MA. Cellular transforming genes and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1984;738(1-2):9-20. doi:10.1016/0304-419x(84)90017-9
- [26] Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10):2457-2467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2612
- [27] Der CJ, Finkel T, Cooper GM. Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell*. 1986;44(1):167-176. doi:10.1016/0092-8674(86)90495-2
- [28] Katada T, Bokoch GM, Northup JK, Ui M, Gilman AG. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J Biol Chem*. 1984;259(6):3568-3577.
- [29] Katada T, Northup JK, Bokoch GM, Ui M, Gilman AG. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. *J Biol Chem*. 1984;259(6):3578-3585.
- [30] Asano T, Ui M, Ogasawara N. Prevention of the agonist binding to gamma-aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and islet-activating protein, pertussis toxin, in bovine cerebral cortex. Possible coupling of the toxin-sensitive GTP-binding proteins to receptors. *J Biol Chem*. 1985;260(23):12653-12658.
- [31] Masters SB, Miller RT, Chi MH, *et al*. Mutations in the GTP-binding site of GS alpha alter stimulation of adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1989;264(26):15467-15474.

- [32] Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 1989;340(6236):692-696. doi:10.1038/340692a0
- [33] Wong YH, Federman A, Pace AM, *et al*. Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature*. 1991;351(6321):63-65. doi:10.1038/351063a0
- [34] Graziano MP, Gilman AG. Synthesis in *Escherichia coli* of GTPase-deficient mutants of Gs alpha. *J Biol Chem*. 1989;264(26):15475-15482.
- [35] Lyons J, Landis CA, Harsh G, *et al*. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*. 1990;249(4969):655-659. doi:10.1126/science.2116665
- [36] Kleuss C, Raw AS, Lee E, Sprang SR, Gilman AG. Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):9828-9831. doi:10.1073/pnas.91.21.9828
- [37] Sondek J, Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature*. 1994;372(6503):276-279. doi:10.1038/372276a0
- [38] Berman DM, Wilkie TM, Gilman AG. GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. *Cell*. 1996;86(3):445-452. doi:10.1016/s0092-8674(00)80117-8
- [39] Truesdell GM, Jones C, Holt T, Henderson G, Dickman MB. A Ras protein from a phytopathogenic fungus causes defects in hyphal growth polarity, and induces tumors in mice. *Mol Gen Genet*. 1999;262(1):46-54. doi:10.1007/s004380051058
- [40] Yu JH, Rosén S, Adams TH. Extragenic suppressors of loss-of-function mutations in the *aspergillus* F1bA regulator of G-protein signaling domain protein. *Genetics*. 1999;151(1):97-105.
- [41] Yang Q, Borkovich KA. Mutational activation of a Galphai causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 1999;151(1):107-117.
- [42] Bosch DE, Willard FS, Ramanujam R, *et al*. A P-loop mutation in G α subunits prevents transition to the active state: implications for G-protein signaling in fungal pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002553. doi:10.1371/journal.ppat.1002553
- [43] Ghorai S, Banik SP, Verma D, Chowdhury S, Mukherjee S, Khowala S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*. 2009;42(5-6):577-587. doi:10.1016/j.foodres.2009.02.019
- [44] Alberti F, Foster GD, Bailey AM. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(2):493-500. doi:10.1007/s00253-016-8034-2
- [45] Meyer V, Andersen MR, Brakhage AA, *et al*. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol*. 2016;3:6. doi:10.1186/s40694-016-0024-8
- [46] Challa S, Uppin SG, Uppin MS, Pamidimukkala U, Vemu L. Diagnosis of filamentous fungi on tissue sections by immunohistochemistry using anti-*aspergillus* antibody. *Med Mycol*. 2015;53(5):470-476. doi:10.1093/mmy/myv004

- [47] Islam MR, Tudryn G, Bucinell R, Schadler L, Picu RC. Morphology and mechanics of fungal mycelium [published correction appears in *Sci Rep.* 2018 Mar 6;8(1):4206]. *Sci Rep.* 2017;7(1):13070. doi:10.1038/s41598-017-13295-2
- [48] Havlik D, Brandt U, Bohle K, Fleißner A. Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):128. doi:10.1186/s12934-017-0734-5
- [49] Cairns TC, Nai C, Meyer V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol.* 2018;5:13. doi:10.1186/s40694-018-0054-5
- [50] Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, *et al.* Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24 Suppl 1:e1-e38. doi:10.1016/j.cmi.2018.01.002
- [51] Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, *et al.* Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol.* 2017;10(2):296-322. doi:10.1111/1751-7915.12367
- [52] Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [published correction appears in *Mol Plant Pathol.* 2012 Sep;13(7):804]. *Mol Plant Pathol.* 2012;13(4):414-430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- [53] Gao Q, Jin K, Ying SH, *et al.* Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet.* 2011;7(1):e1001264. doi:10.1371/journal.pgen.1001264
- [54] Ivey FD, Yang Q, Borkovich KA. Positive regulation of adenylyl cyclase activity by a galphai homolog in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 1999;26(1):48-61. doi:10.1006/fgbi.1998.1101
- [55] Kays AM, Borkovich KA. Severe impairment of growth and differentiation in a *Neurospora crassa* mutant lacking all heterotrimeric G alpha proteins. *Genetics.* 2004;166(3):1229-1240. doi:10.1534/genetics.166.3.1229
- [56] Ivey FD, Kays AM, Borkovich KA. Shared and independent roles for a Galpha(i) protein and adenylyl cyclase in regulating development and stress responses in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2002;1(4):634-642. doi:10.1128/ec.1.4.634-642.2002
- [57] Krystofova S, Borkovich KA. The predicted G-protein-coupled receptor GPR-1 is required for female sexual development in the multicellular fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2006;5(9):1503-1516. doi:10.1128/EC.00124-06
- [58] Ivey FD, Hodge PN, Turner GE, Borkovich KA. The G alpha i homologue gna-1 controls multiple differentiation pathways in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell.* 1996;7(8):1283-1297. doi:10.1091/mbc.7.8.1283
- [59] Won S, Michkov AV, Krystofova S, Garud AV, Borkovich KA. Genetic and physical interactions between G α subunits and components of the G $\beta\gamma$ dimer of heterotrimeric G proteins in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2012;11(10):1239-1248. doi:10.1128/EC.00151-12
- [60] Kamerewerd J, Jansson M, Nowrousian M, Pöggeler S, Kück U. Three alpha-subunits of heterotrimeric G proteins and an adenylyl cyclase have distinct roles in fruiting body development in

- the homothallic fungus *Sordaria macrospora*. *Genetics*. 2008;180(1):191-206.
doi:10.1534/genetics.108.091603
- [61] van Dijk JW, Wang CC. Heterologous Expression of Fungal Secondary Metabolite Pathways in the *Aspergillus nidulans* Host System. *Methods Enzymol*. 2016;575:127-142.
doi:10.1016/bs.mie.2016.02.021
- [62] Golduran GH, Morris NR. *Aspergillus nidulans* as a model system for cell and molecular biology studies. *Methods in Molecular Genetics*. 1995:48–65. doi:10.1016/s1067-2389(06)80006-3
- [63] Yu JH, Wieser J, Adams TH. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J*. 1996;15(19):5184-5190.
- [64] Molnár Z, Mészáros E, Szilágyi Z, Rosén S, Emri T, Pócsi I. Influence of fadAG203R and deltaflbA mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl Biochem Biotechnol*. 2004;118(1-3):349-360. doi:10.1385/abab:118:1-3:349
- [65] Wieser J, Yu JH, Adams TH. Dominant mutations affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 1997;32(3):218-224. doi:10.1007/s002940050269
- [66] Hicks JK, Yu JH, Keller NP, Adams TH. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J*. 1997;16(16):4916-4923. doi:10.1093/emboj/16.16.4916
- [67] Tag A, Hicks J, Garifullina G, *et al*. G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol Microbiol*. 2000;38(3):658-665. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02166.x
- [68] Shimizu K, Keller NP. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2001;157(2):591-600.
- [69] Yu JH, Butchko RA, Fernandes M, Keller NP, Leonard TJ, Adams TH. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr Genet*. 1996;29(6):549-555. doi:10.1007/BF02426959
- [70] Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology (Reading)*. 2007;153(Pt 6):1677-1692.
doi:10.1099/mic.0.2007/007641-0
- [71] Liu Y, Yang K, Qin Q, *et al*. G Protein α Subunit GpaB is Required for Asexual Development, Aflatoxin Biosynthesis and Pathogenicity by Regulating cAMP Signaling in *Aspergillus flavus*. *Toxins (Basel)*. 2018;10(3):117. doi:10.3390/toxins10030117
- [72] Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(3):447-459. doi:10.1128/mmbr.66.3.447-459.2002
- [73] Gourama H, Bullerman LB. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* : Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds: A Review. *J Food Prot*. 1995;58(12):1395-1404. doi:10.4315/0362-028X-58.12.1395
- [74] Roze LV, Beaudry RM, Keller NP, Linz JE. Regulation of aflatoxin synthesis by FadA/cAMP/protein kinase A signaling in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*. 2004;158(2):219-232.
doi:10.1023/b:myco.0000041841.71648.6e

- [75] Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(2):310-350.
- [76] Igbalajobi OA, Yu JH, Shin KS. Characterization of the *rax1* gene encoding a putative regulator of G protein signaling in *Aspergillus fumigatus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;487(2):426-432. doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.079
- [77] Kim Y, Heo IB, Yu JH, Shin KS. Characteristics of a Regulator of G-Protein Signaling (RGS) *rgsC* in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2017;8:2058. doi:10.3389/fmicb.2017.02058
- [78] Kim Y, Lee MW, Jun SC, Choi YH, Yu JH, Shin KS. *RgsD* negatively controls development, toxigenesis, stress response, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep.* 2019;9(1):811. doi:10.1038/s41598-018-37124-2
- [79] Shin KS, Yu JH. Expression and Activity of Catalases Is Differentially Affected by *GpaA* (Ga) and *FibA* (Regulator of G Protein Signaling) in *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology.* 2013;41(3):145-148. doi:10.5941/MYCO.2013.41.3.145
- [80] Machida M, Yamada O, Gomi K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res.* 2008;15(4):173-183. doi:10.1093/dnares/dsn020
- [81] Ogawa M, Tokuoka M, Jin FJ, Takahashi T, Koyama Y. Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol.* 2010;47(1):10-18. doi:10.1016/j.fgb.2009.10.004
- [82] Nagaraja H, Chennappa G, Poorna Chandra Rao K, Mahadev Prasad G, Sreenivasa MY. Diversity of toxic and phytopathogenic *Fusarium* species occurring on cereals grown in Karnataka state, India. *3 Biotech.* 2016;6(1):57. doi:10.1007/s13205-016-0399-5
- [83] Oldenburg E, Höppner F, Ellner F, Weinert J. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin Res.* 2017;33(3):167-182. doi:10.1007/s12550-017-0277-y
- [84] Bryła M, Waśkiewicz A, Ksieniewicz-Woźniak E, Szymczyk K, Jędrzejczak R. Modified *Fusarium* Mycotoxins in Cereals and Their Products-Metabolism, Occurrence, and Toxicity: An Updated Review. *Molecules.* 2018;23(4):963. doi:10.3390/molecules23040963
- [85] Studt L, Tudzynski B. Gibberellins and the Red Pigments Bikaverin and Fusarubin. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites.* 2014:209–238. doi:10.1007/978-1-4939-1191-2_10
- [86] Cambaza E. Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds. *Foods.* 2018;7(10):165. doi:10.3390/foods7100165
- [87] Minervini F, Dell'Aquila ME. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci.* 2008;9(12):2570-2584. doi:10.3390/ijms9122570
- [88] Jain S, Akiyama K, Mae K, Ohguchi T, Takata R. Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet.* 2002;41(6):407-413. doi:10.1007/s00294-002-0322-y
- [89] Guo L, Yang Y, Yang L, Wang F, Wang G, Huang J. Functional analysis of the G-protein α subunits FGA1 and FGA3 in the banana pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 2016;94:75–82. doi:10.1016/j.pmpp.2016.04.003

- [90] Guo L, Han L, Yang L, *et al.* Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense causing banana vascular wilt disease [published correction appears in PLoS One. 2015;10(1):e0117621]. *PLoS One*. 2014;9(4):e95543. doi:10.1371/journal.pone.0095543
- [91] Gupta R, Chakrabarty SK. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav*. 2013;8(9):e25504. doi:10.4161/psb.25504
- [92] Studt L, Humpf HU, Tudzynski B. Signaling governed by G proteins and cAMP is crucial for growth, secondary metabolism and sexual development in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One*. 2013;8(2):e58185. doi:10.1371/journal.pone.0058185
- [93] McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 2011;3(7):802-814. doi:10.3390/toxins3070802
- [94] Brewer HC, Hammond-Kosack KE. Host to a Stranger: *Arabidopsis* and *Fusarium* Ear Blight. *Trends Plant Sci*. 2015;20(10):651-663. doi:10.1016/j.tplants.2015.06.011
- [95] Yu HY, Seo JA, Kim JE, *et al.* Functional analyses of heterotrimeric G protein G alpha and G beta subunits in *Gibberella zeae*. *Microbiology (Reading)*. 2008;154(Pt 2):392-401. doi:10.1099/mic.0.2007/012260-0
- [96] Druzhinina IS, Kubicek CP. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb Biotechnol*. 2017;10(6):1485-1499. doi:10.1111/1751-7915.12726
- [97] Omann M, Zeilinger S. How a mycoparasite employs g-protein signaling: using the example of *trichoderma*. *J Signal Transduct*. 2010;2010:123126. doi:10.1155/2010/123126
- [98] Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E, Larsen J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92(4):fiw036. doi:10.1093/femsec/fiw036
- [99] Seibel C, Gremel G, do Nascimento Silva R, Schuster A, Kubicek CP, Schmoll M. Light-dependent roles of the G-protein alpha subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Biol*. 2009;7:58. doi:10.1186/1741-7007-7-58
- [100] Tisch D, Kubicek CP, Schmoll M. New insights into the mechanism of light modulated signaling by heterotrimeric G-proteins: ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Fungal Genet Biol*. 2011;48(6):631-640. doi:10.1016/j.fgb.2010.12.009
- [101] Neves Monteiro V, Stecca Steindorff A, dos Reis Almeida FB, *et al.* *Trichoderma reesei* Mycoparasitism against *Pythium ultimum* is coordinated by G-alpha Protein GNA1 Signaling. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2015;07(01). doi:10.4172/1948-5948.1000173
- [102] Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, *et al.* The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol*. 2005;42(9):749-760. doi:10.1016/j.fgb.2005.04.009
- [103] Rocha-Ramirez V, Omero C, Chet I, Horwitz BA, Herrera-Estrella A. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell*. 2002;1(4):594-605. doi:10.1128/ec.1.4.594-605.2002

- [104] Mukherjee PK, Latha J, Hadar R, Horwitz BA. Role of two G-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(1):542-549. doi:10.1128/aem.70.1.542-549.2004
- [105] Grijseels S, Nielsen JC, Nielsen J, *et al*. Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biol Biotechnol*. 2017;4:8. doi:10.1186/s40694-017-0036-z
- [106] Hymery N, Vasseur V, Coton M, *et al*. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(4):437–456. doi:10.1111/1541-4337.12069
- [107] Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(6):1182-1198. doi:10.1074/mcp.M900327-MCP200
- [108] García-Rico RO, Martín JF, Fierro F. The pga1 gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Res Microbiol*. 2007;158(5):437-446. doi:10.1016/j.resmic.2007.03.001
- [109] García-Rico RO, Fierro F, Martín JF. Heterotrimeric Galpha protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. *Biochem Cell Biol*. 2008;86(1):57-69. doi:10.1139/o07-148
- [110] García-Rico RO, Fierro F, Mauriz E, Gómez A, Fernández-Bodega MÁ, Martín JF. The heterotrimeric Galpha protein pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology (Reading)*. 2008;154(Pt 11):3567-3578. doi:10.1099/mic.0.2008/019091-0
- [111] García-Rico RO, Martín JF, Fierro F. Heterotrimeric Gα protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genet Biol*. 2011;48(6):641-649. doi:10.1016/j.fgb.2010.11.013
- [112] Carrasco-Navarro U, Vera-Estrella R, Barkla BJ, *et al*. Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric Gα protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microb Cell Fact*. 2016;15(1):173. doi:10.1186/s12934-016-0564-x
- [113] Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2012;190(4):1157-1195. doi:10.1534/genetics.111.128033
- [114] Vallone L, Giardini A, Soncini G. Secondary Metabolites from *Penicillium roqueforti*, A Starter for the Production of Gorgonzola Cheese. *Ital J Food Saf*. 2014;3(3):2118. doi:10.4081/ijfs.2014.2118
- [115] Le Bars J. Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Appl Environ Microbiol*. 1979;38(6):1052-1055. doi:10.1128/AEM.38.6.1052-1055.1979
- [116] García-Rico RO, Chávez R, Fierro F, Martín JF. Effect of a heterotrimeric G protein alpha subunit on conidia germination, stress response, and roquefortine C production in *Penicillium roqueforti*. *Int Microbiol*. 2009;12(2):123-129.
- [117] García-Rico RO, Gil-Durán C, Rojas-Aedo JF, *et al*. Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *Fungal Biol*. 2017;121(9):754-762. doi:10.1016/j.funbio.2017.05.007

- [118] Vanittanakom N, Cooper CR Jr, Fisher MC, Sirisanthana T. *Penicillium marneffe* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):95-110. doi:10.1128/CMR.19.1.95-110.2006
- [119] Andrianopoulos A. Control of morphogenesis in the human fungal pathogen *Penicillium marneffe*. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(5-6):331-347. doi:10.1078/1438-4221-00217
- [120] Zuber S, Hynes MJ, Andrianopoulos A. G-protein signaling mediates asexual development at 25 degrees C but has no effect on yeast-like growth at 37 degrees C in the dimorphic fungus *Penicillium marneffe*. *Eukaryot Cell.* 2002;1(3):440-447. doi:10.1128/ec.1.3.440-447.2002
- [121] Zuber S, Hynes MJ, Andrianopoulos A. The G-protein alpha-subunit GasC plays a major role in germination in the dimorphic fungus *Penicillium marneffe*. *Genetics.* 2003;164(2):487-499.
- [122] Cooper CR, Vanittanakom N. Insights into the pathogenicity of *Penicillium marneffe*. *Future Microbiol.* 2008;3(1):43-55. doi:10.2217/17460913.3.1.43
- [123] Zhang H, Tang W, Liu K, *et al.* Eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [published correction appears in PLoS Pathog. 2019 Nov 15;15(11):e1008187]. *PLoS Pathog.* 2011;7(12):e1002450. doi:10.1371/journal.ppat.1002450
- [124] Liu S, Dean RA. G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 1997;10(9):1075-1086. doi:10.1094/MPMI.1997.10.9.1075
- [125] Fang EG, Dean RA. Site-directed mutagenesis of the magB gene affects growth and development in *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000;13(11):1214-1227. doi:10.1094/MPMI.2000.13.11.1214
- [126] Möller M, Stukenbrock EH. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens [published correction appears in Nat Rev Microbiol. 2017 Nov 10;15(12):771]. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(12):756-771. doi:10.1038/nrmicro.2017.76
- [127] Doehlemann G, Ökmen B, Zhu W, Sharon A. Plant Pathogenic Fungi. *Microbiol Spectr.* 2017;5(1):10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016
- [128] Mendgen K, Hahn M, Deising H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 1996;34:367-386. doi:10.1146/annurev.phyto.34.1.367
- [129] Iriart X, Fior A, Blanchet D, Berry A, Neron P, Aznar C. *Monascus ruber*: invasive gastric infection caused by dried and salted fish consumption. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3800-3802. doi:10.1128/JCM.01000-10
- [130] Hua L, Yong C, Zhanquan Z, Boqiang L, Guozheng Q, Shiping T. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety.* 2018;2(3):111–119. doi:10.1093/fqsafe/fyy016
- [131] Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. Different signalling pathways involving a Galpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol Microbiol.* 2006;59(3):821-835. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04991.x
- [132] Viaud M, Fillinger S, Liu W, *et al.* A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2006;19(9):1042-1050. doi:10.1094/MPMI-19-1042

- [133] Segmüller N, Ellendorf U, Tudzynski B, Tudzynski P. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(2):211-221. doi:10.1128/EC.00153-06
- [134] Gronover CS, Kasulke D, Tudzynski P, Tudzynski B. The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001;14(11):1293-1302. doi:10.1094/MPMI.2001.14.11.1293
- [135] Schulze Gronover C, Schorn C, Tudzynski B. Identification of *Botrytis cinerea* genes up-regulated during infection and controlled by the Galpha subunit BCG1 using suppression subtractive hybridization (SSH). *Mol Plant Microbe Interact*. 2004;17(5):537-546. doi:10.1094/MPMI.2004.17.5.537
- [136] Schumacher J, Viaud M, Simon A, Tudzynski B. The Galpha subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Microbiol*. 2008;67(5):1027-1050. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06105.x
- [137] Dalmais B, Schumacher J, Moraga J, et al. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol Plant Pathol*. 2011;12(6):564-579. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x
- [138] Pinedo C, Wang CM, Pradier JM, et al. Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chem Biol*. 2008;3(12):791-801. doi:10.1021/cb800225v
- [139] Samac DA, Allen S, Witte D, Miller D, Peterson J. First Report of Race 2 of *Colletotrichum trifolii* Causing Anthracnose on Alfalfa (*Medicago sativa*) in Wisconsin. *Plant Dis*. 2014;98(6):843. doi:10.1094/PDIS-08-13-0808-PDN
- [140] Sanz-Martín JM, Postigo V, Mateos A, et al. First Report of *Colletotrichum graminicola* Causing Maize Anthracnose Stalk Rot in the Alentejo Region, Portugal. *Plant Disease*. 2016;100(3):648–648. doi:10.1094/pdis-06-15-0636-pdn
- [141] TRUESDELL GM, YANG Z, DICKMAN MB. A Ga subunit gene from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum trifolii* is required for conidial germination. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2000;56(3):131–140. doi:10.1006/pmpp.2000.0256
- [142] Venard C, Kulshrestha S, Sweigard J, Nuckles E, Vaillancourt L. The role of a fadA ortholog in the growth and development of *Colletotrichum graminicola* in vitro and in planta. *Fungal Genet Biol*. 2008;45(6):973-983. doi:10.1016/j.fgb.2008.03.008
- [143] Solomon PS, Lowe RG, Tan KC, Waters OD, Oliver RP. *Stagonospora nodorum*: cause of *stagonospora nodorum* blotch of wheat. *Mol Plant Pathol*. 2006;7(3):147-156. doi:10.1111/j.1364-3703.2006.00326.x
- [144] Solomon PS, Tan KC, Sanchez P, Cooper RM, Oliver RP. The disruption of a Galpha subunit sheds new light on the pathogenicity of *Stagonospora nodorum* on wheat. *Mol Plant Microbe Interact*. 2004;17(5):456-466. doi:10.1094/MPMI.2004.17.5.456

- [145] Gummer JP, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS. A comparative analysis of the heterotrimeric G-protein G α , G β and G γ subunits in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *BMC Microbiol.* 2012;12:131. doi:10.1186/1471-2180-12-131
- [146] Tan KC, Heazlewood JL, Millar AH, Thomson G, Oliver RP, Solomon PS. A signaling-regulated, short-chain dehydrogenase of *Stagonospora nodorum* regulates asexual development. *Eukaryot Cell.* 2008;7(11):1916-1929. doi:10.1128/EC.00237-08
- [147] Tan KC, Heazlewood JL, Millar AH, Oliver RP, Solomon PS. Proteomic identification of extracellular proteins regulated by the Gna1 Galpha subunit in *Stagonospora nodorum*. *Mycol Res.* 2009;113(5):523-531. doi:10.1016/j.mycres.2009.01.004
- [148] Solomon PS, Rybak K, Trengove RD, Oliver RP. Investigating the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in *Stagonospora nodorum*. *Mol Microbiol.* 2006;62(2):367-381. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05380.x
- [149] Casey T, Solomon PS, Bringans S, Tan KC, Oliver RP, Lipscombe R. Quantitative proteomic analysis of G-protein signalling in *Stagonospora nodorum* using isobaric tags for relative and absolute quantification. *Proteomics.* 2010;10(1):38-47. doi:10.1002/pmic.200900474
- [150] Aimi T, Kano S, Wang Q, Morinaga T. Molecular cloning of three genes encoding G protein alpha subunits in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65(3):678-682. doi:10.1271/bbb.65.678
- [151] Duba A, Goriewa-Duba K, Wachowska U. A Review of the Interactions between Wheat and Wheat Pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp. and *Parastagonospora nodorum*. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1138. doi:10.3390/ijms19041138
- [152] Mehrabi R, Ben M'Barek S, van der Lee TA, Waalwijk C, de Wit PJ, Kema GH. G(alpha) and Gbeta proteins regulate the cyclic AMP pathway that is required for development and pathogenicity of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Eukaryot Cell.* 2009;8(7):1001-1013. doi:10.1128/EC.00258-08
- [153] Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, et al. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int J Food Microbiol.* 1995;27(2-3):201-213. doi:10.1016/0168-1605(94)00167-5
- [154] Li L, Shao Y, Li Q, Yang S, Chen F. Identification of Mga1, a G-protein alpha-subunit gene involved in regulating citrinin and pigment production in *Monascus ruber* M7. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;308(2):108-114. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01992.x
- [155] Lei M, Liu J, Fang Y, et al. Effects of Different G-Protein α -Subunits on Growth, Development and Secondary Metabolism of *Monascus ruber* M7. *Front Microbiol.* 2019;10:1555. doi:10.3389/fmicb.2019.01555
- [156] Barron MA, Sutton DA, Veve R, et al. Invasive mycotic infections caused by *Chaetomium perlucidum*, a new agent of cerebral phaeohyphomycosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5302-5307. doi:10.1128/jcm.41.11.5302-5307.2003
- [157] Li H, Xiao J, Gao YQ, Tang JJ, Zhang AL, Gao JM. Chaetoglobosins from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in Ginkgo biloba, and their phytotoxic and cytotoxic activities. *J Agric Food Chem.* 2014;62(17):3734-3741. doi:10.1021/jf500390h

- [158] Shi D, Lu G, Mei H, *et al.* Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* with yellowish black discoloration and periungual inflammation. *Med Mycol Case Rep.* 2016;13:12-16. doi:10.1016/j.mmcr.2016.09.001
- [159] Hu Y, Hao X, Chen L, *et al.* G α -cAMP/PKA pathway positively regulates pigmentation, chaetoglobosin A biosynthesis and sexual development in *Chaetomium globosum*. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195553. doi:10.1371/journal.pone.0195553
- [160] Hu Y, Liu Y, Hao X, *et al.* Regulation of the G α -cAMP/PKA signaling pathway in cellulose utilization of *Chaetomium globosum*. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):160. doi:10.1186/s12934-018-1008-6
- [161] MacKay RJ. Sporotrichosis. *Equine Infectious Diseases.* 2014:406–408.e1. doi:10.1016/b978-1-4557-0891-8.00048-8
- [162] Conceição-Silva F, Morgado FN. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. *J Fungi (Basel).* 2018;4(3):89. doi:10.3390/jof4030089
- [163] Delgado N, Rodríguez-del Valle N. Presence of a pertussis toxin-sensitive G protein alpha subunit in *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol.* 2000;38(2):109-121. doi:10.1080/mmy.38.2.109.121
- [164] Pérez-Sánchez L, González E, Colón-Lorenzo EE, González-Velázquez W, González-Méndez R, Rodríguez-del Valle N. Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay [published correction appears in BMC Microbiol. 2019 Nov 26;19(1):262]. *BMC Microbiol.* 2010;10:317. doi:10.1186/1471-2180-10-317
- [165] Steyaert JM, Weld RJ, Mendoza-Mendoza A, Stewart A. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology (Reading).* 2010;156(Pt 10):2887-2900. doi:10.1099/mic.0.041715-0
- [166] Park HS, Yu JH. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(6):669-677. doi:10.1016/j.mib.2012.09.006
- [167] Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol.* 2014;78:343-371. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.001
- [168] Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans* [published correction appears in Microbiol Mol Biol Rev 1998 Jun;62(2):545]. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(1):35-54.
- [169] Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE. brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell.* 1988;54(3):353-362. doi:10.1016/0092-8674(88)90198-5
- [170] Chang YC, Timberlake WE. Identification of *Aspergillus* brlA response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics.* 1993;133(1):29-38.
- [171] Sewall TC, Mims CW, Timberlake WE. abaA controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell.* 1990;2(8):731-739. doi:10.1105/tpc.2.8.731
- [172] Andrianopoulos A, Timberlake WE. The *Aspergillus nidulans* abaA gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol.* 1994;14(4):2503-2515. doi:10.1128/mcb.14.4.2503
- [173] Park H-S, Yu J-H. 1 Molecular Biology of Asexual Sporulation in Filamentous Fungi. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2016:3–19. doi:10.1007/978-3-319-27790-5_1

- [174] Tao L, Yu JH. AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. *Microbiology (Reading)*. 2011;157(Pt 2):313-326. doi:10.1099/mic.0.044271-0
- [175] Roskoski R. Enzyme Structure and Function. *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.05007-8
- [176] Miller CJ, Turk BE. Homing in: Mechanisms of Substrate Targeting by Protein Kinases. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(5):380-394. doi:10.1016/j.tibs.2018.02.009
- [177] Bradley D, Beltrao P. Evolution of protein kinase substrate recognition at the active site. *PLoS Biol*. 2019;17(6):e3000341. doi:10.1371/journal.pbio.3000341
- [178] Kreegipuu A, Blom N, Brunak S, Järvi J. Statistical analysis of protein kinase specificity determinants. *FEBS Lett*. 1998;430(1-2):45-50. doi:10.1016/s0014-5793(98)00503-1
- [179] Elkins JM, Knapp S. The structure of the full-length tetrameric PKA regulatory RII β complex reveals the mechanism of allosteric PKA activation. *Sci Signal*. 2012;5(224):pe21. doi:10.1126/scisignal.2003053
- [180] Fuller KK, Rhodes JC. Protein kinase A and fungal virulence: a sinister side to a conserved nutrient sensing pathway. *Virulence*. 2012;3(2):109-121. doi:10.4161/viru.19396
- [181] Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11):a011254. doi:10.1101/cshperspect.a011254
- [182] Wei H, Requena N, Fischer R. The MAPKK kinase SteC regulates conidiophore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 2003;47(6):1577-1588. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03405.x
- [183] Bayram Ö, Bayram ÖS, Ahmed YL, *et al*. The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet*. 2012;8(7):e1002816. doi:10.1371/journal.pgen.1002816
- [184] Yoshimi A, Fujioka T, Mizutani O, Marui J, Hagiwara D, Abe K. Mitogen-activated protein kinases MpkA and MpkB independently affect micafungin sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79(5):836-844. doi:10.1080/09168451.2014.998619
- [185] Kang JY, Chun J, Jun SC, Han DM, Chae KS, Jahng KY. The MpkB MAP kinase plays a role in autolysis and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 2013;61:42-49. doi:10.1016/j.fgb.2013.09.010
- [186] De Souza CP, Hashmi SB, Osmani AH, *et al*. Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS One*. 2013;8(3):e58008. doi:10.1371/journal.pone.0058008
- [187] Misra BB, Langefeld CD, Olivier M, Cox LA. Integrated Omics: Tools, Advances, and Future Approaches [published online ahead of print, 2018 Jul 13]. *J Mol Endocrinol*. 2018;JME-18-0055. doi:10.1530/JME-18-0055
- [188] Deshmukh R, Sonah H, Patil G, *et al*. Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. *Front Plant Sci*. 2014;5:244. doi:10.3389/fpls.2014.00244
- [189] Horgan RP, Kenny LC. "Omic" technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2011;13(3):189-195. doi:10.1576/toag.13.3.189.27672

- [190] Chandramouli K, Qian PY. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics*. 2009;2009:239204. doi:10.4061/2009/239204
- [191] Guo H, Isserlin R, Lugowski A, Kuzmanov U, Emili A. Large-scale label-free phosphoproteomics: from technology to data interpretation. *Bioanalysis*. 2014;6(18):2403-2420. doi:10.4155/bio.14.188
- [192] Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2017;40(2):271-280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036
- [193] Miranda FF, Thórólfsson M, Teigen K, Sanchez-Ruiz JM, Martínez A. Structural and stability effects of phosphorylation: Localized structural changes in phenylalanine hydroxylase. *Protein Sci*. 2004;13(5):1219-1226. doi:10.1110/ps.03595904
- [194] Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(6):286-290. doi:10.1016/j.tibs.2005.04.013
- [195] von Stechow L, Francavilla C, Olsen JV. Recent findings and technological advances in phosphoproteomics for cells and tissues. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(5):469-487. doi:10.1586/14789450.2015.1078730
- [196] Karpievitch YV, Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat*. 2010;4(4):1797-1823. doi:10.1214/10-AOAS341
- [197] Gaspari M, Cuda G. Nano LC-MS/MS: a robust setup for proteomic analysis. *Methods Mol Biol*. 2011;790:115-126. doi:10.1007/978-1-61779-319-6_9
- [198] Imamura H, Wakabayashi M, Ishihama Y. Analytical strategies for shotgun phosphoproteomics: status and prospects. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(8):836-842. doi:10.1016/j.semcdb.2012.05.007
- [199] Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:840518. doi:10.1155/2010/840518
- [200] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999;17(10):994-999. doi:10.1038/13690
- [201] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, *et al*. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(12):1154-1169. doi:10.1074/mcp.M400129-MCP200
- [202] Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, *et al*. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS [published correction appears in *Anal Chem*. 2003 Sep 15;75(18):4942. Johnstone, R [added]] [published correction appears in *Anal Chem*. 2006 Jun 15;78(12):4235. Mohammed, A Karim A [added]]. *Anal Chem*. 2003;75(8):1895-1904. doi:10.1021/ac0262560
- [203] Ishihama Y. Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005;1067(1-2):73-83. doi:10.1016/j.chroma.2004.10.107

- [204] Diniz WJ, Canduri F. REVIEW-ARTICLE Bioinformatics: an overview and its applications. *Genet Mol Res.* 2017;16(1):10.4238/gmr16019645. doi:10.4238/gmr16019645
- [205] Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf Med.* 2001;40(4):346-358.
- [206] Domon B, Aebersold R. Challenges and opportunities in proteomics data analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(10):1921-1926. doi:10.1074/mcp.R600012-MCP200
- [207] van den Berg MA, Albang R, Albermann K, *et al.* Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1161-1168. doi:10.1038/nbt.1498
- [208] 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(4):277-282. doi:10.1007/bf00435290
- [209] Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(15):7583-7600. doi:10.1093/nar/16.15.7583
- [210] Alting-Mees MA, Short JM. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(22):9494. doi:10.1093/nar/17.22.9494
- [211] Zhou C, Yang Y, Jong AY. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques.* 1990;8(2):172-173.
- [212] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990;96(1):23-28. doi:10.1016/0378-1119(90)90336-p
- [213] Hengen PN. Methods and reagents. preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci.* 1996;21(2):75-76.
- [214] Kapoor N, Menon ST, Chauhan R, Sachdev P, Sakmar TP. Structural evidence for a sequential release mechanism for activation of heterotrimeric G proteins. *J Mol Biol.* 2009;393(4):882-897. doi:10.1016/j.jmb.2009.08.043
- [215] Degani O. Construction of a Constitutively Activated Gα Mutant in the Maize Pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *American Journal of Plant Sciences.* 2013;04(12):2394-2399. doi:10.4236/ajps.2013.412296
- [216] Li J, Hong N, Peng B, Wu H, Gu Q. Transformation of *Corynespora cassicola* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Fungal Biol.* 2019;123(9):669-675. doi:10.1016/j.funbio.2019.05.011
- [217] Moore MM, Breedveld MW, Autor AP. The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. *Arch Biochem Biophys.* 1989;270(2):419-431. doi:10.1016/0003-9861(89)90524-9
- [218] Krasniewski I, Molimard P, Feron G, *et al.* Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti*. *Process Biochemistry.* 2006;41(6):1318-1324. doi:10.1016/j.procbio.2006.01.005
- [219] Roncal T, Ugalde U. Conidiation induction in *Penicillium*. *Res Microbiol.* 2003;154(8):539-546. doi:10.1016/S0923-2508(03)00168-2

- [220] Sun Q, Jiang X, Pang L, Wang L, Li M. Functions of thga1 Gene in *Trichoderma harzianum* Based on Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8329513. doi:10.1155/2016/8329513
- [221] Segers GC, Nuss DL. Constitutively activated Galpha negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol*. 2003;38(2):198-208. doi:10.1016/s1087-1845(02)00534-0
- [222] Yu JH. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*. 2010;38(4):229-237. doi:10.4489/MYCO.2010.38.4.229
- [223] Thevelein JM, de Winde JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 1999;33(5):904-918. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01538.x
- [224] Fillinger S, Chaverocche MK, Shimizu K, Keller N, d'Enfert C. cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 2002;44(4):1001-1016. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02933.x
- [225] Deka R, Ghosh A, Tamuli R, Borkovich KA. 7 Heterotrimeric G Proteins. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2016:119–144. doi:10.1007/978-3-319-27790-5_7
- [226] Xiong Y, Coradetti ST, Li X, *et al*. The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation. *Fungal Genet Biol*. 2014;72:21-33. doi:10.1016/j.fgb.2014.05.005
- [227] Horta MAC, Thieme N, Gao Y, *et al*. Broad Substrate-Specific Phosphorylation Events Are Associated With the Initial Stage of Plant Cell Wall Recognition in *Neurospora crassa*. *Front Microbiol*. 2019;10:2317. doi:10.3389/fmicb.2019.02317
- [228] Yang F, Melo-Braga MN, Larsen MR, Jørgensen HJ, Palmisano G. Battle through signaling between wheat and the fungal pathogen *Septoria tritici* revealed by proteomics and phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(9):2497-2508. doi:10.1074/mcp.M113.027532
- [229] Franck WL, Gokce E, Randall SM, *et al*. Phosphoproteome Analysis Links Protein Phosphorylation to Cellular Remodeling and Metabolic Adaptation during *Magnaporthe oryzae* Appressorium Development. *J Proteome Res*. 2015;14(6):2408-2424. doi:10.1021/pr501064q
- [230] Wang RJ, Peng J, Li QX, Peng YL. Phosphorylation-mediated Regulatory Networks in Mycelia of *Pyricularia oryzae* Revealed by Phosphoproteomic Analyses. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(9):1669-1682. doi:10.1074/mcp.M116.066670
- [231] Oh Y, Franck WL, Dean RA. Sequential Phosphopeptide Enrichment for Phosphoproteome Analysis of Filamentous Fungi: A Test Case Using *Magnaporthe oryzae*. *Methods Mol Biol*. 2018;1848:81-91. doi:10.1007/978-1-4939-8724-5_7
- [232] Ramsubramaniam N, Harris SD, Marten MR. The phosphoproteome of *Aspergillus nidulans* reveals functional association with cellular processes involved in morphology and secretion. *Proteomics*. 2014;14(21-22):2454-2459. doi:10.1002/pmic.201400063
- [233] Ribeiro LFC, Chelius C, Boppidi KR, *et al*. Comprehensive Analysis of *Aspergillus nidulans* PKA Phosphorylome Identifies a Novel Mode of CreA Regulation. *mBio*. 2019;10(2):e02825-18. doi:10.1128/mBio.02825-18

- [234] Chelius C, Huso W, Reese S, *et al.* Dynamic Transcriptomic and Phosphoproteomic Analysis During Cell Wall Stress in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19(8):1310-1329. doi:10.1074/mcp.RA119.001769
- [235] Ren S, Yang M, Li Y, *et al.* Global Phosphoproteomic Analysis Reveals the Involvement of Phosphorylation in Aflatoxins Biosynthesis in the Pathogenic Fungus *Aspergillus flavus*. *Sci Rep*. 2016;6:34078. doi:10.1038/srep34078
- [236] Mattos EC, Silva LP, Valero C, *et al.* The *Aspergillus fumigatus* Phosphoproteome Reveals Roles of High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinases in Promoting Cell Wall Damage and Caspofungin Tolerance. *mBio*. 2020;11(1):e02962-19. doi:10.1128/mBio.02962-19
- [237] Mattos EC, Palmisano G, Goldman GH. Phosphoproteomics of *Aspergillus fumigatus* Exposed to the Antifungal Drug Caspofungin. *mSphere*. 2020;5(3):e00365-20. doi:10.1128/mSphere.00365-20
- [238] Davanture M, Dumur J, Bataillé-Simoneau N, *et al.* Phosphoproteome profiles of the phytopathogenic fungi *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea* during exponential growth in axenic cultures. *Proteomics*. 2014;14(13-14):1639-1645. doi:10.1002/pmic.201300541
- [239] Liñeiro E, Chiva C, Cantoral JM, Sabido E, Fernández-Acero FJ. Phosphoproteome analysis of *B. cinerea* in response to different plant-based elicitors. *J Proteomics*. 2016;139:84-94. doi:10.1016/j.jprot.2016.03.019
- [240] Escobar-Niño A, Liñeiro E, Amil F, *et al.* Proteomic study of the membrane components of signalling cascades of *Botrytis cinerea* controlled by phosphorylation. *Sci Rep*. 2019;9(1):9860. doi:10.1038/s41598-019-46270-0
- [241] Rampitsch C, Subramaniam R, Djuric-Ciganovic S, Bykova NV. The phosphoproteome of *Fusarium graminearum* at the onset of nitrogen starvation. *Proteomics*. 2010;10(1):124-140. doi:10.1002/pmic.200800399
- [242] Rampitsch C, Tinker NA, Subramaniam R, Barkow-Oesterreicher S, Laczko E. Phosphoproteome profile of *Fusarium graminearum* grown in vitro under nonlimiting conditions. *Proteomics*. 2012;12(7):1002-1005. doi:10.1002/pmic.201100065
- [243] Chaves AF, Castilho DG, Navarro MV, *et al.* Phosphosite-specific regulation of the oxidative-stress response of *Paracoccidioides brasiliensis*: a shotgun phosphoproteomic analysis. *Microbes Infect*. 2017;19(1):34-46. doi:10.1016/j.micinf.2016.08.004
- [244] Wang ZK, Wang J, Liu J, Ying SH, Peng XJ, Feng MG. Proteomic and Phosphoproteomic Insights into a Signaling Hub Role for Cdc14 in Asexual Development and Multiple Stress Responses in *Beauveria bassiana*. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153007. doi:10.1371/journal.pone.0153007
- [245] Nguyen EV, Imanishi SY, Haapaniemi P, *et al.* Quantitative Site-Specific Phosphoproteomics of *Trichoderma reesei* Signaling Pathways upon Induction of Hydrolytic Enzyme Production. *J Proteome Res*. 2016;15(2):457-467. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00796
- [246] Märker R, Blank-Landeshammer B, Beier-Rosberger A, Sickmann A, Kück U. iTRAQ-based proteomic and phosphoproteomic analyses of STRIPAK mutants from the fungus *Sordaria macrospora* identifies a conserved serine phosphorylation site in PAK kinase CLA4 to be important for sexual development and polarized growth. *BioRxiv*, 2019. doi:10.1101/828111

- [247] Märker R, Blank-Landeshammer B, Beier-Rosberger A, Sickmann A, Kück U. Phosphoproteomic analysis of STRIPAK mutants identifies a conserved serine phosphorylation site in PAK kinase CLA4 to be important in fungal sexual development and polarized growth. *Mol Microbiol.* 2020;113(6):1053-1069. doi:10.1111/mmi.14475
- [248] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- [249] Keller A, Eng J, Zhang N, Li XJ, Aebersold R. A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Mol Syst Biol.* 2005;1:2005.0017. doi:10.1038/msb4100024
- [250] Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem.* 2002;74(20):5383-5392. doi:10.1021/ac025747h
- [251] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003;75(17):4646-4658. doi:10.1021/ac0341261
- [252] Ekmekci B, McAnany CE, Mura C. An Introduction to Programming for Bioscientists: A Python-Based Primer. *PLoS Comput Biol.* 2016;12(6):e1004867. doi:10.1371/journal.pcbi.1004867
- [253] Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics.* 2008;24(21):2534-2536. doi:10.1093/bioinformatics/btn323
- [254] Eng JK, Hoopmann MR, Jahan TA, Egertson JD, Noble WS, MacCoss MJ. A deeper look into Comet--implementation and features. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2015;26(11):1865-1874. doi:10.1007/s13361-015-1179-x
- [255] Yang MK, Qiao ZX, Zhang WY, et al. Global phosphoproteomic analysis reveals diverse functions of serine/threonine/tyrosine phosphorylation in the model *Cyanobacterium Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J Proteome Res.* 2013;12(4):1909-1923. doi:10.1021/pr4000043
- [256] Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4(3):242-250.
- [257] Shteynberg D, Nesvizhskii AI, Moritz RL, Deutsch EW. Combining results of multiple search engines in proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(9):2383-2393. doi:10.1074/mcp.R113.027797
- [258] Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics.* 2013;13(1):22-24. doi:10.1002/pmic.201200439
- [259] Yang B, Ying W, Gong Y, et al. Using cross-correlation normalized for peptide length to optimize peptide identification in shotgun proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(20):2983-2985. doi:10.1002/rcm.2137
- [260] Wu XN, Xi L, Pertl-Obermeyer H, Li Z, Chu LC, Schulze WX. Highly Efficient Single-Step Enrichment of Low Abundance Phosphopeptides from Plant Membrane Preparations. *Front Plant Sci.* 2017;8:1673. doi:10.3389/fpls.2017.01673
- [261] Swaney DL, Wenger CD, Coon JJ. Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res.* 2010;9(3):1323-1329. doi:10.1021/pr900863u

- [262] Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods*. 2007;4(3):207-214. doi:10.1038/nmeth1019
- [263] Perez-Riverol Y, Audain E, Millan A, *et al*. Isoelectric point optimization using peptide descriptors and support vector machines. *J Proteomics*. 2012;75(7):2269-2274. doi:10.1016/j.jprot.2012.01.029
- [264] Xu CF, Wang H, Li D, Kong XP, Neubert TA. Selective enrichment and fractionation of phosphopeptides from peptide mixtures by isoelectric focusing after methyl esterification. *Anal Chem*. 2007;79(5):2007-2014. doi:10.1021/ac061606u
- [265] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 1982;157(1):105-132. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0
- [266] Wimley WC, White SH. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol*. 1996;3(10):842-848. doi:10.1038/nsb1096-842
- [267] Sereda TJ, Mant CT, Sönnichsen FD, Hodges RS. Reversed-phase chromatography of synthetic amphipathic alpha-helical peptides as a model for ligand/receptor interactions. Effect of changing hydrophobic environment on the relative hydrophilicity/hydrophobicity of amino acid side-chains. *J Chromatogr A*. 1994;676(1):139-153. doi:10.1016/0021-9673(94)00371-8
- [268] Lex A, Gehlenborg N, Strobel H, Vuillemot R, Pfister H. UpSet: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Trans Vis Comput Graph*. 2014;20(12):1983-1992. doi:10.1109/TVCG.2014.2346248
- [269] Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, *et al*. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006;127(3):635-648. doi:10.1016/j.cell.2006.09.026
- [270] Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet*. 2014;5:270. doi:10.3389/fgene.2014.00270
- [271] Trushina NI, Bakota L, Mulikidjanian AY, Brandt R. The Evolution of Tau Phosphorylation and Interactions. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:256. doi:10.3389/fnagi.2019.00256
- [272] Amanchy R, Periaswamy B, Mathivanan S, Reddy R, Tattikota SG, Pandey A. A curated compendium of phosphorylation motifs. *Nat Biotechnol*. 2007;25(3):285-286. doi:10.1038/nbt0307-285
- [273] Douglass J, Gunaratne R, Bradford D, *et al*. Identifying protein kinase target preferences using mass spectrometry. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(7):C715-C727. doi:10.1152/ajpcell.00166.2012
- [274] Treeck M, Sanders JL, Elias JE, Boothroyd JC. The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell Host Microbe*. 2011;10(4):410-419. doi:10.1016/j.chom.2011.09.004
- [275] Schwartz D, Gygi SP. An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets. *Nat Biotechnol*. 2005;23(11):1391-1398. doi:10.1038/nbt1146
- [276] Isobe K, Jung HJ, Yang CR, *et al*. Systems-level identification of PKA-dependent signaling in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(42):E8875-E8884. doi:10.1073/pnas.1709123114
- [277] El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, *et al*. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D427-D432. doi:10.1093/nar/gky995
- [278] Zúñiga-León E, Carrasco-Navarro U, Fierro F. NeVOmics: An Enrichment Tool for Gene Ontology and Functional Network Analysis and Visualization of Data from OMICs Technologies. *Genes (Basel)*. 2018;9(12):569. doi:10.3390/genes9120569

- [279] Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 1988;241(4861):42-52. doi:10.1126/science.3291115
- [280] Bayram O, Braus GH. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(1):1-24. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x
- [281] Arnaud MB, Cerqueira GC, Inglis DO, *et al*. The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D653-D659. doi:10.1093/nar/gkr875
- [282] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D493-D496. doi:10.1093/nar/gkx922
- [283] Stauber R, Bier C. Computational Protein-Protein Interactions. Edited by Ruth Nussinov and Gideon Schreiber. *ChemBioChem*. 2011;12(4):648–648. doi:10.1002/cbic.201100081
- [284] Wang Z, Zhao C, Wang Y, Sun Z, Wang N. PANDA: Protein function prediction using domain architecture and affinity propagation. *Sci Rep*. 2018;8(1):3484. doi:10.1038/s41598-018-21849-1
- [285] Horton P, Park KJ, Obayashi T, *et al*. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W585-W587. doi:10.1093/nar/gkm259
- [286] Hagiwara D, Sakamoto K, Abe K, Gomi K. Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016;80(9):1667-1680. doi:10.1080/09168451.2016.1162085
- [287] Wu R, Dephoure N, Haas W, *et al*. Correct interpretation of comprehensive phosphorylation dynamics requires normalization by protein expression changes. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(8):M111.009654. doi:10.1074/mcp.M111.009654
- [288] Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, *et al*. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*. 2010;143(7):1174-1189. doi:10.1016/j.cell.2010.12.001
- [289] Valiante V, Macheleidt J, Föge M, Brakhage AA. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol*. 2015;6:325. doi:10.3389/fmicb.2015.00325
- [290] Rocha MC, Fabri JH, Franco de Godoy K, *et al*. *Aspergillus fumigatus* MADS-Box Transcription Factor rlmA Is Required for Regulation of the Cell Wall Integrity and Virulence. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(9):2983-3002. doi:10.1534/g3.116.031112
- [291] Levin DE. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69(2):262-291. doi:10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005
- [292] Jackson-Hayes L, Hill TW, Loprete DM, *et al*. Two amino acid sequences direct *Aspergillus nidulans* protein kinase C (PkcA) localization to hyphal apices and septation sites. *Mycologia*. 2015;107(3):452-459. doi:10.3852/14-217
- [293] Franchi L, Fulci V, Macino G. Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Mol Microbiol*. 2005;56(2):334-345. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04545.x

- [294] Oeser B. PKC1, encoding a protein kinase C, and FAT1, encoding a fatty acid transporter protein, are neighbors in *Cochliobolus heterostrophus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;165(2):273-280. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13157.x
- [295] Herrmann M, Spröte P, Brakhage AA. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2957-2970. doi:10.1128/AEM.72.4.2957-2970.2006
- [296] Nomura W, Inoue Y. Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2015;35(7):1269-1280. doi:10.1128/MCB.01118-14
- [297] Samantaray S, Neubauer M, Helmschrott C, Wagener J. Role of the guanine nucleotide exchange factor Rom2 in cell wall integrity maintenance of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2013;12(2):288-298. doi:10.1128/EC.00246-12
- [298] Beauvais A, Maubon D, Park S, *et al.* Two alpha(1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(3):1531-1538. doi:10.1128/AEM.71.3.1531-1538.2005
- [299] Heinisch JJ, Rodicio R. Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(1):10.1093/femsre/fux051. doi:10.1093/femsre/fux051
- [300] Dichtl K, Helmschrott C, Dirr F, Wagener J. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Mol Microbiol.* 2012;83(3):506-519. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07946.x
- [301] van Drogen F, Peter M. Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol.* 2002;12(19):1698-1703. doi:10.1016/s0960-9822(02)01186-7
- [302] Damveld RA, Arentshorst M, Franken A, *et al.* The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. *Mol Microbiol.* 2005;58(1):305-319. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04827.x
- [303] Rocha MC, Fabri JHTM, Simões IT, *et al.* The Cell Wall Integrity Pathway Contributes to the Early Stages of *Aspergillus fumigatus* Asexual Development. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(7):e02347-19. doi:10.1128/AEM.02347-19
- [304] Yoshimi A, Sano M, Inaba A, *et al.* Functional analysis of the α -1,3-glucan synthase genes agsA and agsB in *Aspergillus nidulans*: agsB is the major α -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One.* 2013;8(1):e54893. doi:10.1371/journal.pone.0054893
- [305] Valiante V, Baldin C, Hortschansky P, *et al.* The *Aspergillus fumigatus* conidial melanin production is regulated by the bifunctional bHLH DevR and MADS-box RlmA transcription factors. *Mol Microbiol.* 2016;102(2):321-335. doi:10.1111/mmi.13462
- [306] Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol.* 2006;59(5):1380-1394. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05030.x

- [307] Fukuda K, Yamada K, Deoka K, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot Cell*. 2009;8(7):945-956. doi:10.1128/EC.00326-08
- [308] Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H. csmA, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain of *Aspergillus nidulans*, is translated as a single polypeptide and regulated in response to osmotic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298(1):103-109. doi:10.1016/s0006-291x(02)02418-x
- [309] Kraus PR, Harris SD. The *Aspergillus nidulans* snt genes are required for the regulation of septum formation and cell cycle checkpoints. *Genetics*. 2001;159(2):557-569.
- [310] McGuire SL, Roe DL, Carter BW, *et al*. Extragenic suppressors of the nimX2(cdc2) mutation of *Aspergillus nidulans* affect nuclear division, septation and conidiation. *Genetics*. 2000;156(4):1573-1584.
- [311] Park G, Servin JA, Turner GE, *et al*. Global analysis of serine-threonine protein kinase genes in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 2011;10(11):1553-1564. doi:10.1128/EC.05140-11
- [312] Kim JM, Lu L, Shao R, Chin J, Liu B. Isolation of mutations that bypass the requirement of the septation initiation network for septum formation and conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2006;173(2):685-696. doi:10.1534/genetics.105.054304
- [313] Kim JM, Zeng CJ, Nayak T, *et al*. Timely septation requires SNAD-dependent spindle pole body localization of the septation initiation network components in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*. 2009;20(12):2874-2884. doi:10.1091/mbc.e08-12-1177
- [314] Momany M, Zhao J, Lindsey R, Westfall PJ. Characterization of the *Aspergillus nidulans* septin (asp) gene family. *Genetics*. 2001;157(3):969-977.
- [315] Hernández-Rodríguez Y, Hastings S, Momany M. The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell*. 2012;11(3):311-323. doi:10.1128/EC.05164-11
- [316] Furukawa K, Hoshi Y, Maeda T, Nakajima T, Abe K. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol*. 2005;56(5):1246-1261. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04605.x
- [317] Yu Z, Armant O, Fischer R. Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nat Microbiol*. 2016;1:16019. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.19
- [318] Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K. Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet Biol*. 2009;46(11):868-878. doi:10.1016/j.fgb.2009.07.003
- [319] Duran R, Cary JW, Calvo AM. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins (Basel)*. 2010;2(4):367-381. doi:10.3390/toxins2040367
- [320] Bahn YS. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell*. 2008;7(12):2017-2036. doi:10.1128/EC.00323-08

- [321] Brewster JL, Gustin MC. Hog1: 20 years of discovery and impact. *Sci Signal*. 2014;7(343):re7. doi:10.1126/scisignal.2005458
- [322] Tanaka K, Tatebayashi K, Nishimura A, Yamamoto K, Yang HY, Saito H. Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Sci Signal*. 2014;7(314):ra21. doi:10.1126/scisignal.2004780
- [323] Leeder AC, Turner G. Characterisation of *Aspergillus nidulans* polarisome component BemA. *Fungal Genet Biol*. 2008;45(6):897-911. doi:10.1016/j.fgb.2007.12.001
- [324] Garrido-Bazán V, Jaimes-Arroyo R, Sánchez O, Lara-Rojas F, Aguirre J. SakA and MpkC Stress MAPKs Show Opposite and Common Functions During Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol*. 2018;9:2518. doi:10.3389/fmicb.2018.02518
- [325] Hong SY, Roze LV, Linz JE. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins (Basel)*. 2013;5(4):683-702. doi:10.3390/toxins5040683
- [326] Vargas-Pérez I, Sánchez O, Kawasaki L, Georgellis D, Aguirre J. Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(9):1570-1583. doi:10.1128/EC.00085-07
- [327] 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*. *Front Microbiol*. 2017;8:516. doi:10.3389/fmicb.2017.00516
- [328] Hagiwara D, Asano Y, Yamashino T, Mizuno T. Characterization of bZip-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72(10):2756-2760. doi:10.1271/bbb.80001
- [329] Lara-Rojas F, Sánchez O, Kawasaki L, Aguirre J. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol Microbiol*. 2011;80(2):436-454. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x
- [330] Dohlman HG, Slessareva JE. Pheromone signaling pathways in yeast. *Sci STKE*. 2006;2006(364):cm6. doi:10.1126/stke.3642006cm6
- [331] Hao N, Nayak S, Behar M, *et al*. Regulation of cell signaling dynamics by the protein kinase-scaffold Ste5. *Mol Cell*. 2008;30(5):649-656. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.016
- [332] Saito H. Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(6):677-683. doi:10.1016/j.mib.2010.09.001
- [333] Wu C, Jansen G, Zhang J, Thomas DY, Whiteway M. Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev*. 2006;20(6):734-746. doi:10.1101/gad.1375706
- [334] Blackwell E, Kim HJ, Stone DE. The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *BMC Cell Biol*. 2007;8:44. doi:10.1186/1471-2121-8-44
- [335] Pandey A, Roca MG, Read ND, Glass NL. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 2004;3(2):348-358. doi:10.1128/ec.3.2.348-358.2004

- [336] Jonkers W, Leeder AC, Ansong C, *et al.* HAM-5 functions as a MAP kinase scaffold during cell fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet.* 2014;10(11):e1004783. doi:10.1371/journal.pgen.1004783
- [337] Frawley D, Karahoda B, Sarikaya Bayram Ö, Bayram Ö. The HamE scaffold positively regulates MpkB phosphorylation to promote development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Sci Rep.* 2018;8(1):16588. doi:10.1038/s41598-018-34895-6
- [338] Sarikaya Bayram O, Bayram O, Valerius O, *et al.* LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet.* 2010;6(12):e1001226. doi:10.1371/journal.pgen.1001226
- [339] Thieme KG, Gerke J, Sasse C, *et al.* Velvet domain protein VosA represses the zinc cluster transcription factor SclB regulatory network for *Aspergillus nidulans* asexual development, oxidative stress response and secondary metabolism [published correction appears in *PLoS Genet.* 2018 Aug 29;14(8):e1007638]. *PLoS Genet.* 2018;14(7):e1007511. doi:10.1371/journal.pgen.1007511
- [340] Park HS, Ni M, Jeong KC, Kim YH, Yu JH. The role, interaction and regulation of the velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One.* 2012;7(9):e45935. doi:10.1371/journal.pone.0045935
- [341] Schumacher J, Gautier A, Morgant G, *et al.* A functional bikaverin biosynthesis gene cluster in rare strains of *Botrytis cinerea* is positively controlled by VELVET. *PLoS One.* 2013;8(1):e53729. doi:10.1371/journal.pone.0053729
- [342] Krijgsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, *et al.* Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2013;74(1):1-29. doi:10.3114/sim0006
- [343] Park HS, Lee MK, Kim SC, Yu JH. The role of VosA/VelB-activated developmental gene vadA in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177099. doi:10.1371/journal.pone.0177099
- [344] Ni M, Yu JH. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One.* 2007;2(10):e970. doi:10.1371/journal.pone.0000970
- [345] Lee MK, Kwon NJ, Lee IS, Jung S, Kim SC, Yu JH. Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci Rep.* 2016;6:28874. doi:10.1038/srep28874
- [346] Cary JW, Harris-Coward PY, Ehrlich KC, *et al.* NsdC and NsdD affect *Aspergillus flavus* morphogenesis and aflatoxin production. *Eukaryot Cell.* 2012;11(9):1104-1111. doi:10.1128/EC.00069-12
- [347] Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E, Ugalde U, Espeso EA. The concerted action of bZip and cMyb transcription factors F1bB and F1bD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 2010;75(5):1314-1324. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07063.x
- [348] Seo JA, Guan Y, Yu JH. FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics.* 2006;172(3):1535-1544. doi:10.1534/genetics.105.052258
- [349] Kim YJ, Yu YM, Maeng PJ. Differential Control of Asexual Development and Sterigmatocystin Biosynthesis by a Novel Regulator in *Aspergillus nidulans* [published correction appears in *Sci Rep.* 2017 May 26;7:46817. Yeong Man, Yu [corrected to Yu, Yeong Man]]. *Sci Rep.* 2017;7:46340. doi:10.1038/srep46340

- [350] Seo JA, Han KH, Yu JH. Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2005;171(1):81-89. doi:10.1534/genetics.105.042796
- [351] Ni M, Rierson S, Seo JA, Yu JH. The pkaB gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with pkaA and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*. 2005;4(8):1465-1476. doi:10.1128/EC.4.8.1465-1476.2005
- [352] Yu JH, Mah JH, Seo JA. Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryot Cell*. 2006;5(10):1577-1584. doi:10.1128/EC.00193-06
- [353] Trojer P, Dangl M, Bauer I, Graessle S, Loidl P, Brosch G. Histone methyltransferases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a novel enzyme with a unique substrate specificity. *Biochemistry*. 2004;43(33):10834-10843. doi:10.1021/bi049626i
- [354] Satterlee T, Cary JW, Calvo AM. RmtA, a Putative Arginine Methyltransferase, Regulates Secondary Metabolism and Development in *Aspergillus flavus*. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155575. doi:10.1371/journal.pone.0155575
- [355] Albright JC, Henke MT, Soukup AA, *et al*. Large-scale metabolomics reveals a complex response of *Aspergillus nidulans* to epigenetic perturbation. *ACS Chem Biol*. 2015;10(6):1535-1541. doi:10.1021/acscchembio.5b00025
- [356] Bauer I, Misslinger M, Shadkchan Y, *et al*. The Lysine Deacetylase RpdA Is Essential for Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol*. 2019;10:2773. doi:10.3389/fmicb.2019.02773
- [357] Ying SH, Liu J, Chu XL, Xie XQ, Feng MG. The autophagy-related genes BbATG1 and BbATG8 have different functions in differentiation, stress resistance and virulence of mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Sci Rep*. 2016;6:26376. doi:10.1038/srep26376
- [358] Liebmann B, Gattung S, Jahn B, Brakhage AA. cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene pksP and in defense against killing by macrophages. *Mol Genet Genomics*. 2003;269(3):420-435. doi:10.1007/s00438-003-0852-0
- [359] Choi YE, Xu JR. The cAMP signaling pathway in *Fusarium verticillioides* is important for conidiation, plant infection, and stress responses but not fumonisin production. *Mol Plant Microbe Interact*. 2010;23(4):522-533. doi:10.1094/MPMI-23-4-0522
- [360] Pascon RC, Miller BL. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans* requires Dopey (DopA), a member of a novel family of leucine zipper-like proteins conserved from yeast to humans. *Mol Microbiol*. 2000;36(6):1250-1264. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01950.x
- [361] Si H, Justa-Schuch D, Seiler S, Harris SD. Regulation of septum formation by the Bud3-Rho4 GTPase module in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2010;185(1):165-176. doi:10.1534/genetics.110.114165
- [362] Virag A, Harris SD. Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. *Eukaryot Cell*. 2006;5(6):881-895. doi:10.1128/EC.00036-06

- [363] Si H, Rittenour WR, Xu K, Nicksarlian M, Calvo AM, Harris SD. Morphogenetic and developmental functions of the *Aspergillus nidulans* homologues of the yeast bud site selection proteins Bud4 and Axl2. *Mol Microbiol.* 2012;85(2):252-270. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08108.x
- [364] Upadhyay S, Shaw BD. The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 2008;68(3):690-705. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06178.x
- [365] Shi J, Chen W, Liu Q, *et al.* Depletion of the MobB and CotA complex in *Aspergillus nidulans* causes defects in polarity maintenance that can be suppressed by the environment stress. *Fungal Genet Biol.* 2008;45(12):1570-1581. doi:10.1016/j.fgb.2008.08.011
- [366] Samuelson DR, Eucker TP, Bell JA, Dybas L, Mansfield LS, Konkel ME. The *Campylobacter jejuni* CiaD effector protein activates MAP kinase signaling pathways and is required for the development of disease. *Cell Commun Signal.* 2013;11:79. doi:10.1186/1478-811X-11-79
- [367] Lyssand JS, Bajjalieh SM. The heterotrimeric [corrected] G protein subunit G alpha i is present on mitochondria [published correction appears in FEBS Lett. 2008 Mar 5;582(5):841]. *FEBS Lett.* 2007;581(30):5765-5768. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.044
- [368] Michaelson D, Ahearn I, Bergo M, Young S, Philips M. Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi. *Mol Biol Cell.* 2002;13(9):3294-3302. doi:10.1091/mbc.e02-02-0095
- [369] Hynes TR, Hughes TE, Berlot CH. Cellular localization of GFP-tagged alpha subunits. *Methods Mol Biol.* 2004;237:233-246. doi:10.1385/1-59259-430-1:233
- [370] Guo M, Aston C, Burchett SA, *et al.* The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160. *Mol Cell.* 2003;12(2):517-524. doi:10.1016/s1097-2765(03)00307-1
- [371] Weber V, Wernitznig A, Hager G, Harata M, Frank P, Wintersberger U. Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy. *Eur J Biochem.* 1997;249(1):309-317. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00309.x
- [372] Errede B, Vered L, Ford E, Pena MI, Elston TC. Pheromone-induced morphogenesis and gradient tracking are dependent on the MAPK Fus3 binding to Gα. *Mol Biol Cell.* 2015;26(18):3343-3358. doi:10.1091/mbc.E15-03-0176
- [373] Qiu M, Li Y, Zhang X, *et al.* G protein α subunit suppresses sporangium formation through a serine/threonine protein kinase in *Phytophthora sojae*. *PLoS Pathog.* 2020;16(1):e1008138. doi:10.1371/journal.ppat.1008138
- [374] Zhang X, Zhai C, Hua C, *et al.* PsHint1, associated with the G-protein α subunit PsGPA1, is required for the chemotaxis and pathogenicity of *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Pathol.* 2016;17(2):272-285. doi:10.1111/mpp.12279
- [375] J Reschka E, Nordzienie S, Valerius O, Braus GH, Pöggeler S. A novel STRIPAK complex component mediates hyphal fusion and fruiting-body development in filamentous fungi. *Mol Microbiol.* 2018;110(4):513-532. doi:10.1111/mmi.14106
- [376] Elramli N, Karahoda B, Sarikaya-Bayram Ö, *et al.* Assembly of a heptameric STRIPAK complex is required for coordination of light-dependent multicellular fungal development with secondary

metabolism in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet*. 2019;15(3):e1008053.
doi:10.1371/journal.pgen.1008053

- [377] Horwitz BA, Sharon A, Lu SW, *et al*. A G protein alpha subunit from *Cochliobolus heterostrophus* involved in mating and appressorium formation. *Fungal Genet Biol*. 1999;26(1):19-32.
doi:10.1006/fgbi.1998.1094
- [378] Yamagishi D, Otani H, Kodama M. G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2006;19(11):1280-1288. doi:10.1094/MPMI-19-1280
- [379] Mah JH, Yu JH. Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2006;5(10):1585-1595. doi:10.1128/EC.00192-06
- [380] Song N, Dai Q, Zhu B, *et al*. Gα proteins Gvm2 and Gvm3 regulate vegetative growth, asexual development, and pathogenicity on apple in *Valsa mali*. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173141.
doi:10.1371/journal.pone.0173141