



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**Análisis proteómico de las vías de señalización mediadas por la subunidad
G α Pga1 de una proteína G heterotrimérica de *Penicillium chrysogenum***

Doctorado en Biotecnología

Presenta:

Ulises Carrasco Navarro.

Director de Tesis:

Dr. Francisco Fierro Fierro¹

Asesores:

Dr. Francisco José Fernández Perrino¹

Dr. Horacio Reyes Vivas²

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

²Instituto Nacional de Pediatría.

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

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 el CONACyT con el número de registro CB-2013-01 222207.

Ciudad de México. 24 de Marzo del 2017

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**Análisis proteómico de las vías de señalización mediadas por la subunidad
G α Pga1 de una proteína G heterotrimérica de *Penicillium chrysogenum*.**

Que presentó
Ulises Carrasco Navarro

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Horacio Reyes Vivas



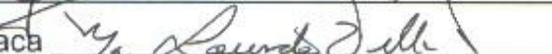
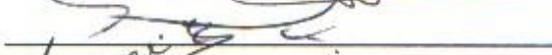
Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Horacio Reyes Vivas

Vocal: Dra. Rosario Vera Estrella

Vocal: Dra. Ma.de Lourdes Villa Tanaca



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Fierro por la confianza, el asesoramiento, la paciencia y toda la ayuda que me ha brindado, gracias por todos los conocimientos adquiridos y por haber confiado en mí para la realización de esta tesis.

Al Dr. Horacio Reyes por compartirme sus conocimientos de proteómica y por todo el tiempo invertido en la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco J. Fernández Perrino por los consejos y comentarios que ayudaron al desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Rosario Vera y a la Dra. Bronwyn J. Barkla por todo el apoyo que me ofrecieron para llevar a cabo gran parte de este trabajo.

A la Dra Lourdes Villa por todo el tiempo y disposición que dedicó a este trabajo.

Al Dr. Ernesto Favela por los acertados y valiosos comentarios.

A mis compañeros de laboratorio: Lalo, Wylma, Esmeralda, Ailed, Kenia, Arturo, Omar, Marisol, Moi, Leida.

A mis compañeros de la PP4, Gaby, Daniel, Carlos.

A mis padres por todo el apoyo y amor recibido durante todos estos años, les agradezco el estar a mi lado en todo momento, gracias por todo su afecto y comprensión, gracias por la oportunidad que me dieron de vivir.

A mis hijos Mía y Rommel, a mi esposa Carmen, a quien agradezco todos los momentos maravillosos que hemos compartido, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, gracias por la ayuda que siempre me has brindado.

"No hay que temer a las sombras. Solo indican que en un lugar cercano resplandece luz"

Ruth Renkel

RESUMEN

La vía de señalización mediada por la subunidad $G\alpha$ Pga1 de una proteína G heterotrimérica regula el desarrollo en *Penicillium chrysogenum*, desde la germinación de esporas hasta la formación de conidios. Además participa en la regulación de la biosíntesis de penicilina. Nuestro objetivo fue avanzar en la comprensión de esta vía clave de señalización utilizando un enfoque proteómico, que resulta en una poderosa herramienta para identificar nuevos efectores que participan en las vías de transducción de señales.

Para realizar los análisis proteómicos comparativos mediante 2D-DIGE y LC-MS/MS se utilizaron mutantes de *P. chrysogenum* con diferentes niveles de actividad de la vía de señalización mediada por $G\alpha$ Pga1. Se identificaron treinta proteínas que mostraron cambios significativos en la abundancia de una forma dependiente de la actividad de $G\alpha$ Pga1. Mediante la modificación de los niveles intracelulares de AMPc logramos establecer vías AMPc-dependiente y AMPc-independiente de Pga1. Se demostró que $G\alpha$ Pga1 regula la abundancia de enzimas de las vías metabólicas primarias implicadas en la biosíntesis de ATP, NADPH y cisteína, compuestos que son necesarios para la biosíntesis de penicilina. Se identificó una proteína fosforilada *in vivo* que contiene un dominio Pleckstrin (PH); Esta proteína es candidata para formar parte de vías de transducción de señales. También se identificaron proteínas con posibles funciones en el metabolismo de purinas, plegamiento de proteínas, respuesta al estrés y morfogénesis, cuya abundancia fue regulada por la señalización $G\alpha$ Pga1.

Para los análisis fosfoproteómicos, se utilizaron dos metodologías diferentes: 2D-DIGE con extractos enriquecidos de fosfoproteínas seguido de la identificación de los *spots* (puntos) individuales por LC-MS/MS, y un enfoque fosfoproteómico mediante la metodología "Label free" con extractos enriquecidos de fosfopéptidos (usando cromatografía de afinidad con TiO_2) y LC-MS/MS. El análisis 2D-DIGE mostró cambios en la abundancia de proteínas fosforiladas, sin embargo se obtuvo poca información sobre la fosforilación diferencial. En el análisis de "Label free" se identificaron 383 proteínas fosforiladas a partir de 8343 espectros totales, además se logró identificar cambios en los patrones de fosforilación de proteínas entre las

condiciones, lo que permitió identificar nuevos efectores de la vía de señalización mediada por $G\alpha$ Pga1. Se identificaron probables factores de transcripción y proteínas fosforiladas de remodelación de la cromatina, una de estas proteínas fue Pc16g10400 (proteína con un dominio Bromo y tres dominios PHD), con dos sitios de fosforilación en S-738 y S-742, sin embargo la fosforilación en S-742 está presente sólo en la cepa $\Delta pga1$.

ABSTRACT

The heterotrimeric G α protein Pga1-mediated signaling pathway regulates the entire developmental program in *Penicillium chrysogenum*, from spore germination to the formation of conidia. In addition it participates in the regulation of penicillin biosynthesis. We aimed to advance the understanding of this key signaling pathway using a proteomics approach, a powerful tool to identify effectors participating in signal transduction pathways.

P. chrysogenum mutants with different levels of activity of the Pga1-mediated signaling pathway were used to perform comparative proteomic analyses by 2D-DIGE and LC-MS/MS. Thirty proteins were identified which showed differences in abundance dependent on Pga1 activity level. By modifying the intracellular levels of cAMP we could establish cAMP-dependent and cAMP-independent pathways in Pga1-mediated signaling. Pga1 was shown to regulate abundance of enzymes in primary metabolic pathways involved in ATP, NADPH and cysteine biosynthesis, compounds that are needed for high levels of penicillin production. An in vivo phosphorylated protein containing a pleckstrin homology domain was identified; this protein is a candidate for signal transduction activity. Proteins with possible roles in purine metabolism, protein folding, stress response and morphogenesis were also identified whose abundance was regulated by Pga1 signaling.

For phosphoproteomic analyses, two different methodologies were used: 2D-DIGE with phosphoprotein-enriched extracts followed by identification of individual spots by LC-MS/MS, and a "Label-Free" phosphoproteomics approach with phosphopeptide-enriched extracts (using TiO₂ affinity chromatography) submitted to LC-MS/MS. The 2D-DIGE analysis showed changes in abundance of phosphorylated proteins when comparing the strains, but little information on differential phosphorylation. 383 phosphorylated proteins were identified from 8343 total spectra, the Label-Free phosphoproteomic analysis showed changes in the phosphorylation patterns of proteins between strains, which allowed to identify new effectors of the Pga1 signaling pathway. Fifteen probable transcription factors and chromatin remodeling proteins were identified, one of these proteins was

Pc16g10400 (protein with a Bromo Adjacent Homology domain and a PHD zinc finger domain), with two phosphorylation sites at S-738 and S-742, of which the S-742 site is present only in the *Δpga1* strain.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Importancia biotecnológica de <i>Penicillium chrysogenum</i>.	18
2.2. Regulación de la biosíntesis de penicilina en <i>P. chrysogenum</i>.	18
2.2.1. Regulación de la biosíntesis de penicilina en función del pH	22
2.2.2. Represión por carbono en la biosíntesis de penicilina	22
2.2.3. Represión por nitrógeno en la biosíntesis de penicilina	23
2.2.4. Efecto del regulador global LaeA en la biosíntesis de penicilina	23
2.2.4. Los Factores de transcripción PcRFX1 y PcFKH1 como reguladores de la biosíntesis de penicilina ..	24
2.3. Proteínas G heterotriméricas	24
2.3.1. Señalización celular mediada por proteínas G.	25
2.4. Proteómica.	27
2.4.1. Fragmentación de péptidos y proteínas.	33
2.5. Métodos de análisis proteómico.	34
2.5.1. 2D-PAGE.....	34
2.5.2. 2D-DIGE.....	35
2.5.3. Métodos proteómicos basados en cromatografía de líquidos acoplados a espectrometría de masas (LC-MS).	35
2.5.4. Proteómica aplicada a hongos filamentosos	37
2.5.5. Proteómica comparativa.	39
2.6. Fosfoproteómica	40
2.6.1. Metodologías empleadas en estudios fosfoproteómicos.....	40
3. JUSTIFICACIÓN.....	42
4. OBJETIVOS.....	43
4.1. Objetivo general.	43

4.2. Objetivos particulares.	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1. Microorganismos.	44
5.2. Obtención de esporas.	44
5.3. Condiciones de cultivo.	45
5.4. Ensayos de inducción de AMPc.	45
5.5. Obtención de extractos proteicos intracelulares de <i>P. chrysogenum</i>	45
5.6. Cuantificación de la concentración de proteína.	46
5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	46
5.8. Electroforesis en geles bidimensionales (2D-PAGE).	46
5.8.1 Primera dimensión (Isoelectroenfoque con tiras IPG de 7 cm)	46
5.8.2. Segunda dimensión (SDS-PAGE)	47
5.8.3. Tinción	47
5.8.4. Digitalización de las imágenes de los 2D-PAGE.	47
5.8.6. Identificación de proteínas por MALDI-TOF MS (huella peptídica).	48
5.9. Análisis de los cambios de abundancia de proteínas mediante la técnica 2D-DIGE.	49
5.9.1. Diseño del experimento de 2D-DIGE.	49
5.9.2. Primera dimensión 2D-DIGE (Isoelectroenfoque con tiras IPG de 17 cm)	50
5.9.3. Segunda dimensión de la metodología 2D-DIGE (SDS-PAGE).....	50
5.9.4. Digitalización de las imágenes de la 2D-DIGE.	50
5.9.5. Análisis de imágenes de la 2D-DIGE.....	51
5.9.6. Identificación de proteínas de la 2D-DIGE por Espectrometría de Masas.....	51
5.10. Análisis de expresión de proteínas intracelulares fosforiladas mediante la técnica 2D-DIGE.	52
5.10.1 Enriquecimiento de fosfoproteínas.	52

5.11. Análisis Fosfoproteómico por el método de "Label free"	56
5.11.1. Extracción de proteínas intracelulares para el análisis fosfoproteómico por "Label free"	56
5.12. Silenciamiento de los genes Pc22g17420 y Pc22g05690.	58
5.12.1. Plásmido empleado para el silenciamiento de los genes.	58
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
6.1. 2D-PAGE de los extractos proteicos de las cepas de <i>P. chrysogenum</i>.	64
6.1.1. Obtención de geles "master" mediante el programa PDQuest.....	65
6.1.4. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.	69
6.2. Análisis proteómico mediante la técnica 2D-DIGE.	72
6.2.1. Detección e identificación de proteínas que muestran cambios de abundancia dependiente de Pga1.	72
6.2.2. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a su función biológica.....	74
6.2.4. Regulación de proteínas involucradas en el metabolismo de purinas en función de Pga1.....	83
6.2.12. Modelo propuesto de la vía de señalización mediada por Pga1.	93
6.2.13. Efecto de Pga1 en la producción de biomasa de <i>P. chrysogenum</i>	97
6.3. Análisis diferencial de proteínas fosforiladas previamente enriquecidas mediante 2D-DIGE.	98
6.3.1. Cambios en la abundancia de las proteínas fosforiladas identificadas por 2D-DIGE en función de Pga1.	100
6.4. Análisis fosfoproteómico mediante la técnica LC-MS/MS "Label Free".	102
6.4.3. Fosforilación diferencial de factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina	109
6.5. Obtención de los plásmidos para el silenciamiento de los genes Pc22g17420 y Pc22g05690.	111
7. CONCLUSIONES.	115
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXO 1	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de metabolitos secundarios biosintetizados por hongos.....	19
Figura 2. Reacciones involucradas en la biosíntesis de penicilina en <i>P. chrysogenum</i>	21
Figura 3. Agrupamiento de los genes involucrados en biosíntesis de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> y <i>Aspergillus nidulans</i> , y de cefalosporina en <i>Acremonium chrysogenum</i>	22
Figura 4. Ciclo de una proteína G heterotrimérica.....	25
Figura 5. Métodos de ionización en espectrometría de masas.....	29
Figura 6. Algunas configuraciones de analizadores empleados en espectrómetros de masas.....	31
Figura 7. Fragmentación de un péptido.....	34
Figura 8. Mapa del plásmido pJL43-RNAi.....	59
Figura 9. Ubicación de los oligos para confirmar los transformantes de <i>P. chrysogenum</i> dentro del plásmido pJL43-RNA.....	63
Figura 10. 2D-PAGE del proteoma intracelular de la cepa Wis 54-1255.....	64
Figura 11. Construcción del gel “master” de la cepa Wis 54-1255.....	65
Figura 12. Construcción del gel “master” de la cepa $\Delta pga1$	66
Figura 13. Comparación del proteoma intracelular de las cepas Wis 54-1255 y $\Delta pga1$	67
Figura 14. Acercamiento de los spots que muestran cambios de abundancia de las cepas Wis 54-1255 y $\Delta pga1$	68
Figura 15. Concentración de AMPc de las cepas Wis 54-255, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1+AMPc$	72
Figura 16. Gel 2D-DIGE representativo y clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a su función biológica.....	74
Figura 17. Heat map.....	77
Figura 18. Cambios en la abundancia de proteínas.....	78
Figura 19. Abundancia y representación esquemática de la proteína Pc22g05690 en las diferentes cepas y en la condición $\Delta pga1+AMPc$	87

Figura 20. Abundancia y representación esquemática de la proteína Pc22g17420 en las diferentes cepas y en la condición $\Delta pga1+AMPc$	90
Figura 21. Esquema de la proteína Pc22g04840.....	91
Figura 22. Interactoma <i>in silico</i>	94
Figura 23. Modelo de la transducción de señales mediada por Pga1	96
Figura 24. Producción de biomasa.....	98
Figura 25. Cambios de abundancia de las proteínas fosforiladas.....	100
Figura 26. Representación gráfica de la proteína Pc22g10040.....	102
Figura 27. Clasificación de las proteínas fosforiladas de acuerdo a su proceso biológico.....	103
Figura 28. Identificación del componente celular en el cual se ubican las proteínas fosforiladas.....	104
Figura 29. Procesos celulares específicos de las proteínas fosforiladas.....	105
Figura 30. Procesos metabólicos de las proteínas fosforiladas.....	106
Figura 31. Esquema de la proteína Pc16g10400.....	110
Figura 32. Construcción de los plásmidos para el silenciamiento de los genes...	112
Figura 33. Gel de agarosa de los productos de PCR (silenciamiento del gen Pc22g17420).....	113
Figura 34. Gel de agarosa de los productos de PCR (silenciamiento del gen Pc22g05690).....	114

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y condiciones empleadas en el estudio proteómico de los diferentes genotipos de Pga1.....	44
Tabla 2. Diseño del experimento de 2D-DIGE para cuatro condiciones.....	49
Tabla 3. Diseño del experimento de 2D-DIGE con fosfoproteínas para cuatro condiciones.....	54
Tabla 4. Oligos diseñados para amplificar el fragmento de los genes clonados en el plásmido pJL43-RNAi.....	60
Tabla 5. Proteínas identificadas mediante “huella peptídica”.....	69
Tabla 6. Proteínas identificadas que muestran cambios significativos de abundancia.....	75
Tabla 7. Predicción de las cinasas que fosforilan a la proteína Pc22g05690.....	88
Tabla 8. Predicción de las cinasas que fosforilan a la proteína Pc22g04840.....	92
Tabla 9. Fosfoproteínas identificadas.....	99
Tabla 10. Factores de transcripción y proteínas remodeladoras de cromatina fosforiladas en <i>P. chrysogenum</i>	108
Tabla 11. Cambios en los patrones de fosforilación de los factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina.....	110

ABREVIATURAS

2D-DIGE: electroforesis bidimensional-diferencial en gel

2D-PAGE: electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato

DTT: ditioneitol

ESI: Ionización por electrospray

IMAC: cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados

IPG: gradiente de pH inmovilizado

LC-MS/MS: cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en *tandem*

MALDI: desorción/ionización por láser asistida por matriz

MOAC: cromatografía de afinidad con óxidos de metales

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TCA: ácido tricloroacético

TFA: ácido trifluoroacético

TOF: tiempo de vuelo

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la penicilina por Fleming es probablemente uno de los acontecimientos más importantes en la medicina a nivel mundial (**Bartoszewska y col., 2011**). *Penicillium chrysogenum* es un hongo ascomiceto capaz de sintetizar el antibiótico penicilina y otros metabolitos secundarios (**Van Den Berg y col., 2010**). Mediante técnicas clásicas de mutación y selección se han logrado obtener cepas de este hongo con niveles de producción de penicilina muy altos, algo que ha determinado de forma adicional la aparición de diversos cambios metabólicos en las cepas de *P. chrysogenum* (**Weber y col., 2012, Jami y col., 2010**) Por lo anterior, el estudio de las bases bioquímicas que influyen en la biosíntesis de penicilina y otros metabolitos secundarios ha sido abordado por diversos grupos de investigación (**Brakhage y col., 2004, Ozcengiz y col., 2013**). Uno de los factores que influyen en la biosíntesis de estos compuestos es la vía de señalización de las proteínas G heterotriméricas, algo ya descrito por **García Rico y col. (2008a)** en *P. chrysogenum*. Sin embargo, aún se sabe poco sobre cómo funcionan las rutas de señalización mediadas por proteínas G en este hongo. La proteómica y fosfoproteómica basada en espectrometría de masas han sido metodologías de gran ayuda para el estudio de redes globales de señalización celular, con esta herramienta se pueden identificar las proteínas y sus modificaciones postraduccionales en diferentes estados fisiológicos celulares (**Choudhary y Mann, 2010**).

El objetivo del presente trabajo fue identificar los cambios en los perfiles proteicos de cepas de *P. chrysogenum*, utilizando herramientas proteómicas, con el fin de identificar efectores de las vías de señalización celular dependientes de la subunidad G α Pga1 de una proteína G heterotrimérica.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia biotecnológica de *Penicillium chrysogenum*.

P. chrysogenum es un hongo filamentoso empleado industrialmente para la producción del antibiótico penicilina (**Van Den Berg y col., 2010**). Tras el aislamiento de la cepa NRRL 1951 en Peoria (Illinois, E.E.U.U.), este microorganismo fue sometido a mutagénesis y selección artificial, para el desarrollo de cepas de alta producción. De esta forma se obtuvo la cepa Wis 54-1255 (la cepa que se emplearía posteriormente para el análisis de la secuencia genómica de esta especie). Durante los sucesivos procesos de mejora industrial se han logrado obtener también cepas de alta producción, como las cepas P2, DS04825 y AS-P-78, hasta llegarse a las cepas empleadas actualmente para la producción del antibiótico, con las cuales se obtienen concentraciones de más de 50 mg/mL de penicilina (**Ozcengiz y Demain, 2013**). Este hongo puede tener además otros usos biotecnológicos, como por ejemplo en la producción de enzimas: **Jami y col. (2010b)** identificaron proteínas extracelulares de *P. chrysogenum* especialmente relevantes en la industria alimentaria, como por ejemplo las enzimas sulfhidrilhidrolasa, glucoamilasa, alcohol isoamílico oxidasa y dihidroxiácido deshidratasa.

2.2. Regulación de la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*.

En general, el metabolismo de los hongos puede ser dividido en el metabolismo primario, el cual provee a la célula de la energía y los precursores químicos esenciales para el crecimiento y reproducción; y el metabolismo secundario (**Brakhage y col., 2004**). Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular y químicamente heterogéneos, estos metabolitos no son requeridos directamente para el crecimiento del organismo que los produce (**Brakhage, 2013**), Entre estos compuestos se encuentran los antibióticos β -lactámicos (como la penicilina y la cefalosporina), antivirales, antitumorales, inmunosupresores, vasoconstrictores, antifúngicos y hipolipemiantes (**Brakhage y Schroeckh, 2011**).

La figura 1 muestra la estructura de algunos metabolitos secundarios producidos por hongos.

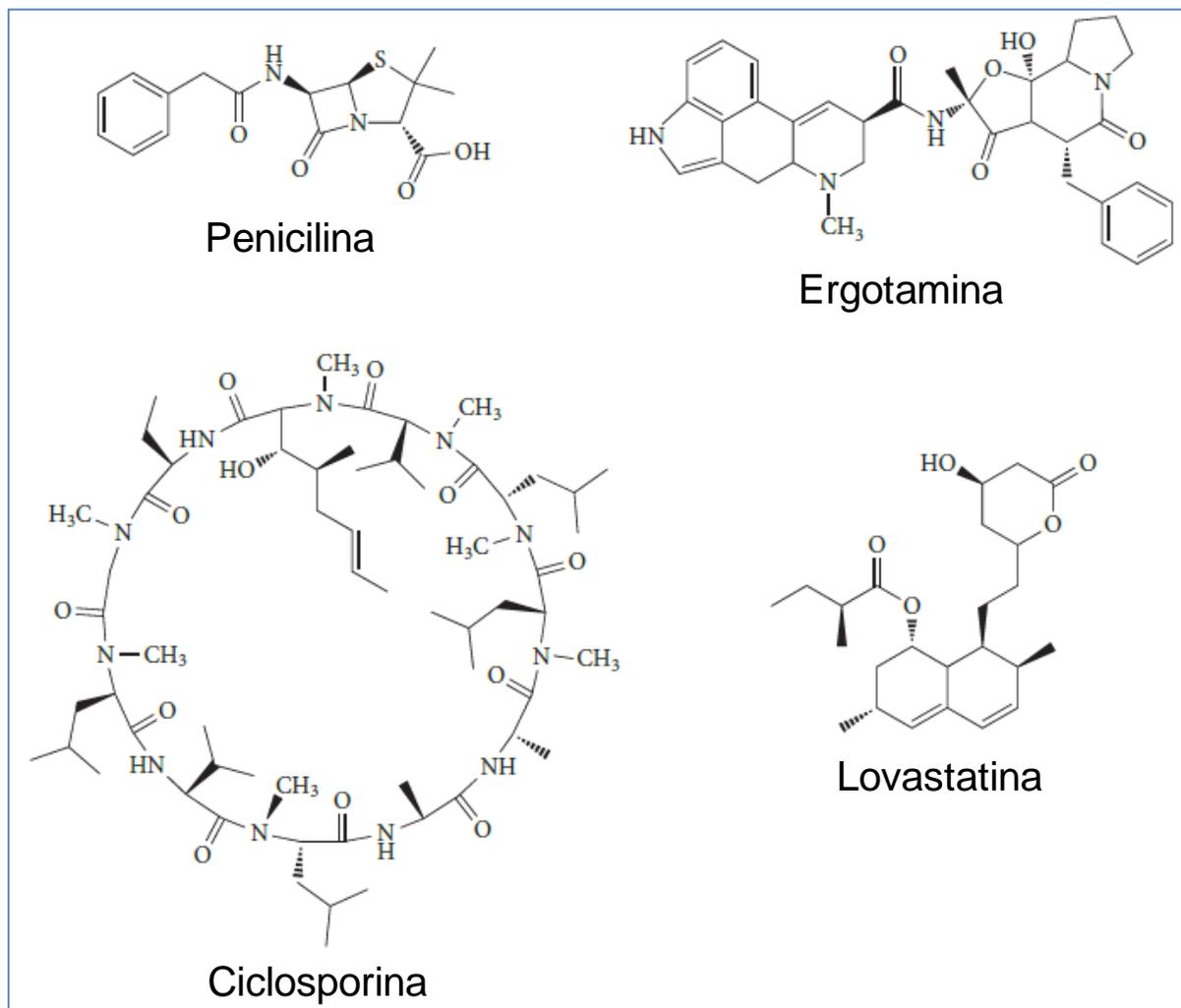


Figura 1. Ejemplos de metabolitos secundarios biosintetizados por hongos. Se muestra la estructura de la penicilina, la cual es un antibiótico β -lactámico, la ergotamina es usada como vasoconstrictor, la lovastatina se emplea como fármaco en la reducción de los niveles de colesterol, y la ciclosporina que es usada como fármaco inmunosupresor ampliamente usado en el trasplante de órganos (**Modificado de Brakhage, 2013**)

Regularmente los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios (como la penicilina) se encuentran agrupados en clústers (**Smith y col., 1990**). El clúster de biosíntesis de penicilina consiste en los genes *pcbAB* (δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa), *pcbC* (isopenicilina-N-sintetasa), y *penDE* (Isopenicilina aciltransferasa), la biosíntesis de penicilina se muestra en la figura 2. El primer paso

de la biosíntesis de penicilina es la condensación de los aminoácidos L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina para dar el producto ACV (δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina), este paso de reacción es catalizado por la enzima δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa (ACVS), **(Ozcengiz y Demain, 2013)**, posteriormente el compuesto ACV es convertido al compuesto hidrofílico isopenicilina N (IPN) por la acción de la enzima isopenicilina-N-sintetasa (IPNS), esta enzima cataliza la transferencia de cuatro átomos de hidrógeno al dioxígeno **(Ozcengiz y Demain, 2013)**, esta reacción es llevada en el citosol **(van der Lende., 2002)**. El tercer paso de biosíntesis consiste en el intercambio de la cadena de L- α -aminoadípico de la IPN por una cadena hidrofóbica de acil-CoA, esta reacción es catalizada por la Isopenicilina aciltransferasa (IAT). Esta enzima purificada presenta varias actividades catalíticas: actividad isopenicilina aciltransferasa convirtiendo isopenicilina N a penicilina G, actividad isopenicilina-N-amidohidrolasa convirtiendo isopenicilina N a ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), actividad 6-APA aciltransferasa convirtiendo 6-APA a penicilina G, y actividad penicilina amidasa que convierte penicilina G a 6-APA **(Ozcengiz y Demain, 2013)**, la enzima IAT está presente en peroxisomas **(van de Kamp y col., 1999)**.

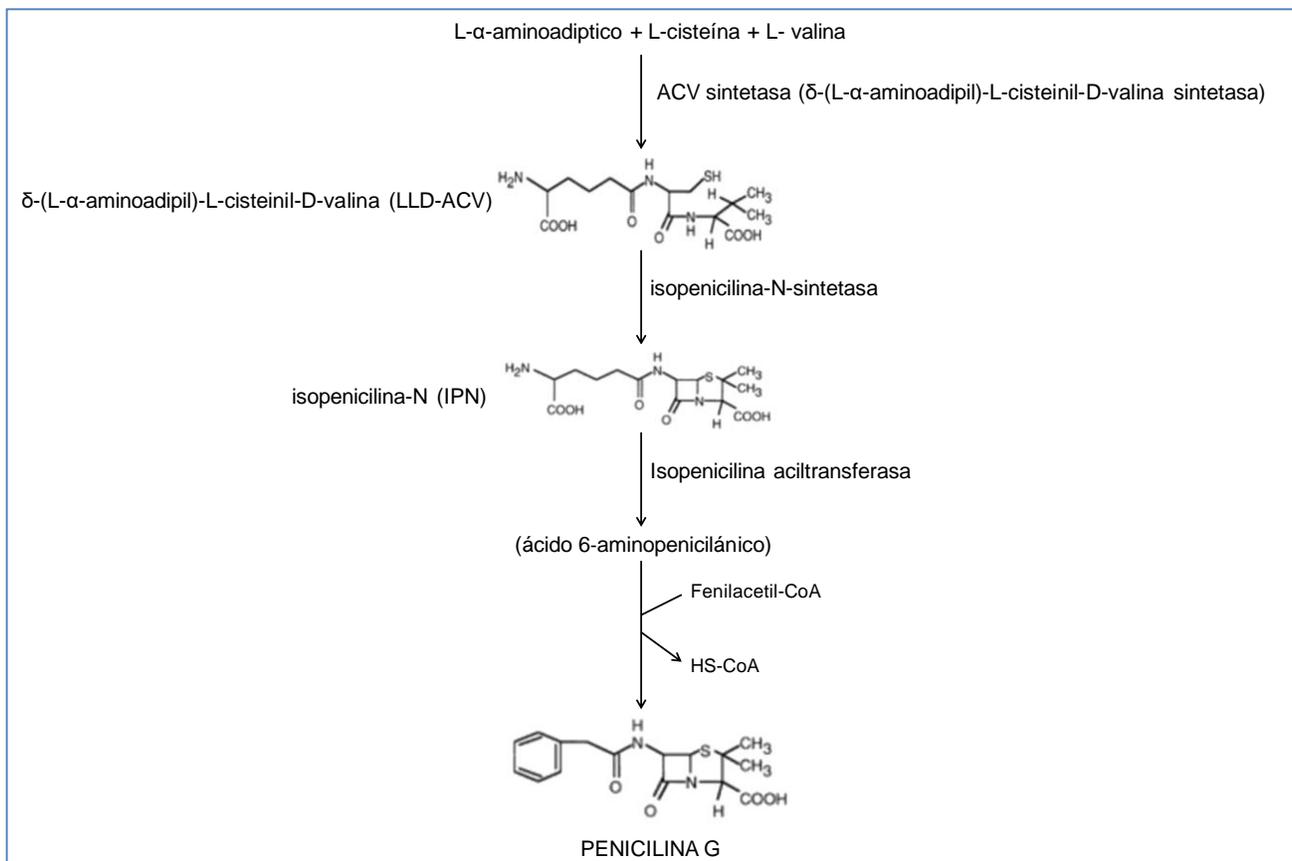


Figura 2. Reacciones involucradas en la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* (Modificado de Ozcengiz y Demain, 2013).

En *Aspergillus nidulans* y *Acremonium chrysogenum*, los genes de biosíntesis de penicilina y cefalosporina respectivamente también se encuentran agrupados en clusters (Martin, 2000; Ozcengiz y Demain, 2013), la figura 3 muestra el agrupamiento de los genes de biosíntesis de penicilina y cefalosporina de estos hongos.

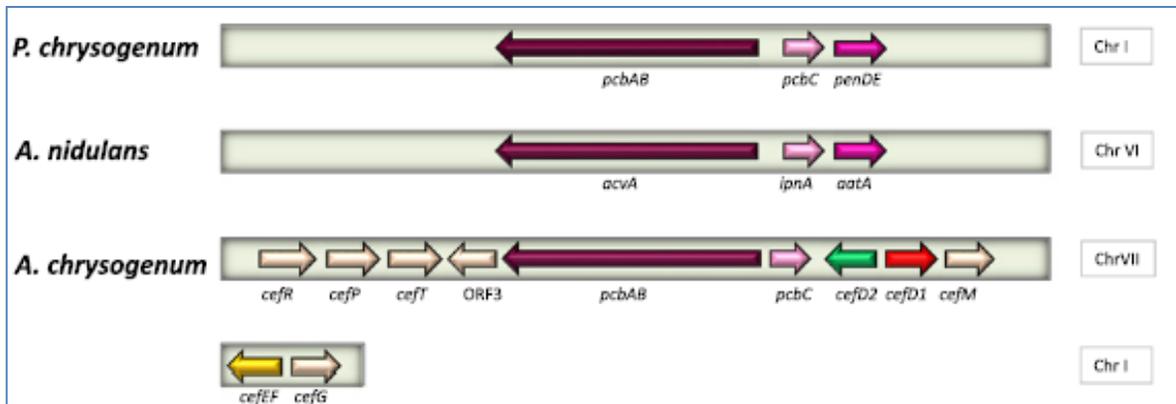


Figura 3. Agrupamiento de los genes involucrados en biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* y *Aspergillus nidulans*, y de cefalosporina en *Acremonium chrysogenum* (Modificado de Ozcengiz y Demain, 2013).

Estos clusters de metabolitos secundarios son regulados por diferentes estímulos del medio como el pH, carbono, nitrógeno, temperatura y luz (Yin y Keller, 2011).

2.2.1. Regulación de la biosíntesis de penicilina en función del pH

Un pH alcalino extracelular estimula ligeramente la transcripción de los genes de biosíntesis de penicilina (Martin, 2000). Suarez y Peñalva (1996) identifican el factor de transcripción PacC de *P. chrysogenum*, el cual regula la expresión del gen *pcbC* en función del pH, este factor de transcripción presenta tres sitios de unión en el promotor divergente de los genes *pcbAB* y *pcbC*, los autores observan una mayor transcripción del gen que codifica a PacC en pH alcalino. PacC contiene tres dedos de Zinc del tipo Cys₂His₂, En *Aspergillus nidulans*, el gen que codifica a la isopenicilina-N-sintetasa está regulado por PacC (Espeso y col., 1993).

2.2.2. Represión por carbono en la biosíntesis de penicilina

La biosíntesis de penicilina así como la transcripción de los genes de biosíntesis están sujetos a represión por Carbono (Cepeda-García y col., 2014) se ha observado que altas concentraciones de glucosa disminuyen la formación de δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina, el primer intermediario de la ruta de biosíntesis de penicilina (Revilla y col., 1986). Cepeda-García y col. (2014) identificaron la participación del factor de transcripción CreA (regulador de la represión por carbono en hongos filamentosos) en la biosíntesis de penicilina y la expresión del gen *pcbAB*

en *P. chrysogenum*, los autores identifican sitios putativos de unión de este factor de transcripción en el promotor del gen *pcbAB*, así mismo la atenuación del gen *creA* mediante RNAi muestra una mayor producción de penicilina cuando se usa glucosa como fuente de carbono.

2.2.3. Represión por nitrógeno en la biosíntesis de penicilina

La fuente de nitrógeno regula la producción de penicilina, particularmente el amonio tiene un efecto represor de la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC* (**Ozcengiz y Demain. 2013**), La proteína reguladora por nitrógeno NRE, controla la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*, esta proteína funciona como factor de transcripción (del tipo dedos de Zinc: Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cy), el cual se une a la región intergénica de los genes *pcbAB* y *pcbC*. Esta región contiene seis secuencias GATA, de las cuales el factor de transcripción NRE se une a dos de estas regiones (**Haas H y Marzluf, 1995**).

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

LaeA es una proteína cuya secuencia es similar al de las histona y arginina metiltransferasas (modificación de la cromatina) la cual es un regulador global del metabolismo secundario en varias especies de hongos (**Brakhage, 2013**). LaeA regula la biosíntesis de esterigmatocistina, penicilina y lovastatina en *Aspergillus* spp (**Bok y Keller, 2004**). Por otra parte LaeA forma parte, junto con las proteínas VelB y VeA del complejo *velvet*, el cual coordina la señal de luz con el desarrollo y el metabolismo secundario en *Aspergillus nidulans*, y aparentemente está conservado en la mayoría de los hongos a excepción de levaduras (**Bayram y col., 2008; Brakhage, 2013**). El silenciamiento por RNAi del gen *Pc/laeA* (que codifica a la proteína LaeA) en *P. chrysogenum* muestra una disminución de la producción de penicilina así como de los genes de biosíntesis del antibiótico, así mismo se observan defectos en la esporulación y pigmentación. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *Pc/laeA* incrementa en un 25% la producción de penicilina en comparación a la cepa silvestre Wis-54-1255 (**Kosalková y col., 2009**).

2.2.4. Los Factores de transcripción PcRFX1 y PcFKH1 como reguladores de la biosíntesis de penicilina

El factor de transcripción PcRFX1 de *P.chrysogenum* controla la expresión de los tres genes de la ruta de biosíntesis de penicilina, este factor de transcripción es ortólogo del factor de transcripción CPCR1 y RfxA de *Acremonium chrysogenum* y *Penicillium marneffeii* respectivamente. PcFKH1 regula positivamente la biosíntesis de penicilina a través de la interacción con la región promotora de los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, modificando su transcripción **(Domínguez-Santos y col., 2012)**. Otra proteína reguladora de la biosíntesis de penicilina es el factor de transcripción PcFKH1 (factor de transcripción de la familia Forkhead), esta proteína presenta un sitio de unión al promotor del gen *penDE*, modificando los niveles de mRNA del gen. PcFKH1 no solo regula la biosíntesis de penicilina, sino que además afecta la esporulación y pigmentación **(Domínguez-Santos y col., 2015)**.

2.3. Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G son parte de distintas vías de señalización celular presentes en organismos eucariotas. Cada proteína G es un heterotrímero, compuesto por las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. La subunidad $G\alpha$ puede unir GDP y GTP y posee actividad GTPasa, hidrolizando GTP a GDP. Las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ permanecen unidas, formando el dímero $G\beta\gamma$ **(Li y col., 2007)**.

La Figura 4 muestra el ciclo de una proteína G. Cuando la proteína G se encuentra en un estado inactivo, las tres subunidades se mantienen unidas y asociadas con un receptor acoplado a proteína G (GPCR: *G protein coupled receptor*). En este estado la subunidad α une GDP. Cuando un ligando se une al GPCR, se da un cambio de conformación que permite que la subunidad α de la proteína G intercambie el GDP por GTP ($G\alpha$ -GTP) con la subsecuente disociación del dímero $G\beta\gamma$. Las conformaciones $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$ pueden interactuar con efectores "corriente abajo (*downstream*), incluyendo canales iónicos, adenilato-ciclasa, fosfodiesterasas y fosfolipasas. Con el tiempo, debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, el GTP unido a dicha subunidad será hidrolizado a

GDP. La subunidad $G\alpha$ -GDP se asociará entonces nuevamente con el dímero $G\beta\gamma$, originándose de nuevo la forma inactiva de la proteína G (Li y col., 2007).

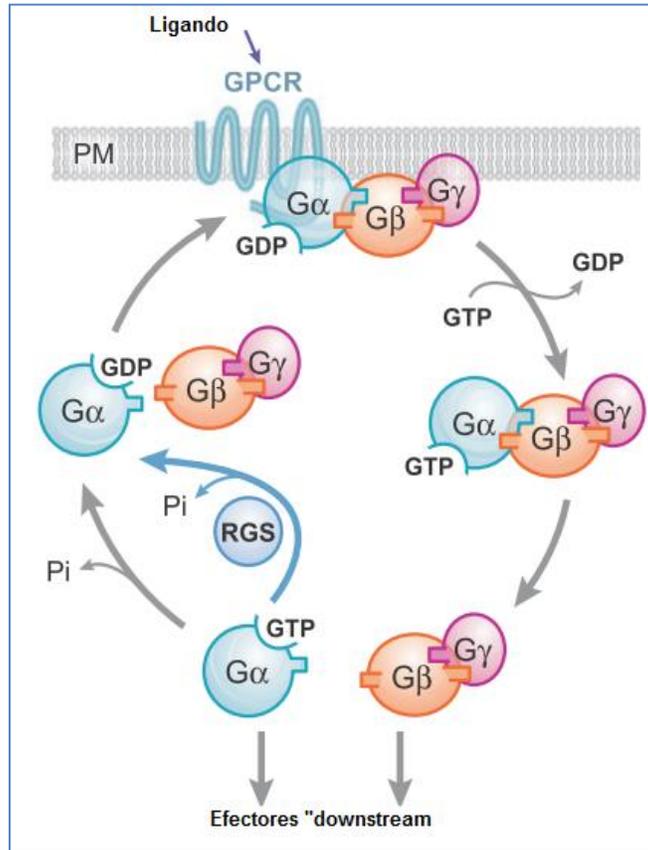


Figura 4. Ciclo de una proteína G heterotrimérica (Modificado de Li y col., 2007). Abreviaturas: GPCR: receptor acoplado a proteínas G, GTP: guanosín trifosfato, GDP: guanosín difosfato, RGS: regulador de la señalización por Proteínas G, $G\alpha$: subunidad α de una proteína G, $G\beta$: subunidad β de una proteína G, $G\gamma$: subunidad γ de una proteína G.

2.3.1. Señalización celular mediada por proteínas G.

En hongos, las proteínas G están involucradas en varios procesos celulares, como diferenciación y desarrollo celular e incluso la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios como la penicilina (Bölker, 1998; Li y col., 2007; García-Rico y col., 2007, 2008a 2008b). Estudios llevados a cabo con *Aspergillus nidulans* muestran que una mutación en el gen *fadA* (que codifica para la subunidad $G\alpha$ de una proteína G, FadA) provoca la eliminación de la actividad GTPasa intrínseca y la aparición de un fenotipo de crecimiento proliferativo y ausencia de conidiación (que se denominó *fluffy*). Asimismo, la activación constitutiva de GanB (subunidad $G\alpha$ de una proteína

G homóloga de *Aspergillus nidulans*) causa una reducción en el crecimiento de las hifas y defectos en la esporulación (**Chang y col., 2004**).

Shimizu y Keller (2001) estudiaron la participación de una proteína cinasa dependiente de AMPc (PkaA) en vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas. Estos autores mostraron que la regulación de la esporulación asexual por FadA en el hongo *Aspergillus nidulans* es mediada por PkaA. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la síntesis de AMPc por la adenilato ciclasa ocurre después de que la glucosa extracelular se une a un receptor GPCR (Gpr1p) que a su vez activa la subunidad α de una proteína G (Gpa2p) (**Fuller y col., 2009**). El AMPc a su vez se une a las subunidades reguladoras de la proteína cinasa A, induciendo una disociación del tetrámero de la holoenzima y originando la forma activa de la enzima (**Stefan y col., 2011**).

En *P. chrysogenum* NRRL 1951 se ha identificado el gen *pga1*, que codifica para la subunidad $G\alpha$ (Pga1) de una proteína G heterotrimérica, la cual participa en procesos de crecimiento y desarrollo del hongo. La disminución en la expresión de *pga1* por técnicas de RNAi y la mutación de este gen (subunidad α Pga1 constitutivamente activa: alelo *pga1^{G42R}* y constitutivamente inactiva: alelo *pga1^{G203R}*) demuestran que Pga1 controla la extensión apical y regula negativamente la conidiogénesis (**García-Rico y col., 2007**). Pga1 regula adicionalmente la biosíntesis de metabolitos secundarios como penicilina, crisogenina y roquefortina en *P. chrysogenum* (**García-Rico y col., 2008a**). Pga1 también tiene un papel relevante en el proceso de germinación de los conidios (**García-Rico y col., 2011**). **García-Rico y col. (2008b)** también han descrito el efecto de la subunidad $G\alpha$ Pga1 de *P. chrysogenum* sobre la concentración intracelular de AMPc (segundo mensajero en la vía de señalización mediada por Pga1). Los niveles intracelulares de AMPc se ven afectados positivamente por Pga1. Pga1 regula negativamente el proceso de conidiación, resultado de la represión de los genes *brlA* y *wetA*. Este efecto, no obstante, es mayoritariamente independiente del AMPc, por lo que se deduce que existen vías de señalización alternativas a la vía AMPc/PKA en la ruta de transducción de señales mediada por Pga1.

2.4. Proteómica.

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular, de su abundancia, estructura y funciones. Ésta, combina tecnologías emergentes que tienen como objetivo describir y caracterizar todas las proteínas presentes en un sistema biológico, aunque el mayor avance en los estudios proteómicos se ha dado gracias al desarrollo y modernización de la espectrometría de masas (MS) **(Peng y Gygi, 2001; Zhang y col., 2010)**.

El término proteoma fue acuñado en 1995 para definir a todas las proteínas que son producidas a partir de un genoma en un tejido o en una célula **(Graves y Haystead, 2002)**. La importancia del estudio del proteoma radica en el hecho de que la expresión génica puede no estar correlacionada con el contenido proteico de un organismo, dado que no siempre el ARNm se traduce en proteína y la medida en la que una proteína se sintetiza a partir de ARNm depende del gen y del estado fisiológico de la célula en ese momento concreto **(Gygi col., 1999; Graves y Haystead, 2002)**.

La proteómica es, por lo tanto, una parte fundamental de los análisis ÓMICOS, ya que determina la relación entre un determinado genoma y los fenotipos correspondientes **(de Oliveira y Graaff, 2011)**.

El estudio de la proteómica se ha impulsado y desarrollado gracias a la integración de distintas áreas computacionales, genéticas y bioquímicas, cada vez más sensibles, como la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), la cual separa proteínas por punto isoeléctrico y por peso molecular. Sin embargo, la espectrometría de masas es una herramienta versátil e indispensable en la química de proteínas y la proteómica.

Un espectrómetro de masas mide la relación masa/carga (m/z) de iones en fase gas, con esta medición se obtiene una gráfica de la abundancia de los iones contra m/z , lo cual representa un espectro de masas **(Griffiths y Wang, 2009)**. Para obtener este resultado, los espectrómetros separan las especies iónicas utilizando campos electromagnéticos en el vacío. Básicamente, los espectrómetros de masas constan de tres partes fundamentales, un sistema de ionización, un analizador de

masas y un detector de iones, las especies ionizadas pasan de la fuente de iones hacia el analizador de masas **(Aebersold y Mann, 2003)**.

Actualmente los sistemas de ionización por electrospray (ESI) y de ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI) son los más socorridos en configuraciones de espectrómetros de masas, ya que estos sistemas de ionización “suaves” permiten la ionización de pequeñas moléculas y de otras más grandes como lo son las proteínas **(Chen y col., 2007)**. ESI (también llamada ionización por electropulverización) opera bajo condiciones de presión atmosférica (API) y produce pequeñas gotas de disolvente cuando se aplica un potencial eléctrico (kV), el sistema ESI es fácilmente acoplado a sistemas de separación, por ejemplo cromatográficos, en especial cromatografía de líquidos (LC-MS). Por su parte MALDI ioniza la muestra mezclada con una matriz seca por medio de pulsos de laser **(Aebersold y Mann, 2003)**. La figura 5 muestra los dos métodos de ionización más utilizados en proteómica: MALDI y ESI.

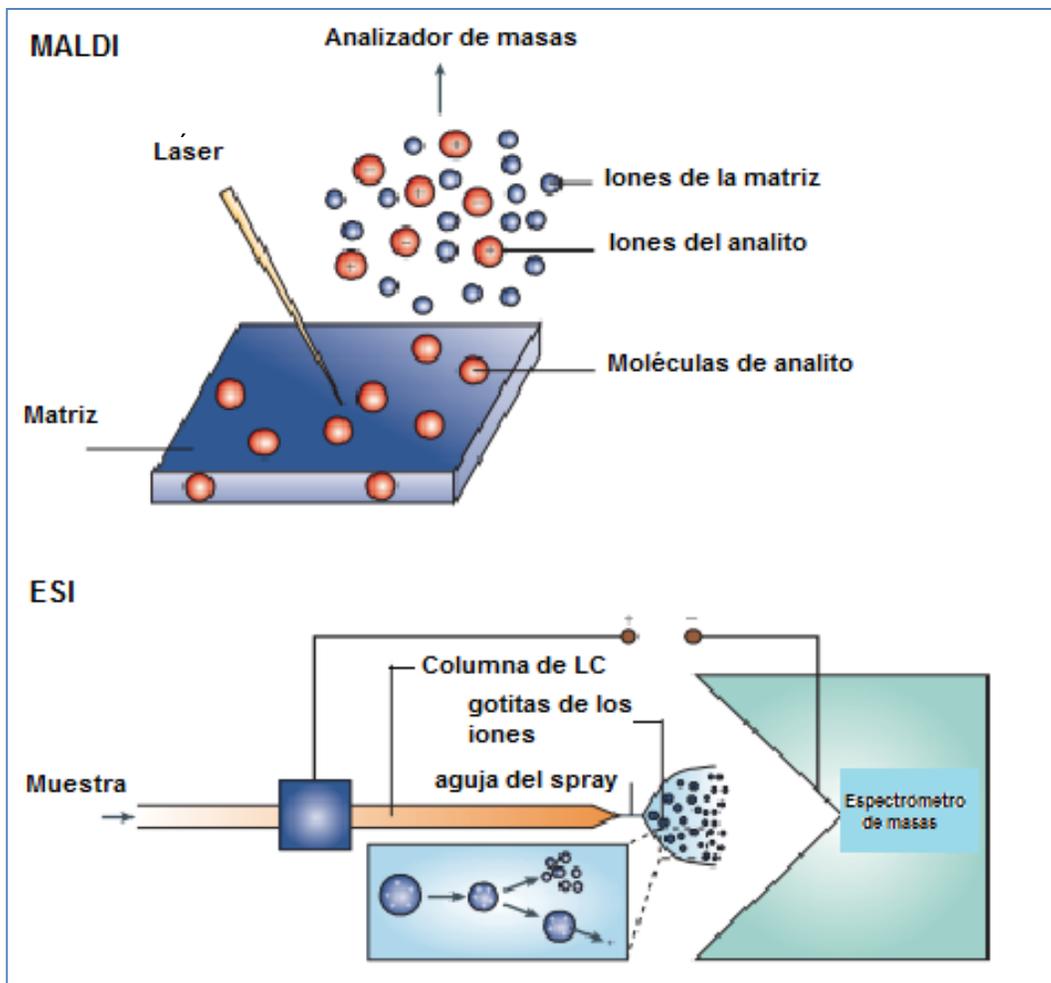


Figura 5. Métodos de ionización en espectrometría de masas (empleados en estudios proteómicos). En MALDI la irradiación con láser provoca la sublimación y transferencia de las moléculas del analito a la fase gaseosa. En ESI, el analito es sometido a un alto potencial eléctrico, lo que genera pequeñas gotas altamente cargadas (Steen y Mann, 2004) (Modificado de Steen y Mann, 2004).

Otros métodos de ionización son los siguientes: ionización por impacto de electrones (EI), y ionización por bombardeo de átomos rápidos (FAB) (Barber y col., 1982, Griffiths. 2008).

El analizador de masas es el responsable de separar los iones en base a su valor de m/z (Lin y col., 2003). Entre los analizadores más comunes podemos mencionar los siguientes:

- Tiempo de vuelo o TOF (time of flight): En este analizador los iones son acelerados gracias a potenciales eléctricos, los iones son diferencialmente separados por el

tiempo que tardan en recorrer un tubo (tubo de vuelo). El valor m/z puede ser calculado a partir del tiempo requerido para que un ion se mueva desde la fuente de iones hacia el detector.

- Trampa de iones tridimensional o trampa de Paul o IT (ion trap): La trampa de iones es operada al aplicar un potencial sinusoidal (a una frecuencia determinada) al electrodo circular, mientras que los de los extremos se mantienen constantes (frecuentemente en cero), o mantenidos a un potencial oscilante. La variedad de potenciales posibles que pueden aplicarse a los electrodos de los extremos permite atrapar los iones dentro de un rango m/z específico.
- Trampa de iones lineal o LIT (linear ion trap): también se conoce como triple cuadrupolo, es este analizador, los iones se capturan en una primera sección de cuadrupolos, a continuación se excitan por medio de un campo eléctrico, en este proceso se obtienen fragmentos del ion precursor, obteniendo un espectro de masas de dichos fragmentos.
- Cuadrupolo (Q): El analizador cuadrupolo utiliza voltajes de radiofrecuencias aplicados a cuatro varillas de metal, los iones son acelerados dentro del espacio central formado por el cuadrupolo hacia el detector.
- FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance): Resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier). El arreglo estándar para el analizador FT-ICR, es una trampa de iones localizada dentro de un campo magnético, este campo magnético obliga a los iones a circular en una órbita. **(Aebersold y Mann, 2003; Lin y col., 2003).**

En la actualidad, debido al desarrollo de la espectrometría de masas, existen en el mercado espectrómetros de masas con más de un analizador de iones, a veces son llamados espectrómetros híbridos, estos equipos mejoran la exactitud y sensibilidad en el análisis por espectrometría de masas. En la figura 6 se muestran algunas de la configuraciones de espectrómetros de masas.

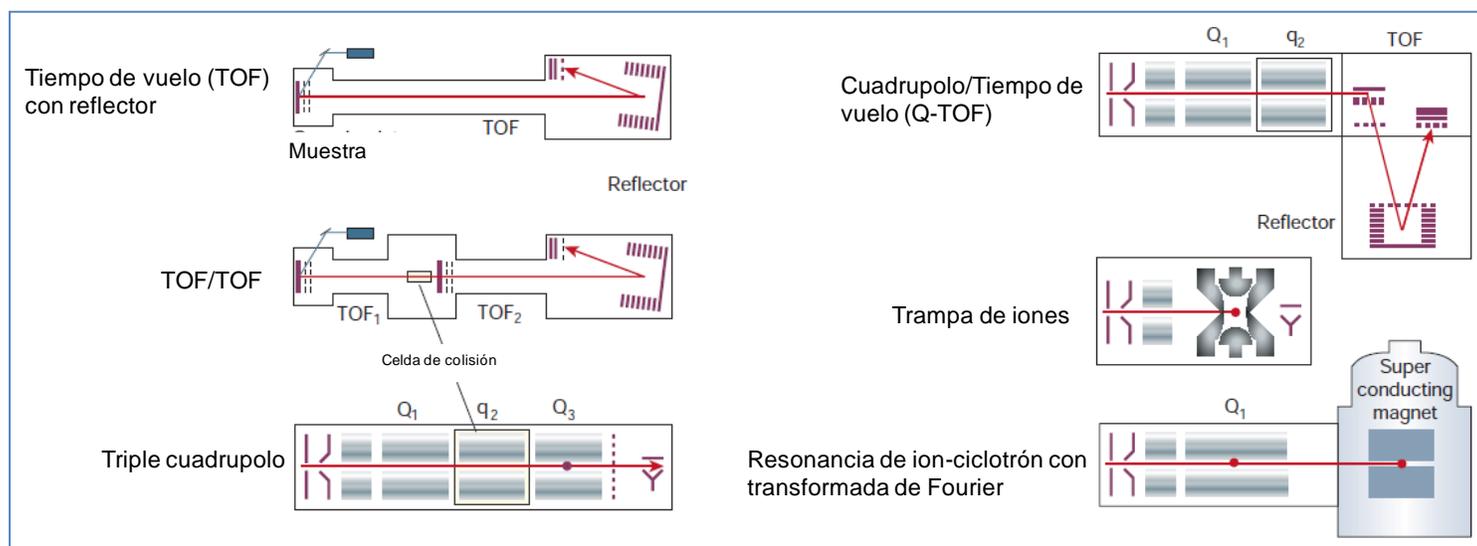


Figura 6. Algunas configuraciones de analizadores empleados en espectrómetros de masas (Modificado de Aebersold y Mann, 2003).

Los espectrómetros de masas híbridos (con más de un analizador), dada su mayor sensibilidad y exactitud son con frecuencia los más socorridos para en análisis por espectrometría de masas en los que se requiere procesos de fragmentación de la molécula/biomolécula, esto es lo que se conoce con el termino MS/MS, o tándem MS/MS (Griffiths W y Wang, 2009).

Uno de los espectrómetros de masas híbridos más utilizados en proteómica y metabolómica es el LTQ-Orbitrap (Thermo), este espectrómetro de masas combina la tecnología de trampa iónica con (LTQ y XL) con el analizador de masas Orbitrap, este instrumento cuenta con una celda de colisión múltiple (CID, HCD) lo que proporciona información estructural de las moléculas (Makarov y col., 2006).

El patrón de fragmentación observado en un espectro de masas puede proporcionar información estructural sobre el ion fragmentado, con los fragmentos obtenidos se deduce la estructura de la molécula, dado que la rotura de la molécula ocurre en los

puntos más débiles de esta (sin embargo en algunos casos, al aplicar altas energías se pueden romper enlaces fuertes como C-C). La separación de un ion y la obtención del espectro de fragmentación pueden ser altamente informativas para el seguimiento de grupos funcionales de un metabolito (**Moco y Vervoort, 2007**). En los espectrómetros de masas modernos, la fragmentación puede ocurrir por diferentes técnicas entre las cuales podemos mencionar las siguientes:

- CID (*collision induced dissociation*), también llamada CAD (*collisionary activated dissociation*). En esta técnica, la fragmentación del ion precursor se lleva a cabo en una celda de colisión presente en los espectrómetros de masas, por lo general híbridos (con más de un analizador), en dicha celda se encuentra un gas a alta presión como Ar, He, N₂, etc. El ion precursor se somete a repetidas colisiones con el gas de colisión hasta que se obtienen un patrón de iones de fragmentación. Utiliza altas y bajas energías, las reacciones de fragmentación a altas energías son las que dan mayor información sobre la estructura de la molécula. Actualmente, y debido a los nuevos espectrómetros de masas, este procedimiento de fragmentación es el más empleado en el análisis de metabolitos y proteínas cuando se emplean procesos de fragmentación (**Griffiths y Wang, 2008**).
- IRMPD (*infrared multiphoton dissociation*): la fragmentación se lleva a cabo al hacer pasar un láser de infrarrojo a través de una ventana en la cámara al vacío de un espectrómetro de masas, el ion precursor absorbe fotones hasta que se divide dando un patrón de fragmentación, es usado en espectrómetros de masas del tipo FT-ICR (**Fridgen y McMahon, 2005**).
- ECD (*electron capture dissociation*): originalmente diseñado para la fragmentación de péptidos y proteínas. En este método, péptidos o proteínas protonadas son confinadas en una trampa de Penning de espectrómetros del tipo FT-ICR y expuestas a electrones, la captura de un electrón “térmico” es exotérmica, causando la fragmentación del péptido (**Syka y col., 2004**).
- ETD (*Electron Transfer Dissociation*): resulta de transferencia de un electrón, el cual reacciona con péptidos cargados positivamente seguido por una rápida neutralización del sitio cargado por un electrón que conduce a la generación de un radical, lo que a su vez induce la disociación en el enlace N-C α , este tipo de

fragmentación es ampliamente utilizado en la identificación de modificaciones postraduccionales de proteínas **(Kim M y Pandey, 2012)**.

- **2.4.1. Fragmentación de péptidos y proteínas.**

Actualmente, la espectrometría de masas es una herramienta versátil e imprescindible en el análisis proteómico, ya que con ésta es posible identificar y obtener la estructura primaria de las proteínas, así como sus modificaciones postraduccionales **(Jensen, 2006)**. Existen dos caminos para la identificación de una proteína, el primero se conoce como identificación por huella peptídica (*mass fingerprint*), el proceso es el siguiente, una muestra de proteína, generalmente proveniente de una separación por cromatografía líquida o electroforética, ya sea por electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) o por geles bidimensionales (2D-PAGE) se digiere con una proteasa específica (generalmente tripsina), después de algunos pasos de lavado y concentración, los péptidos resultantes son llevados al espectrómetro de masas (para esta metodología se usa principalmente un equipo de MALDI-TOF). Las masas obtenidas son ahora comparadas con las masas teóricas de los péptidos de proteínas guardadas en las bases de datos, esta lista de masas moleculares es sometida a programas de análisis proteómico (PROSPECTOR, MASCOT, PROFOUND, etc.). Las proteínas anotadas en las bases de datos son digeridas *in silico* y comparadas con los datos experimentales. A pesar de ser una metodología rápida y segura, tiene el inconveniente de que las proteínas analizadas tienen que provenir de genomas secuenciados **(Thiede y col., 2005)**, es por ello que a menudo se prefiere el segundo camino en el análisis, el cual consiste en obtener espectros de fragmentación de los péptidos resultantes de la digestión, esto ahora arroja datos de secuencia de residuos de aminoácidos. De hecho, la espectrometría de masas ha desplazado a la degradación de Edman, antigua técnica de secuenciación de proteínas **(Steen y Mann, 2004)**.

Casi en su mayoría, la fragmentación de proteínas se da en sistemas de ionización del tipo MALDI y ESI, con sistemas de ionización Cuadropolos (Q), TOF/TOF, Triple Q, Q/TOF, se prefieren espectrómetros híbridos ya que con estos se logra la

fragmentación de los péptidos, los procesos de fragmentación generalmente se realizan por CID. **(Steen y Mann, 2004)**.

Cuando un péptido (proveniente de una proteína a la cual se le realizó una digestión enzimática) es sometido a fragmentación se obtiene como resultado una serie de iones del tipo *a*, *b*, *c*, *x*, *y*, *z*, los iones fragmento que contienen el amino terminal original son los del tipo *a*, *b* y *c*, mientras que los del C-terminal son los del tipo *x*, *y*, *z* **(Peng y Gygi, 2001; Ma y Johnson, 2012)** en la figura 7 se aprecia el patrón de fragmentación de un péptido.

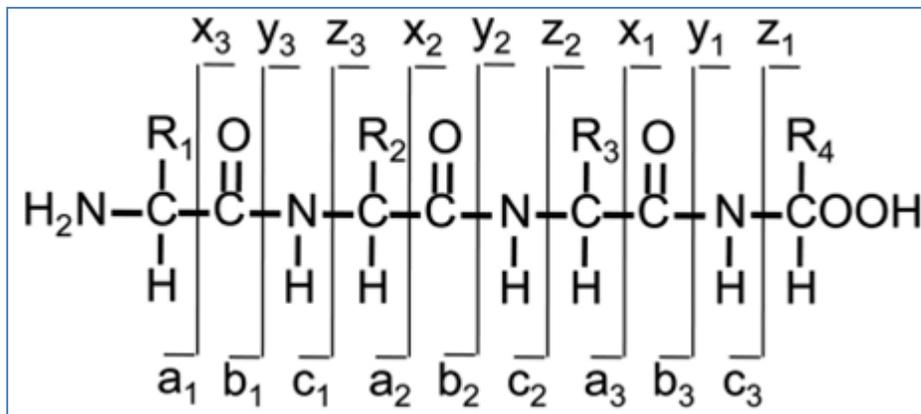


Figura 7. Fragmentación de un péptido, resultando en lo iones *a*, *b*, *c*, *x*, *y*, *z*.

A condiciones de baja energía, los iones mayoritarios son los del tipo *b*, *y*, los cuales representan la rotura del enlace peptídico **(Peng y Gygi, 2001)**, estas reacciones son comunes en espectrómetros del tipo MALDI TOF/TOF.

2.5. Métodos de análisis proteómico.

2.5.1. 2D-PAGE.

La electroforesis bidimensional es una de las técnicas estándar en los estudios proteómicos, esta técnica se basa en la separación por punto isoeléctrico de una mezcla de proteínas, seguido de una separación por peso molecular (SDS-PAGE)

(Gygi y col., 2000, Rabilloud y col., 2010, Rabilloud y Lelong, 2011), esta técnica se acopla fácilmente a espectrometría de masas para la identificación de los *puntos* (puntos) seleccionados (Gygi y col., 2000). Una de las características de la 2D-PAGE radica en mantener solubilizada la muestra de proteínas, por lo cual es común adicionar a la mezcla de proteínas distintos compuestos caotrópicos y detergentes, esto con el fin de desnaturalizar y mantener soluble la mayor parte de las proteínas de una mezcla (Rabilloud y Lelong, 2011). Entre los métodos de visualización de proteínas en la 2D-PAGE se encuentran el azul de Coomassie, método basados en fluorescencia y tinción con plata (Rabilloud y col., 2010). Se han reportado varias limitantes de esta técnica, por ejemplo, la dificultad de solubilizar proteínas de membrana, la casi nula identificación de proteínas de baja abundancia y complicaciones con la reproducibilidad del método (Rabilloud y Lelong, 2011).

2.5.2. 2D-DIGE.

La Electroforesis Bidimensional Diferencial en Gel (2D-DIGE), es una variante de la 2D-PAGE común, en la cual las proteínas de diferentes condiciones son marcadas con distintos fluorocromos (Cy2, Cy3 y Cy5), lo que permite separar simultáneamente dos condiciones diferentes en un único gel y por consiguiente reducir la variación gel a gel del experimento al reducir el número de geles totales (Marouga y col., 2005), esta técnica permite la incorporación de un estándar interno, lo que permite la identificación de pequeñas variaciones de abundancia de proteínas entre las diferentes condiciones (Alban y col., 2003).

2.5.3. Métodos proteómicos basados en cromatografía de líquidos acoplados a espectrometría de masas (LC-MS).

Una de las técnicas que permite la separación de mezclas complejas de péptidos y su análisis por espectrometría de masas es la cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas (LC-MS y LC-MS/MS: *liquid chromatography-mass spectrometry*), la cual ha surgido como la técnica de elección para los estudios de proteínas en gran escala, debido a su alto rendimiento y mayor sensibilidad (Zhang

y col., 2010). Esta técnica llamada "*Shotgun proteomics*" (llamada así por analogía de "*shotgun genomic sequencing*"), consiste en los siguientes pasos: extracción de proteínas, digestión enzimática, separación cromatográfica y análisis por espectrometría de masas en "tandem" (MS/MS) **(Li y col., 2010)**. Existe una variante de esta técnica llamada "tecnología multidimensional de identificación de proteínas" (*MudPIT*), esta técnica se basa en la separación de los péptidos por cromatografía bidimensional, para lo cual se emplean columnas microcapilares empacadas con materiales que permiten una separación basada en intercambio catiónico y fase reversa (en serie dentro de la misma columna) acopladas a HPLC y MS/MS **(Florens y Washburn, 2006)**.

Una alternativa que ha sido utilizada, es la combinación de la SDS-PAGE y LC-MS/MS, lo que permite un fraccionamiento previo a la LC-MS/MS, esta técnica básicamente consiste en la separación por peso molecular de las proteínas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie para posteriormente cortar o dividir cada una de la líneas (carriles) en 20-30 bandas y digerir las proteínas de cada una de estas, posteriormente los péptidos son separados y analizados por LC-MS/MS **(Griffiths y Wang 2009)**.

Para la cuantificación relativa de proteínas de diferentes condiciones se han implementado técnicas basadas en marcajes isotópicos, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- ICAT ("*isotope-coded affinity tag*"), esta técnica se basa en el marcaje de dos muestras de proteínas (dos condiciones experimentales) con el reactivo ICAT (pesado o ligero: Hidrógeno o Deuterio), el cual consiste en un etiqueta para la purificación por cromatografía de afinidad (biotina), y un grupo tiol (el cual reacciona con las cisteínas de la proteínas para la unión a estas). La técnica consiste en el tratamiento de dos muestras de proteína con el reactivo de ICAT (ligero y pesado respectivamente), posteriormente las muestras son combinadas y proteolizadas, los péptidos resultantes son purificados mediante la etiqueta (biotina), estos péptidos son analizados por LC-MS/MS. La cuantificación se lleva a cabo por la diferencia de 8Da de cada uno de los pares de péptidos de las muestras **(Gygi y col., 1999)**.

- ITRAQ ("*isobaric tags for relative and absolute quantification*"). Esta técnica permite la identificación y cuantificación de proteínas de 4 y 8 diferentes muestras a comparar, los reactivos ITRAQ tienen la misma masa, pero al fragmentarse se generan de diferente masa, la cual es detectada y cuantificada por MS/MS. En esta técnica el marcaje se genera sobre los péptidos resultantes de la digestión **(Evans y col., 2012, Chahrour, 2015)**.
- SILAC ("*Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*"). Se basa en la incorporación metabólica *in vivo* de dos formas de aminoácidos (ligero y pesado, por ejemplo: $^{12}\text{C}_6$ -Arginina y $^{13}\text{C}_6$ -Arginina). En un experimento de SILAC se hacen crecer dos cultivos celulares en el mismo medio pero cada uno suplementado con un aminoácido ligero y pesado respectivamente, estos aminoácidos formaran parte de las proteínas de las células en los cultivos. La identificación se lleva a cabo por LC-MS/MS **(Steen y Mann, 2004)**.

Cuando el análisis por LC-MS/MS no emplea marcaje se suele usar el término "*Label Free*", esta técnica ha desplazado a las técnicas de marcaje (ICAT, ITRAQ, SILAC), dada la facilidad del procedimiento, ya que además de ser libre de marcaje, también puede ser libre de electroforesis ("*gel free*") **(Evans y col., 2012)**.

2.5.4. Proteómica aplicada a hongos filamentosos

La investigación en proteómica de hongos, especialmente la de hongos filamentosos ha progresado drásticamente en los últimos años, lo que se debe en gran medida a la disponibilidad de múltiples secuencias de genomas y al desarrollo de potentes tecnologías analíticas en el estudio proteómico, como lo es la MS y especialmente la LC-MS/MS. La proteómica aplicada a hongos filamentosos ha sido de gran ayuda en el estudio de infecciones por hongos oportunistas, de hongos fitopatógenos y de hongos con potencial biotecnológico **(Doyle, 2011)**.

En el caso de hongos empleados en procesos biotecnológicos, la proteómica puede ser de gran ayuda en la identificación de enzimas involucradas en la producción de micotoxinas, antibióticos y otros metabolitos secundarios, así como en la caracterización de proteínas extracelulares usadas en procesos biotecnológicos **(de**

Oliveira y de Graaff, 2011). A continuación se mencionan algunos ejemplos de estudios proteómicos en hongos filamentosos.

Cuando *Aspergillus oryzae* es cultivado en medio sólido y en condiciones de cultivo sumergido, muestra un patrón de producción de proteínas extracelulares (secretoma) diferente en los dos tipos de cultivo, sin importar la composición del medio. En este análisis de secretoma se encontró una xilanasas que era producida en los dos tipos de cultivo; sin embargo, también se encontró una glucoamilasa que sólo era detectada en cultivo sólido (**Oda y col., 2006**). **Gautman y col. (2008)** utilizaron la técnica 2D-PAGE para identificar las proteínas de *Aspergillus fumigatus* cuando este hongo crece en presencia del fármaco antifúngico anfotericina B: dos de las proteínas más abundantes en el cultivo con el fármaco son la proteína inhibidora de la disociación Rho-GDP y la proteína secretora de Rho-GDP, por lo que estas proteínas pueden ser potenciales dianas para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos.

Con el fin de identificar las proteínas implicadas en la germinación de conidios en *Aspergillus nidulans*, **Oh y col. (2010)** reportaron, mediante 2D-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF, 241 proteínas, de las cuales 57 fueron identificadas por MALDI-TOF-MS. 21 proteínas se asociaron con metabolismo energético, 13 con síntesis de proteínas, seis con el plegamiento de proteínas y ocho se vincularon con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (incluidas una catalasa, una tiorredoxina reductasa y una peroxirredoxina mitocondrial).

Jami y col. (2010) desarrollaron y optimizaron un método para el análisis proteómico mediante la técnica de 2D-PAGE de las proteínas intracelulares de tres cepas del hongo *P. chrysogenum* (NRRL-1951, Wis 54-1255 y la cepa AS-P-78, de alta producción de penicilina). Estos autores reportan los cambios en los perfiles de proteínas durante el mejoramiento de cepas para la producción industrial. En este estudio se observaron cambios en las enzimas implicadas en la biosíntesis de cisteína (la cual es un precursor de la penicilina), además de un aumento en la

producción de enzimas de la ruta de las pentosas-fosfato, una reducción de proteínas involucradas en la virulencia y en la biosíntesis de otros metabolitos secundarios (pigmentos e isoflavonoides). En la cepa silvestre (NRR-1951) se caracterizaron enzimas para utilizar celulosa, sorbitol y otras fuentes de carbono, enzimas cuyo nivel se ha reducido en las cepas de alta producción de antibiótico.

2.5.5. Proteómica comparativa.

La delección de genes ha sido una estrategia muy utilizada en el análisis y caracterización de la función de varios genes, el análisis comparativo de fenotipos tras la exposición a diversos factores ambientales de cepas silvestres y mutantes facilita la identificación de las consecuencias bioquímicas que ocurren tras la delección de determinados genes. El análisis de proteómica comparativa de cepas silvestres y mutantes se ha desarrollado recientemente **(Doyle, 2011)**.

En *Aspergillus nidulans*, la delección del gen de la glutatión-reductasa (*glrA*) da como resultado una reducción en la resistencia al estrés oxidativo y una disminución en los niveles de glutatión intracelular. Un análisis proteómico permitió la identificación de más de 600 proteínas provenientes de la cepa silvestre y de la cepa con la delección de dicho gen ($\Delta glrA$); el análisis comparativo de las imágenes 2D-PAGE mostraron un incremento de la expresión de varias proteínas en la cepa $\Delta glrA$ **(Doyle, 2011)**.

Una cepa mutante de *Aspergillus fumigatus*, que sobreexpresa el gen que codifica la subunidad catalítica de una proteína cinasa dependiente de AMPc (PkaC1), mostró altos niveles de actividad de la enzima PKA, reducción del crecimiento y esporulación, así como la formación de un pigmento oscuro en el micelio. El análisis comparativo del proteoma de la cepa mutante y la cepa parental llevó a la identificación de proteínas reguladas por la vía de señalización mediada por AMPc-PKA; en este estudio se observó que niveles elevados de actividad cinasa traen como resultado una activación en proteínas asociadas al estrés y enzimas involucradas en la biosíntesis de proteínas y en el catabolismo de la glucosa **(Grosse y col., 2008)**.

2.6. Fosfoproteómica

La fosforilación es una modificación post-traducciona reversible, que juega un papel crucial en cascadas de señalización controlando muy diversas respuestas biológicas, tales como el crecimiento y la diferenciación celular. La fosforilación puede afectar la función de las proteínas de distintas maneras, al incrementar o reducir su actividad en la translocación entre compartimientos subcelulares, iniciando o bloqueando la interacción proteína-proteína o afectando la estabilización en rutas de señalización celular **(Yan y col., 2011)**.

La fosforilación y desfosforilación de proteínas está regulada por una actividad equilibrada de proteínas cinasas y fosfatasas **(Hjerrild y Gammeltoft, 2006)**. En células eucariotas la fosforilación ocurre predominantemente en residuos de serina, treonina y tirosina, sin embargo también puede ocurrir en residuos de histidina **(Mithoe y Menke, 2011)**. La fosfoproteómica es una rama de la proteómica que se encarga de identificar las proteínas y péptidos fosforilados, la determinación de los sitios fosforilados y la cuantificación del nivel de fosforilación. Para los estudios fosfoproteómicos no es posible utilizar una metodología en general, sino que es necesario explorar un amplio rango de metodologías **(Tichy y col., 2011)**.

2.6.1. Metodologías empleadas en estudios fosfoproteómicos.

Las fosfoproteínas pueden ser visualizadas por técnicas como Western blotting, usando anticuerpos contra residuos de fosfoserina (anti-pSer), fosfotreonina (anti-pTre) y fosfotirosina (anti-pTir) **(Kaufmman y col., 2001)**. Las bandas de proteínas pueden ser cortadas del gel y ser analizadas por MS. Las fosfoproteínas separadas electroforéticamente pueden ser visualizadas usando tinciones específicas como *Pro-Q-Diamond*, aunque esta metodología es más eficiente en conjunción con *SYPRO-Ruby*, colorante que tiñe todas las proteínas que pueden ser separadas por 2D-PAGE. Una alternativa más sensible que las anteriores es el uso de autorradiografía de fosfoproteínas, que pueden ser marcadas radiactivamente con ^{32}P o ^{33}P y subsecuentemente visualizadas **(Tichy y col., 2011)**.

Uno de los problemas en la identificación de fosfopéptidos por MS es la presencia de péptidos no fosforilados. La causa de este problema radica en la baja eficiencia

de ionización de los fosfopéptidos en comparación con los no fosforilados, lo que resulta en baja intensidad de señal en MS. Un incremento en la sensibilidad de MS se puede obtener con el enriquecimiento de fosfoproteínas o fosfopéptidos (**Kosako y Nagano, 2011**). A continuación se describen brevemente algunas de las técnicas de enriquecimiento de fosfoproteínas/fosfopéptidos para su posterior análisis por MS/MS.

- Inmunoprecipitación. Las fosfoproteínas pueden ser enriquecidas a partir de extractos crudos enzimáticos utilizando anticuerpos fosfo-específicos. anti-pTir, anti-pTre y anti-pSer. Estos anticuerpos se han empleado satisfactoriamente en la inmunoprecipitación de fosfoproteínas antes del análisis por MS (**Hjerrild y Gammeltoft, 2006**).
- Cromatografía de afinidad basada en matrices de óxido de metal (MOAC, *metal oxide affinity chromatography*). Esta es una técnica de alta especificidad para el enriquecimiento de fosfopéptidos. En este tipo de cromatografía se ha empleado TiO_2 y ZrO_2 , siendo el TiO_2 el más reproducible y selectivo para fosfopéptidos (**Tichy y col., 2011**).
- Cromatografía de iones metálicos inmovilizados o de afinidad metal-ion inmovilizada (IMAC, *Immobilized metal Ion chromatography*). Iones metálicos como Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} y Co^{3+} son quelados con ácido nitrilotriacético o ácido iminodiacético y las cargas negativas de los grupos fosfato de las fosfoproteínas son adsorbidas en la fase estacionaria. Esta es una de las técnicas más empleadas, a pesar del inconveniente de la unión inespecífica de péptidos que contienen aminoácidos ácidos (**Tichy y col., 2011**).

Los métodos basados en MS, incluyendo MALDI-TOF, ESI-TOF y LC-MS/MS, son de mucha utilidad en el análisis fosfoproteómico (**Hjerrild y Gammeltoft, 2006**). Una técnica versátil y de mayor resolución, que combina el marcaje con isótopos y MS, es el marcaje de aminoácidos con isótopos estables en células en cultivo (SILAC), sin embargo el método de "*Label free*" resulta muy atractivo en los estudios de fosfoproteómica dada su alta capacidad de analizar grandes cantidades de muestra y de condiciones experimentales (**Kauko y col., 2015**).

3. JUSTIFICACIÓN

Los antibióticos β -láctamicos son uno de los medicamentos más comunes en el mundo, y la penicilina sigue siendo un antibiótico de primera elección en el tratamiento de muchas infecciones bacterianas. El hongo filamentoso *P. chrysogenum* tiene una gran importancia en la industria biotecnológica, ya que de él se obtiene el antibiótico penicilina. *P. chrysogenum* se utiliza también para la producción de precursores de otro gran grupo de antibióticos β -láctamicos como son las cefalosporinas (Veiga et al. 2012). Además, dentro del campo de la minería genómica, en pleno desarrollo actualmente, *P. chrysogenum* es una de las especies candidatas para la expresión heteróloga de clusters del metabolismo secundario y la producción de metabolitos de interés.

Conocer los parámetros bioquímicos que influyen en la síntesis de penicilina y otros metabolitos secundarios es imprescindible para mejorar la producción industrial de penicilina, precursores de cefalosporina y eventualmente otros metabolitos secundarios de origen heterólogo. Igualmente, el conocimiento de la regulación de los procesos morfológicos y fisiológicos del hongo es de gran importancia para la optimización de su desempeño en procesos industriales.

La subunidad $G\alpha$ Pga1 de una proteína G heterotrimérica de *P. chrysogenum* regula la conidiación y otros procesos morfológicos y fisiológicos, como la resistencia a diferentes tipos de estrés. Asimismo Pga1 tiene un papel en la regulación de la biosíntesis de penicilina y otros metabolitos secundarios. La caracterización de la vía de señalización mediada por Pga1 aportará por tanto importante información sobre cómo el hongo regula los mencionados procesos, para ello hemos utilizado el análisis proteómico para la identificación de efectores que participen en esta importante vía de señalización.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Identificar nuevos efectores de las vías de señalización mediadas por la subunidad G α Pga1 de *Penicillium chrysogenum* que participen en los procesos celulares regulados por dicha vía.

4.2. Objetivos particulares.

- Analizar los cambios de abundancia de proteínas en las cepas con diferentes niveles de actividad e Pga1 mediante la técnica 2D-DIGE
- Analizar el efecto del incremento de los niveles de AMPc intracelular en los patrones de abundancia de las proteínas.
- Estudiar la fosforilación de proteínas de las cepas de *P. chrysogenum* y el efecto de Pga1 en la fosforilación, mediante la técnica 2D-DIGE y *Label free*.
- Establecer un modelo de las vías de señalización mediadas por Pga1 distinguiendo entre las que son dependientes e independientes de AMPc

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos.

Se utilizaron las cepas de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (cepa empleada para la secuenciación del genoma, cepa control), G42Rpyr-T (cepa con activación constitutiva de Pga1), $\Delta pga1$ (cepa con la delección del gen *pga1*) y $\Delta pga1+AMPc$ (cepa con niveles intracelulares de AMPc aumentados), la tabla 1 muestra las cepas empleadas en el presente estudio.

Tabla 1. Cepas y condiciones empleadas en el estudio proteómico de los diferentes niveles de actividad de G α Pga1

Cepa/condición	Genotipo/función de Pga1	Referencia
Wis 54-1255	Cepa silvestre (función normal de G α Pga1)	ATCC 28089
PgaG42Rpyr-T	<i>pga1</i> ^{G42R} , Subunidad G α Pga1 constitutivamente activa	García-Rico y col., 2008a
$\Delta pga1$	Gen <i>pga1</i> delecionado, ausencia de G α Pga1	García-Rico y col., 2008b
$\Delta pga1 + AMPc$	Gen <i>pga1</i> delecionado, ausencia de Pga1 (niveles de AMPc intracelulares incrementados)	García-Rico y col., 2008b

5.2. Obtención de esporas.

Las cepas de *P. chrysogenum* fueron propagadas en medio sólido Power a 28 °C, los conidios se colectaron mediante agitación mecánica con una solución de tween 80 (0.01% v/v) para obtener una concentración final de 10⁷ esporas/mL. La composición del medio es la siguiente (g/L): sacarosa 25, lactosa 5, peptona 2.5, sólidos de maceración de maíz 0.5, KCl 2, NaCl 2, NaNO₃ 1.5, K₂HPO₄ 0.25, MgSO₄ 0.25, sales del medio Power 1 mL. Sales del medio Power (g/L): KH₂PO₄ 6, FeSO₄ 1, FeCl₃ 0.4, CuSO₄ 0.2.

5.3. Condiciones de cultivo.

El medio PMMY fue utilizado para la obtención de biomasa de *P. chrysogenum* en cultivo sumergido. La composición del medio es la siguiente (g/L): glucosa 40, NaNO₃ 3, extracto de levadura 2, NaCl 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01. Los cultivos fueron incubados durante 72 h a 250 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de 50 mL del medio e inoculados con 10⁷ esporas/mL, a 25°C. El micelio fue separado del medio líquido por filtración, lavado con una solución de NaCl 0.9% (p/v) y almacenado a -70 °C.

5.4. Ensayos de inducción de AMPc.

Se usó dibutiril-AMPc (Sigma–Aldrich) para inducir altas concentraciones de AMPc en la cepa *Δpga1*. Estos compuestos fueron adicionados al medio de cultivo, tal y como se describe en lo publicado por **García-Rico y col. (2008b)**. Para la cuantificación de AMPc se utilizó el kit comercial *Direct AMPc ELISA Kit* (Enzo Life Sciences), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La absorbancia se midió en un equipo Synergy 2 Multi-Mode Reader (Biotek).

5.5. Obtención de extractos proteicos intracelulares de *P. chrysogenum*

Para la extracción de proteínas intracelulares se empleó la técnica descrita por **Jami y col. (2010)** con algunas modificaciones. Los micelios congelados se molieron en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido, dos gramos del polvo resultante fueron mezclados con 10 mL de una solución amortiguadora de fosfato potásico 10 mM pH 7.4 adicionada con 0.07 % (p/v) de 1,4-ditiotreitol (DTT) y un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Esta mezcla se agitó durante tres horas a 4 °C; el extracto proteico se clarificó por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, las proteínas se precipitaron a -20 °C durante 6 horas con una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/v) y DTT al 0.14 % (p/v) en acetona. El precipitado final se lavó dos veces con acetona al 100%, seguido de un lavado con una solución al 80% de acetona. La muestra fue solubilizada en 1 mL de solución de rehidratación/solubilización (urea 8 M, tiourea 2 M, 4% CHAPS, DTT 100 mM, 0.02 % de anfolitos; para los análisis de 2D-DIGE se omitió el DTT durante

la solubilización de las proteínas. La fracción insoluble fue descartada por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos, al sobrenadante se le cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford, de la forma que se describe a continuación.

5.6. Cuantificación de la concentración de proteína.

La determinación de proteína se realizó utilizando la técnica de microensayo (Bio-Rad, Protein Assay, Bulletin 9004), la cual se basa en trabajo reportado por **Bradford (1976)**. Para ello, 160 μ L de muestra se mezclaron con 40 μ L de reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se obtuvo mediante una curva patrón, utilizando albumina bovina como estándar.

5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Se realizaron geles unidimensionales bajo condiciones desnaturizantes, de acuerdo con la metodología descrita por **Laemmli (1970)**. El gel de concentración fue al 5% de acrilamida y el de separación al 12 %, con condiciones de voltaje constante a 150 V. La muestra se tiñó mediante la técnica de Blue Silver (**Candiano y col., 2004**).

5.8. Electroforesis en geles bidimensionales (2D-PAGE).

5.8.1 Primera dimensión (Isoelectroenfoque con tiras IPG de 7 cm).

Para llevar a cabo la 2D-PAGE, se cargó una solución que contenía 200 μ g de proteína en el amortiguador de rehidratación/solubilización (urea 8 M, tiourea 2 M, 4% CHAPS, DTT 100 mM, 0.02 % de anfolitos y 0.001% de azul de bromofenol) en tiras IPG de 7 cm (Bio-Rad) con un rango de pH de 3-10. La rehidratación se llevó a cabo a 20 °C según el siguiente programa: 12 h a 50 V (rehidratación), isoelectroenfoque: 15 min a 250 V, 2.5 h de gradiente hasta 4000 V y 12 h adicionales hasta alcanzar 15 kVh, utilizando un equipo PROTEAN® IEFCell (Bio-Rad).

5.8.2. Segunda dimensión (SDS-PAGE)

Terminado el isoelectroenfoco, las tiras de IPG fueron equilibradas dos veces durante 15 min en una solución de Tris HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, 30 % v/v de glicerol, 2 % p/v SDS, 0.002 % de azul de bromofenol y 2 % p/v de DTT. Para la segunda etapa de equilibrado, el DTT se sustituyó por 2.5% p/v de yodoacetamida. La segunda dimensión se resolvió por medio de SDS-PAGE, con una concentración de 12 % de acrilamida en la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN®Tetra Cell (Bio-Rad).

5.8.3. Tinción

Los geles fueron teñidos mediante la técnica Blue Silver (Candiano y col., 2004). Para preparar la solución de tinción (2L) se mezclaron 235 mL de una solución de ácido fosfórico con 200 mL de agua MilliQ en una botella ámbar. Con la ayuda de un agitador magnético se disolvieron completamente 200 g de una solución de sulfato de amonio, a continuación se adicionaron a la solución 2.4 g de Azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) y se mantuvo en agitación hasta observar su disolución. Posteriormente la solución se llevó al 80% del volumen final con agua MilliQ y finalmente se adicionó metanol hasta obtener el volumen final. Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron fijados en una solución de 40% de etanol y 10% de ácido acético durante 30 min, posteriormente se lavaron durante 10 min con agua MilliQ (tres veces). Finalmente. Se adiciono la solución de tinción a cada uno de los geles y se dejó con agitación baja durante toda una noche. Los geles se destiñeron con agua MilliQ antes de su digitalización.

5.8.4. Digitalización de las imágenes de los 2D-PAGE.

Un total de seis geles obtenidos de tres muestras biológicas de cada una de las cepas (dos geles por muestra) fueron analizados. Para ello las imágenes de los geles fueron capturadas usando el equipo ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad), digitalizadas y corregidas mediante el programa Quantity One ® (Bio-Rad).

5.8.5. Análisis de los cambios de abundancia de proteínas

Las imágenes de 2D-PAGE fueron analizadas mediante el programa PDQuest 2-D Analysis Software (Bio-Rad) para obtener el gel “master”. Cada *spot* (punto) fue revisado manualmente para descartar posibles artefactos. El volumen de cada *punto* fue normalizado en función del volumen total de todos los *puntos* previamente validados. Las proteínas producidas diferencialmente entre las distintas cepas fueron consideradas sólo si presentaban un aumento o disminución de al menos 1.5 veces su volumen normalizado mediante una prueba de t de Student (valor $p < 0.05$), realizada con el programa NCSS (NCSS, PASS, versión 07.1.4, USA 2007).

5.8.6. Identificación de proteínas por MALDI-TOF MS (huella peptídica).

Las proteínas de interés fueron extraídas de los geles bidimensionales, posteriormente fueron colocadas en microtubos de 1.5 mL y lavadas dos veces con agua desionizada. Las muestras se destiñeron incubándolas dos veces durante 45 min a 37 °C en una solución de 100 mM de NH_4HCO_3 /50 % de acetonitrilo. Los fragmentos se deshidrataron incubando dos veces durante 10 min a temperatura ambiente con 100 μL de acetonitrilo, posteriormente fueron hidratados con agua milli-Q; este paso se repitió tres veces. Para la digestión de proteínas, los fragmentos fueron deshidratados dos veces durante 5 min con acetonitrilo y se secaron utilizando una centrífuga Speed-Vac durante 10 min a temperatura ambiente. Se preparó una solución de tripsina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega*) y los fragmentos fueron incubados durante 15 min con 20 μL de dicha solución, a continuación se incubaron a 37 °C durante 48 h. Después de la incubación las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en un tubo nuevo. Los péptidos se extrajeron incubando los fragmentos con 25 μL de una solución de 50% de acetonitrilo/0.1% de ácido trifluoroacético, a continuación se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 s; el sobrenadante se juntó con el anterior (este paso se repitió tres veces). Los péptidos se concentraron en una centrífuga Speed-Vac hasta un volumen aproximado de 10 μL . Las muestras se lavaron y concentraron con puntas zip-tips (Millipore) hasta un volumen de 3.5 μL ,

este volumen se mezcló con 3.5 μL de la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) y posteriormente 1 μL de la solución se cargó a la placa de MALDI-TOF por duplicado. Los péptidos resultantes fueron analizados por espectrometría de masas mediante un equipo MALDI-TOF (Waters Corporation). La identificación de proteínas se realizó mediante el programa ProteinLynx (Waters).

5.9. Análisis de los cambios de abundancia de proteínas mediante la técnica 2D-DIGE.

5.9.1. Diseño del experimento de 2D-DIGE.

Par llevar a cabo la 2D-DIGE se utilizaron cuatro muestras biológicas de las cepas fúngicas anteriormente mencionadas en la tabla 1 (junto con la condición $\Delta pga1+AMPc$) y los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 (CyDye DIGE Fluors, GE Helthcare). De acuerdo al diseño del experimento que se muestra en la tabla 2, se realizaron un total de ocho geles con cambio entre Cy3 y Cy5.

Tabla 2. Diseño del experimento de 2D-DIGE para cuatro condiciones.

	Cy3 (50 μg)	Cy5 (50 μg)	Cy2 (50 μg total o 3.125 μg para cada uno)
Gel 1	W1	G1	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$
Gel 2	Δ 1	W2	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$
Gel 3	W3	Δ^*1	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$
Gel 4	Δ 2	G2	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$
Gel 5	Δ^*2	Δ 3	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$
Gel 6	G3	Δ^*3	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$
Gel 7	Δ^*4	W4	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$
Gel 8	G4	Δ 4	W1+W2+W3+W4+ Δ 1+ Δ 2+ Δ 3+ Δ 4+ $\Delta^*1+\Delta^*2+\Delta^*3+$ $\Delta^*4+G1+G2+G3+G4$

W= Wis 54-1255, Δ = $\Delta pga1$, Δ^+ = $\Delta pga1+AMPc$, G= G42Rpyr-T

De acuerdo a la tabla 2, se puede observar que para el experimento se emplearon 50 μg de proteína de cada una de las condiciones problema, las cuales fueron marcadas con Cy3 y Cy5. Este trabajo se realizó mediante el uso de un estándar interno, el cual consistió en la mezcla de cada condición (50 μg), marcado con Cy2 por lo que en cada gel se corrieron dos condiciones diferentes y un estándar interno:

muestra marcada con Cy3 + muestra marcada con Cy5 + estándar interno marcado con Cy2 (150 µg de proteína total por gel).

5.9.2. Primera dimensión 2D-DIGE (Isoelectroenfoque con tiras IPG de 17 cm)

Para llevar a cabo la 2D-DIGE con tiras IPG de 17 cm, se mezcló cada una de las soluciones de proteínas marcadas con un volumen del amortiguador de rehidratación/solubilización (urea 8 M, tiourea 2 M, 4% CHAPS, 130 mM DTT, 0.02% de anfolitos) y se cargaron en una IEF Focusing Tray (Bio-Rad). Inmediatamente después se colocaron las tiras IPG de 17 cm (Bio-Rad) con un rango de pH de 3-10. La rehidratación se llevó a cabo a 20 °C en oscuridad, siguiéndose el siguiente programa: 12 h a 50 V (rehidratación), isoelectroenfoque: 15 min a 250 V, 2.5 h de gradiente hasta 4000 V y 12 h hasta alcanzar 15 kVh, utilizando un equipo PROTEAN® IEFCell (Bio-Rad).

5.9.3. Segunda dimensión de la metodología 2D-DIGE (SDS-PAGE)

Terminado el isoelectroenfoque, las tiras de IPG fueron equilibradas dos veces durante 15 min en una solución de Tris HCl 50 mM pH 8.8, 6 M de urea, 30% v/v de glicerol, 2% p/v SDS, 0.002% de azul de bromofenol y 2% p/v de DTT. Para la segunda etapa de equilibrado, el DTT se sustituyó por 2.5% p/v de yodoacetamida. Posteriormente se llevó a cabo la separación de proteínas en la segunda dimensión mediante un equipo de electroforesis Ettan Dalt Six (GE Healthcare). Los geles se realizaron a una concentración de 12% de acrilamida y se desarrollaron durante toda una noche a 25 °C.

5.9.4. Digitalización de las imágenes de la 2D-DIGE.

La digitalización de los geles del experimento de 2D-DIGE se realizó en el equipo de escaneo Typhoon 9400 (GE Helthcare), empleando las longitudes de excitación y emisión apropiadas para cada fluorocromo (Cy2, Cy3 y Cy5).

5.9.5. Análisis de imágenes de la 2D-DIGE.

Para llevar a cabo el análisis proteómico diferencial por 2D-DIGE, se empleó el programa DeCyder 2D software v6.5 (GE Healthcare). En primer lugar se utilizó el módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) para llevar a cabo la detección y cuantificación de todos los *puntos* de las diferentes condiciones. Para comparar la abundancia de cada uno de los *puntos* entre las diferentes condiciones se empleó el módulo BVA (*Biological Variation Analysis*). Para determinar los cambios en la expresión de proteínas entre las condiciones se consideraron sólo los cambios estadísticamente significativos (Veces: ± 1.5 , ANOVA: $p\text{-value} \leq 0.05$). Los *puntos* (puntos) de interés fueron extraídos mecánicamente de los geles mediante el equipo Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare) y depositados en placas de ELISA.

5.9.6. Identificación de proteínas de la 2D-DIGE por Espectrometría de Masas.

La identificación de proteínas que presentaron cambios de abundancia en los diferentes tratamientos se realizó por la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los puntos de interés fueron lavados y desteñidos durante una noche con una solución de metanol/ácido acético (1:1), posteriormente fueron deshidratados con 100 μL de acetonitrilo durante 5 min. Se adicionó una solución de tripsina (20 ng/mL) y se incubó a 37°C durante una noche. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se recuperó, posteriormente los péptidos se purificaron mediante extracción en fase sólida (C18 Zip-Tips, Millipore). Los péptidos fueron analizados por nano LC-MS/MS en un equipo LTQ-Orbitrap (Thermo). Las muestras fueron inyectadas en una columna C18 (Symmetry C18 NanoEase Trap Column 5 μm , Waters). Los espectros MS/MS fueron analizados mediante Mascot (Matrix Science, versión 2.3.02), la búsqueda se realizó con el ID 500485 (*Penicillium chrysogenum*), la base consta de 25676 entradas. La tolerancia del fragmento del ion fue de 0.6 Da. La oxidación de metionina y la fosforilación de serina, treonina y tirosina fueron especificadas como modificaciones variables en Mascot. Se utilizó el programa Scaffold (Scaffold_4.0.5, Proteome Software Inc., Portland, OR) para hacer la validación de la identificación

de proteínas por MS/MS y se consideraron como válidas aquellas en las que la probabilidad fuera al menos del 99% y se hayan identificado al menos dos péptidos por cada proteína.

5.10. Análisis de expresión de proteínas intracelulares fosforiladas mediante la técnica 2D-DIGE.

5.10.1 Enriquecimiento de fosfoproteínas.

Las proteínas intracelulares fosforiladas de *P. chrysogenum* fueron enriquecidas por la técnica de IMAC, empleando el kit comercial de Pierce® (*Pierce Phosphoprotein Enrichment Kit*). Dos gramos de micelio pulverizado de las cepas Wis 54-1255, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1+AMPc$ y G42Rpyr-T fueron resuspendidos en 10 mL de un amortiguador tipo RIPA (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, SDS 0.05%, pH 7.4), A esta mezcla se le adicionaron un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) y uno de fosfatasas (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Pierce, Thermo Scientific), las mezclas se mantuvieron en hielo y fueron homogenizadas en vórtex durante una hora. El extracto proteico se clarificó por centrifugación a 10,000 rpm durante 20 min (Beckman J2-MI), se determinó la concentración de proteína y ésta se ajustó a una concentración de 0.5 mg/mL con el amortiguador de Lisis/Unión/Lavado provisto en el kit. Para el enriquecimiento de fosfoproteínas se siguieron los siguientes pasos:

1. Se invirtieron las columnas de IMAC con el fin de resuspender la resina. Cada columna fue acoplada a tubo cónico de 50 mL y se descartó la solución de mantenimiento mediante centrifugación a 1,000 rpm y 4°C durante 1 min.
2. Se equilibró la resina con 5 mL del amortiguador Lisis/Unión/Lavado, 0.25% CHAPS proporcionado por el kit, a continuación se centrifugó a 1,000 rpm y 4 °C durante 1 min.
3. Se colocó el tapón por debajo de la salida de la columna y se le adicionó el extracto proteico (4 mg de proteína total), se invirtieron las columnas suavemente tres veces y se colocaron en una plataforma con un movimiento suave durante 1 h a 4°C.

4. Se retiraron los tapones de cada una de las columnas y se centrifugaron a 1,000 rpm a 4 °C, durante 1 min. Se desechó la solución eluida.
5. Se lavó cada resina con la adición de 4 mL de la solución de Lisis/Unión/Lavado, 0.25% CHAPS, se centrifugaron las columnas a 1,000 rpm a 4°C, durante 1 min. Se desechó la solución eluida.
6. Se repitieron los pasos 4-5 un total de tres veces.
7. Para la elución de proteínas fosforiladas se colocó el tapón a la salida de cada una de las columnas y se adaptaron a nuevos tubos cónicos de 50 mL. Se adiciono 1 mL del amortiguador de elución, 0.25% CHAPS, provisto por el kit, posteriormente se incubaron las columnas a temperatura ambiente con agitación ocasional durante 3 min.
8. Se quitó el tapón de salida de las columnas y se centrifugaron a 1,000 rpm a 4°C durante 1 min. La solución eluida fue almacenada a 4°C (esta es la primera fracción de fosfoproteínas). Se repitieron los pasos de elución cuatro veces más, para obtener un total de cinco fracciones eluidas.
9. Se mezclaron las fracciones eluidas (5 mL total) y se procedió a concentrar y cambiar al amortiguador de rehidratación/solubilización en tubos de ultrafiltración de 10 kDa. A las muestras concentradas (aproximadamente 200 µL) se les cuantificó la concentración de proteína con el kit RC DC protein assay (Bio-Rad).

5.10.2. Diseño del experimento de 2D-DIGE con proteínas fosforiladas.

Para llevar a cabo la 2D-DIGE se utilizaron tres muestras biológicas de las cepas Wis 54-1255, *Δpga1*, G42Rpyr-T y la condición *Δpga1*+AMPc y los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 (CyDyE DIGE Fluors, GE Helthcare). De acuerdo al diseño del experimento que se muestra en la tabla 3, se realizaron un total de seis geles con cambio entre Cy3 y Cy5.

De acuerdo a la tabla 3, se puede observar que para el experimento se emplearon 50 µg de proteína de cada una de las condiciones, en este trabajo se realizó mediante el uso de un estándar interno, el cual fue la mezcla de cada condición (50 µg), por lo que en cada gel se corrieron dos condiciones diferentes y un estándar interno (150 µg de proteína total).

Tabla 3. Diseño del experimento de 2D-DIGE con fosfoproteínas para cuatro condiciones.

	Cy3 (50 µg)	Cy5 (50 µg)	Cy2 (50µg total o 3.125 µg para cada uno)
Gel 1	W1	G1	W1+W2+W3+Δ1+Δ2+Δ3+Δ*1+Δ*2+Δ*3+G1+G2+G3
Gel 2	Δ1	W2	W1+W2+W3+Δ1+Δ2+Δ3+Δ*1+Δ*2+Δ*3+G1+G2+G3
Gel 3	W3	Δ*1	W1+W2+W3+Δ1+Δ2+Δ3+Δ*1+Δ*2+Δ*3+G1+G2+G3
Gel 4	Δ2	G2	W1+W2+W3+Δ1+Δ2+Δ3+Δ*1+Δ*2+Δ*3+G1+G2+G3
Gel 5	Δ*2	Δ3	W1+W2+W3+Δ1+Δ2+Δ3+Δ*1+Δ*2+Δ*3+G1+G2+G3
Gel 6	G3	Δ*3	W1+W2+W3+Δ1+Δ2+Δ3+Δ*1+Δ*2+Δ*3+G1+G2+G3

5.10.3. Primera Dimensión de las proteínas fosforiladas (Isoelectroenfoque con tiras IPG de 17cm)

Para llevar a cabo la 2D-DIGE con tiras IPG de 17 cm, se mezcló cada una de las soluciones de proteínas marcadas con un volumen del amortiguador de rehidratación/solubilización (urea 8M, tiourea 2M, 4% CHAPS, 130mM DTT, 0.02% de anfolitos) y se cargaron en la IEF Focusing Tray (Bio-Rad), inmediatamente se colocaron las IPG strips de 17 cm (Bio-Rad) con un rango de pH de 3-10, la rehidratación se llevó a cabo a 20 °C y bajo oscuridad según el siguiente programa: 12 h 50 V (rehidratación), isoelectroenfoque: 15min. 250 V, 2.5 h de gradiente hasta 4000 V, y 12 h hasta alcanzar 15 kVh, en el equipo PROTEAN® IEFCell (Bio-Rad).

5.10.4. Segunda Dimensión (SDS-PAGE) de las proteínas fosforiladas.

Terminado el isoelectroenfoque, las tiras de IPG fueron equilibradas dos veces durante 15 min en una solución de 50 mM Tris HCl (pH 8.8), 6 M de urea, 30% v/v de glicerol, 2% p/v SDS, 0.002% de azul de bromofenol y 2% p/v de DTT. Para la segunda etapa de equilibrado, el DTT se sustituyó por 2.5% p/v de yodoacetamida. Posteriormente se llevó a cabo la separación de proteínas en la segunda dimensión mediante el equipo de electroforesis Ettan Dalt Six (GE Healthcare), los geles se realizaron a una concentración de 12% y se dejaron correr toda una noche a 25 °C.

5.10.5. Digitalización de las imágenes de la 2D-DIGE con proteínas fosforiladas.

La digitalización de los geles del experimento de 2D-DIGE con fosfoproteínas se realizó en el equipo de escaneo Ettan DIGE Imager (GE Healthcare Life Sciences) empleando las longitudes de excitación y emisión apropiadas para cada fluorocromo (Cy2, Cy3 y Cy5).

5.10.6. Análisis de imágenes de las 2D-DIGE con proteínas fosforiladas.

Para llevar a cabo el análisis de expresión de proteínas fosforiladas por 2D-DIGE, se empleó el programa DeCyder 2D software v6.5 (GE Helthcare), primero se utilizó el módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) para llevar a cabo la detección y cuantificación de todos los puntos de las diferentes condiciones, para comparar la abundancia de cada uno de los puntos entre las diferentes condiciones se empleó el módulo BVA (*Biological Variation Analysis*), para determinar los cambios en la expresión de proteínas entre las condiciones se consideraron solo los cambios estadísticamente significativos (Cambio: ± 1.5 , ANOVA: $p\text{-value} \leq 0.05$). Los puntos de interés fueron extraídos mecánicamente de los geles mediante el equipo Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare) y depositados en placas de ELISA.

5.10.7. Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas (2D-DIGE de proteínas fosforiladas).

La identificación de proteínas que presentaron cambios de abundancia entre los diferentes tratamientos se realizó por la técnica de Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS), en un equipo LTQ-Orbitrap (Thermo, San José, CA.), el procesamiento de las muestras (digestión, purificación de los péptidos y análisis por MS/MS se realizó tal y como se describe en la sección 5.9.6), se utilizó el programa Scaffold (Scaffold_4.0.5, Proteome Software Inc., Portland, OR) para hacer la validación de la identificación de proteínas por MS/MS, se consideraron como válidas aquellas en las que la probabilidad fuera al menos del 99% y se hayan identificado 2 péptidos como mínimo.

5.11. Análisis Fosfoproteómico por el método de "Label free"

Este análisis se llevó a cabo con el fin de identificar cambios en los patrones de fosforilación, así como para conocer el sitio exacto de fosforilación del fosfoproteoma de los distintos genotipos de Pga1 (cepas Wis-54-1255, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1+AMPc$).

5.11.1. Extracción de proteínas intracelulares para el análisis fosfoproteómico por "Label free"

Para la extracción se ocuparon 2 g de micelio pulverizado con nitrógeno líquido de las cepas Wis 54-1255, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1+AMPc$. El polvo obtenido fue resuspendido en 10 mL de un amortiguador 50 mM Tris-HCL, 6 M Urea, 5 mM DTT pH 7.4. A este amortiguador se le adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) y uno de fosfatasas (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Pierce, Thermo Scientific). Las mezclas se mantuvieron en hielo y fueron homogenizadas en vórtex durante una hora, el extracto proteico se clarificó por centrifugación a 10,000 rpm durante 20 min (Beckman J2-MI). Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.

Posteriormente las proteínas se precipitaron a -20 °C durante cuatro horas con una solución al 20% de ácido tricloroacético (TCA) en acetona y 0.14% de DTT. El precipitado final se lavó dos veces con acetona (100%) seguido de un lavado con una solución al 80% de acetona.

5.11.2. Digestión de proteínas y enriquecimiento de fosfopéptidos.

Las proteínas precipitadas fueron solubilizadas en un amortiguador 50 mM Tris-HCL, 6 M Urea, (pH 8). Posteriormente se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Una alícuota de 2 mg de proteína de cada una de las muestras (tres replicas por cepa) fue reducida con 10 mM de DTT a 37 °C durante 1 h. Se adicionó iodoacetamida a una concentración final de 15 mM y se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras se diluyeron con tres volúmenes de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8. Se adicionó tripsina

(Proteomics Grade, Sigma-Aldrich) en una relación de 1:60 (tripsina:proteína) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 18 h.

Los péptidos resultantes fueron desalados mediante extracción en fase sólida con columnas SPE de 50 mg (Solid Phase Extraction Cartridges "Thermo Scientific HyperSep SPE Columns"), usando el siguiente protocolo:

1. Lavar las columnas con un volumen de acetonitrilo.
2. Lavar dos veces las columnas con un volumen de 0.25% ácido trifluoroacético en agua (Milli Q).
3. Adicionar la mezcla de péptidos a las columnas, eluir las muestras con un flujo de 1 mL/min.
4. Lavar las columnas cuatro veces con un volumen de 0.25% ácido trifluoroacético en agua.
5. Eluir los péptidos desalados con un volumen de 80% acetonitrilo/0.1% ácido fórmico

Finalmente se enriquecieron los fosfopéptidos mediante el kit comercial ("Pierce™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment and Clean-up Kit"). Los fosfopéptidos resultantes fueron desalados mediante columnas de grafito (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante y a continuación secados en un equipo SpeedVac™ Concentrator (Thermo).

5.11.3. Identificación de los sitios de fosforilación por LC-MS/MS.

La identificación de los sitios de fosforilación en los fosfopéptidos se llevó a cabo mediante LC-MS/MS en un equipo LTQ-Orbitrap. Los espectros MS/MS fueron analizados con el programa Mascot (Matrix Science, London, UK; versión 2.5.1). La tolerancia del fragmento del ion fue de 0.6 Da. La oxidación de metionina y la fosforilación de serina, treonina y tirosina fueron especificadas como modificaciones variables en Mascot.

5.11.4. Validación en la identificación de proteínas y sus sitios de fosforilación por LC-MS/MS

La identificación de proteínas y sus sitios de fosforilación se validó mediante el programa Scaffold (Scaffold_4.0.5, Proteome Software Inc., Portland, OR). Para ello, se consideraron identificaciones válidas aquellas en las que la probabilidad fuera al menos del 95%.

5.11.5. Identificación in silico de sitios de fosforilación y predicción de sustratos de las diferentes cinasas.

Se identificaron los sitios de reconocimiento de cinasas presentes en los fosfopéptidos y proteínas mediante los programas NetPhos 3.1 (Blom y col., 1999) y pkaPS (Neuberger y col., 2007).

5.12. Silenciamiento de los genes Pc22g17420 y Pc22g05690.

5.12.1. Plásmido empleado para el silenciamiento de los genes.

Se empleó el plásmido pJL43-RNAi (Ullán y col., 2008), En la figura 8 se observa el mapa de dicho vector. El vector pJL43-RNAi se caracteriza por expresar un ARN de doble cadena de un fragmento del gen a silenciar. Este ARN será el sustrato para la maquinaria de la vía del RNAi que permitirá silenciar la expresión del gen (Ullán y col., 2008).

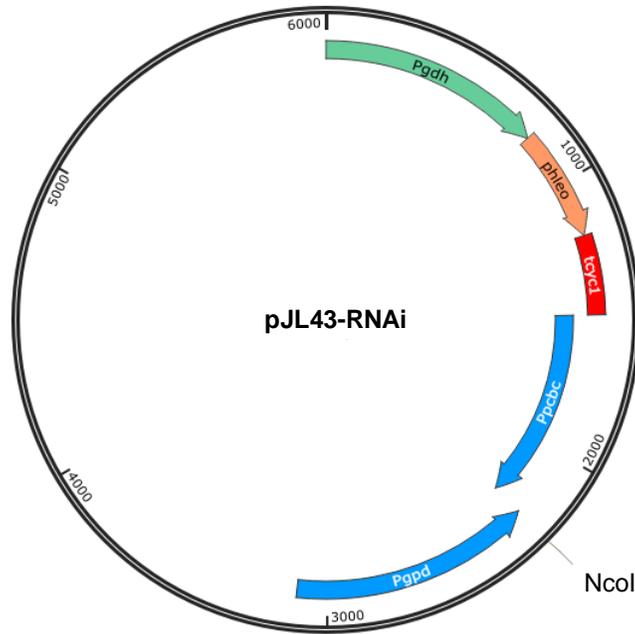


Figura 8. Mapa del plásmido pJL43-RNAi. Este vector contiene el promotor de la glutamato deshidrogenasa (*Pgdh*) de *Aspergillus awamori* acoplado al gen de resistencia a fleomicina (marcador de selección) el promotor del gen *pcb* (*Ppcb*) de *P. chrysogenum* y el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Pgd*) enfrentados en orientación opuesta (Ullán y col., 2008).

5.12.2. Extracción ADN de *P. chrysogenum*.

La extracción de ADN de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y las cepas transformantes se llevó a cabo en un equipo Mini-Beadbeater-16 cell disrupter (Biospec) el cual fue empleado para la rotura celular, posteriormente el ADN se purificó con el kit "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.12.3. PCR para la obtención de los fragmentos de los genes *Pc22g17420* y *Pc22g05690*.

Se empleó la enzima *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega) para obtener los fragmentos de los genes para clonar en el plásmido pJL43-RNAi. La tabla 4 muestra los oligos empleados para la reacción de PCR. La longitud de los fragmentos obtenidos de la PCR es de 475 pb para el gen *Pc22g17420* y de 461 pb para el gen

Pc22g05690. Los productos de PCR fueron purificados con el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences).

Tabla 4. Oligos diseñados para amplificar el fragmento de los genes clonados en el plásmido pJL43-RNAi

Gen	Oligo	Tamaño (pb)
Pc22g17420	F: 5'-TCCCATGGTCCTCATCCAGGACGAAGTCAAT-3' R:5'-AGCCATGGAACAGACCCGGAGCTAACGAGAA-3'	475
Pc22g05690	F: 5'-TCCCATGGAGAAGAAGGCTGACTCTGACAAC-3' R: 5'-AGCCATGGAACGACAGAGTGGCGAGGGTAA-3'	461

5.12.4. Digestión con *NcoI*.

El plásmido pJL43-RNAi presenta un sitio de corte único para la enzima *NcoI*, este sitio es flanqueado por los promotores *Ppcbc* y *Pgpd*, por lo que para clonar en este plásmido es necesario digerir con la enzima *NcoI*. Los oligos presentados en la tabla 4 fueron diseñados con un sitio de corte para la enzima *NcoI*, por lo que los productos de PCR fueron digeridos con dicha enzima (Takara, Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las digestiones del plásmido y de los productos de PCR fueron purificadas con el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences).

5.12.5. Ligación del plásmido pJL43-RNAi con los fragmentos de los genes *Pc22g17420* y *Pc22g05690*.

La ligación del vector con los insertos se realizó empleando la ligasa "*T4 DNA Ligase*" (ROCHE Life Science). La reacción se realizó en un volumen final de 10 µL y se incubó toda la noche a 4 °C.

5.12.6. Transformación de *Escherichia coli*.

Se empleó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , esta cepa es empleada habitualmente en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Para la transformación se siguió el siguiente protocolo:

1. Descongelar las células competentes en hielo.
2. Añadir al tubo la reacción de ligación, mantener en hielo durante 30 min.
3. Aplicar choque térmico a 42°C durante 45 s. Inmediatamente enfriar durante 1 min.
4. Añadir 400 mL de LB (Bacto triptona: 10 g/L, extracto de levadura: 5 g/L, NaCl: 5 g/L), incubar durante 1 h a 37 °C con agitación a 250 rpm.
5. Sembrar las células en placas de LB-agar, suplementadas con ampicilina (100 μ g/mL). Incubar las placas durante 16 h a 37 °C.

5.12.7. Extracción de ADN plasmídico: Minipreparación (miniprep).

Esté método se utilizó con el fin de obtener bajas cantidades de plásmido de forma rápida. Se realizó el siguiente protocolo:

1. Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular en 1 mL de medio LB + ampicilina (100 μ g/mL) en un tubo de 1.5 mL, incubar durante 12 h a 37 °C a 250 rpm.
2. Centrifugar cada uno de los tubos a 13,000 rpm durante 1 min, retirar el medio de cultivo y adicionar 200 μ L de STET (8% sacarosa; 0.5% Tritón X-100; 50 mM EDTA, pH 8; 10 mM Tris HCl, pH 8) y 3 μ L de lisozima (50 mg/mL), Resuspender el pellet en vortex.
3. Colocar los tubos en agua hirviendo durante 40 s. Centrifugar 15 minutos a 13,000 rpm y retirar con un palillo los restos celulares precipitados.
4. Adicionar 200 μ L de isopropanol y mezclar por inmersión. Dejar incubando durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min.
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 50 μ L de agua MilliQ.

5.12.8. Extracción de ADN plasmídico: Midiprep.

Para la extracción y purificación de plásmidos a media escala se utilizó el kit comercial QIAGEN® *Plasmid Midi Kit*. El protocolo se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.12.9. Transformación de *P. chrysogenum*.

Para la transformación de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 se obtuvieron y transformaron protoplastos de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Inocular las esporas provenientes de una placa de medio Power en 100 mL de medio PMMY durante 18 h a 25 °C y 250 rpm.
2. Separar el micelio por filtración (Nytal) y lavarlo con una solución de NaCl al 0.9%
3. Dos gramos de micelio se colocan en un tubo de 15 mL y se le adicionan 10 mL de amortiguador TPP (fosfato de potasio 50 mM, 0.7 M KCl) y 10 mL de una solución de enzimas líticas (Sigma-Aldrich) con una concentración de 10 mg/mL en amortiguador TPP (previamente, debe filtrarse la solución de enzimas en un filtro de 0.22 µm). Esta mezcla se pasa a un matraz de 250 mL y se incuba durante 2 h a 28 °C con una agitación de 75 rpm.
4. La suspensión anterior se filtra (Nytal) y el efluente se colecta en tubos de 15 mL, posteriormente se centrifuga a 2,000 rpm durante 5 min y el pellet se resuspende en 5 mL de amortiguador KCM (KCl 0.7 M; CaCl₂ 50 mM; MES 10 mM, pH 5.8) y se lava dos veces con el mismo amortiguador (mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 5 min). Para obtener la suspensión de protoplastos, el pellet final se resuspende en 200 µL de amortiguador KCM y 20 µL de amortiguador PCM (CaCl₂ 50 mM, polietilenglicol 6000 50%, MES 10 mM, pH 5.8).
5. Se adicionan 100 µL de la suspensión de protoplastos a un tubo de 1.5 mL y posteriormente se agregan de 5-10 µg de ADN (vector de silenciamiento purificado). En otro tubo se realiza una mezcla idéntica, pero sin ADN (control).
6. Incubar las suspensiones durante 20 min en hielo,
7. Se adicionan 500 µL de amortiguador PCM, mezclando suavemente, y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente.
8. Adicionar 600 µL de amortiguador KCM y mezclar suavemente.

9. Preparar placas con 10 mL de medio base (Czapek/Sorbitol: Sacarosa 30 g/L, NaNO₃ 2 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, sorbitol 1 M, agar 10 g/L). Posteriormente, en un tubo de 15 mL, mezclar la reacción de transformación y 10 mL de medio Czapek/Sorbitol (40-50 °C) suplementado con fleomicina (30 µg/mL) y verter sobre las placas con medio base.
10. Incubar durante 4-7 días hasta observar colonias transformantes.

5.12.10. Confirmación de transformantes de *P. chrysogenum*.

Se diseñaron oligos que hibridan en los promotores *Ppcbc* y *Pgpd* a una distancia de 97 y 115 pb del sitio *Nco*I del plásmido pJL43-RNAi (Figura 9). La reacción de PCR para confirmar los transformantes daría como resultado un tamaño aproximado de 700 pb si el ADN contiene el cassette de silenciamiento (*Ppcbc*-inserto-*Pgpd*). Para la PCR de confirmación de transformantes se empleó la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific).

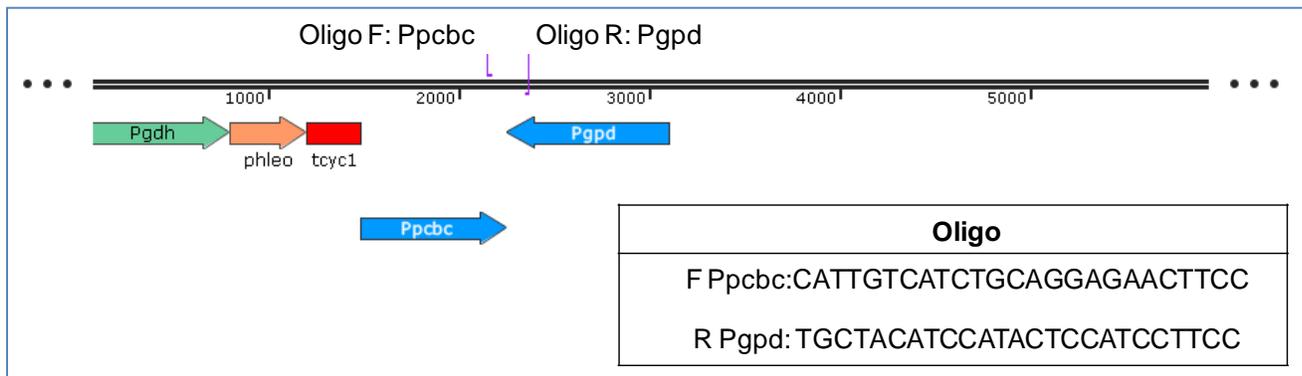


Figura 9. Ubicación de los oligos para confirmar los transformantes de *P. chrysogenum* dentro del plásmido pJL43-RNA. Se muestra la secuencia de la pareja de oligos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.

6.1. 2D-PAGE de los extractos proteicos de las cepas de *P. chrysogenum*.

Una vez comprobada la integridad de las proteínas se procedió a realizar los geles bidimensionales, obteniendo el proteoma intracelular de la cepa Wis 54-1255 (figura 10). En esta figura se aprecia una buena separación e integridad de las proteínas, observándose que la mayor parte de las proteínas se encuentra en la zona que corresponde a puntos isoeléctricos entre 4-7, estos experimentos se realizaron mediante la técnica de tinción "Blue Silver" (Candiano y col., 2004), la cual se basa en el colorante azul de Coomassie coloidal. Esta tinción tiene como ventaja una alta sensibilidad, además de la excelente compatibilidad con la espectrometría de masas en comparación a otras técnicas como la tinción de plata (Rabilloud y Lelong, 2011).

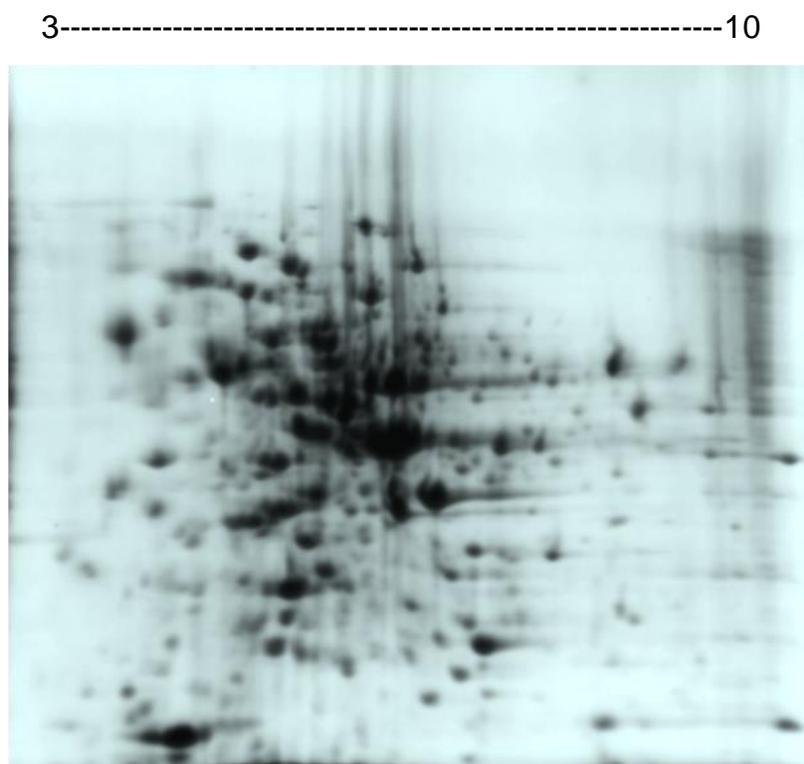


Figura 10. 2D-PAGE del proteoma intracelular de la cepa Wis 54-1255.

Con este resultado se comprobó la eficacia del amortiguador de solubiización/rehidratación para aumentar la solubilidad de proteínas, lo que probablemente se deba a componentes de la solución como la urea y tiourea, que son agentes desnaturalizantes, dando como resultado un aumento en la solubilidad de proteínas (Rabilloud y Lelong. 2011). Una solución amortiguadora similar fue utilizada por Jami y col. (2010), autores que emplearon una concentración de urea 8 M, 2% de CHAPS y 20 mM de DTT. En el presente trabajo se utilizó la misma concentración de urea, sin embargo se adicionó tiourea 2 M y se aumentó la concentración de CHAPS y DTT del 2 al 4% y de 20 mM a 100 mM, respectivamente.

6.1.1. Obtención de geles “master” mediante el programa PDQuest.

En la figura 11 y 12 se muestran los geles con los cuales se obtuvieron los geles “master” de las cepas Wis 54-1255 y $\Delta pga1$, respectivamente. Se revisaron manualmente cada uno de los *puntos*, obteniendo al final aproximadamente 200 para cada una de las cepas.

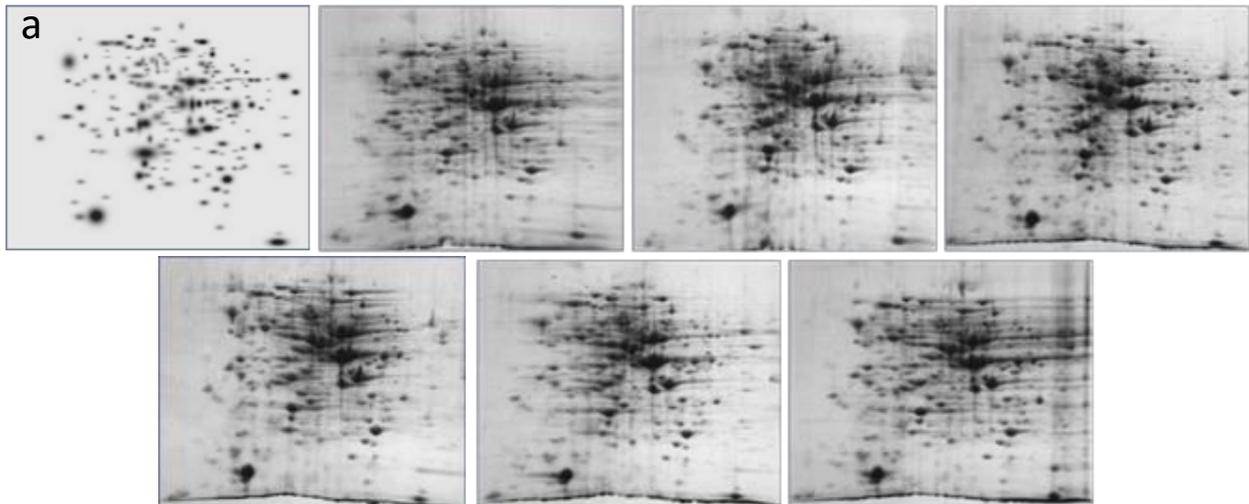


Figura 11. Construcción del gel “master” de la cepa Wis 54-1255, a) gel “master”, para la construcción del gel “master” se realizaron dos geles por cada réplica biológica.

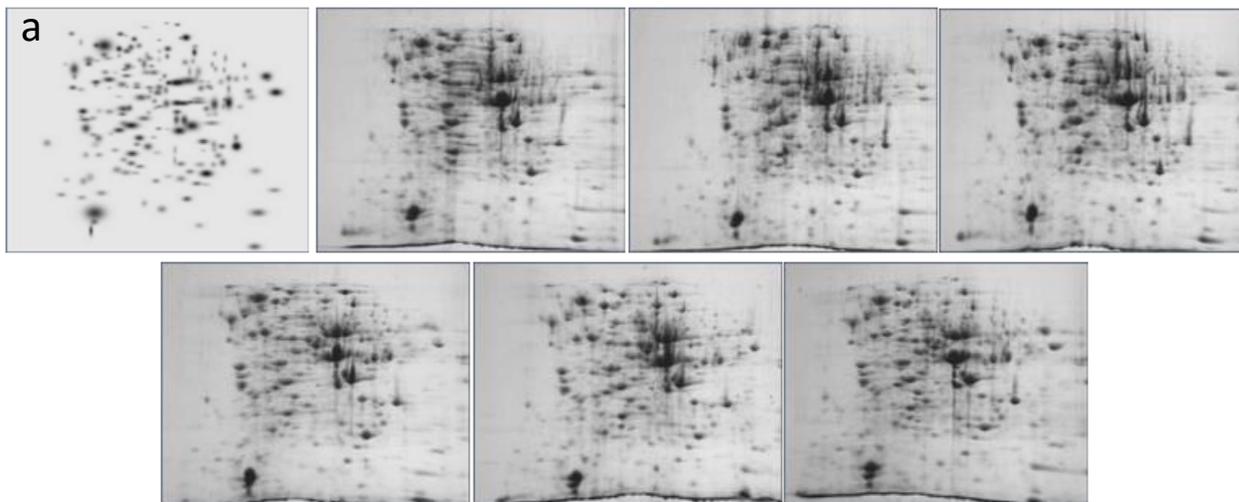


Figura 12. Construcción del gel "master" de la cepa $\Delta pga1$, a) gel "master", para la construcción del gel "master" se realizaron dos geles por cada réplica biológica.

6.1.2. Obtención de los mapas de referencia de las cepas Wis 54-1255 y $\Delta pga1$ por 2D-PAGE.

Con el fin de analizar los cambios en la expresión de proteínas de las cepas Wis 54-1255 y $\Delta pga1$ se colectaron las muestras de biomasa a las 72 horas. Como se observa en la figura 13 se lograron visualizar más de 193 *puntos* (mediante el programa PDQuest) correspondientes a las proteínas solubles intracelulares de cada cepa en los geles teñidos con azul de Coomassie G-250. La mayor cantidad de *puntos* se encuentran en un rango de 10-150 kDa. Resultados similares han sido observados en estudios previos con *P. chrysogenum*, en los que el 92% de los *puntos* visualizados se encontraron en el rango de 10 a 100 kDa (**Jami y col., 2010**). Este rango de masas es común en experimentos basados en 2D-PAGE, ya que con esta técnica es difícil visualizar proteínas de un mayor o menor peso molecular (**Peng y Gygi, 2001; de Oliveira y Graaff, 2011**). Sin embargo, la 2D-PAGE sigue siendo una poderosa herramienta en el análisis proteómico (**López, 2007; Rabilloud y Lelong, 2011**).

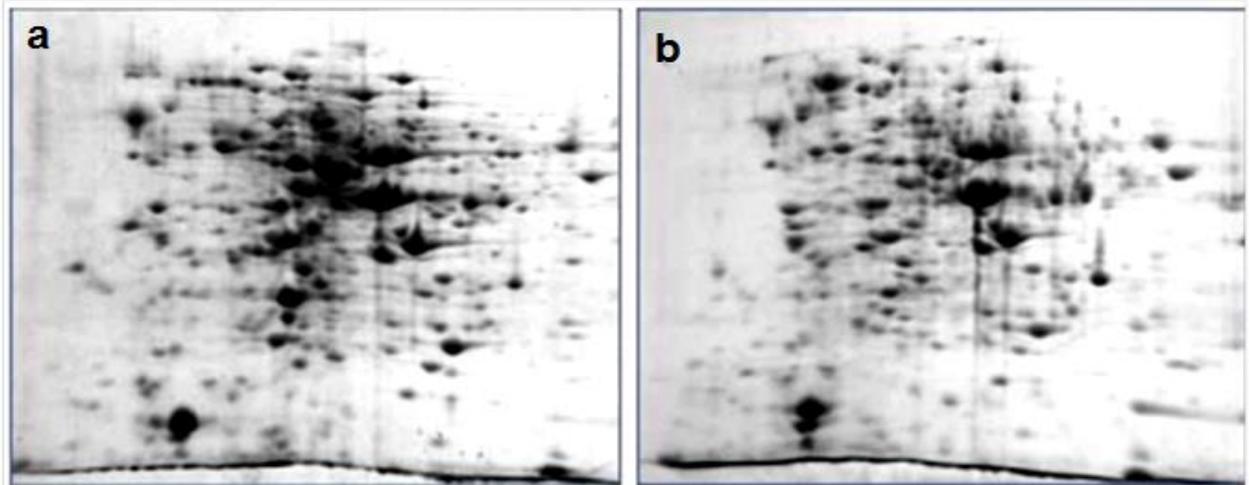


Figura 13. Comparación del proteoma intracelular de las cepas Wis 54-1255 (A) y $\Delta pga1$ (B).

6.1.3. Análisis de las proteínas que cambian de abundancia en función de la actividad de Pga1 mediante el análisis por el programa PDQuest.

Con el fin de identificar los cambios en la abundancia de proteínas mediados por la subunidad α Pga1, se llevó a cabo un análisis de los geles 2D-PAGE de la cepa parental Wis 54-1255 y la cepa $\Delta pga1$ usando el programa PDQuest. Como se observa en la figura 14, el análisis comparativo de los dos proteomas arrojó un total de 17 proteínas diferencialmente producidas entre las dos cepas, se encontraron 6 proteínas con una mayor abundancia en la cepa $\Delta pga1$, 7 proteínas sólo estuvieron presentes en la cepa Wis 54-1255, mientras que 4 *puntos* solamente se encontraron en la cepa $\Delta pga1$. En un estudio similar **Tan y col. (2008)** sólo observaron 7 puntos de proteínas que presentan cambios entre la cepa silvestre SN15 y la cepa *gna1-35* (delección de la subunidad $G\alpha$ Gna1 de una proteína G) del hongo *Stagonospora nodorum*. Los autores observaron una disminución en la producción de cinco proteínas en la cepa delecionada, estas proteínas fueron dos deshidrogenasas de cadena corta, una proteína componente del proteosoma, una glutatión transferasa y una proteína inducida por kanamicina (CipC). Por otro lado, una proteína identificada como una 3-dehidroquinato deshidratasa mostró, por su parte, un incremento de abundancia en la cepa delecionada.

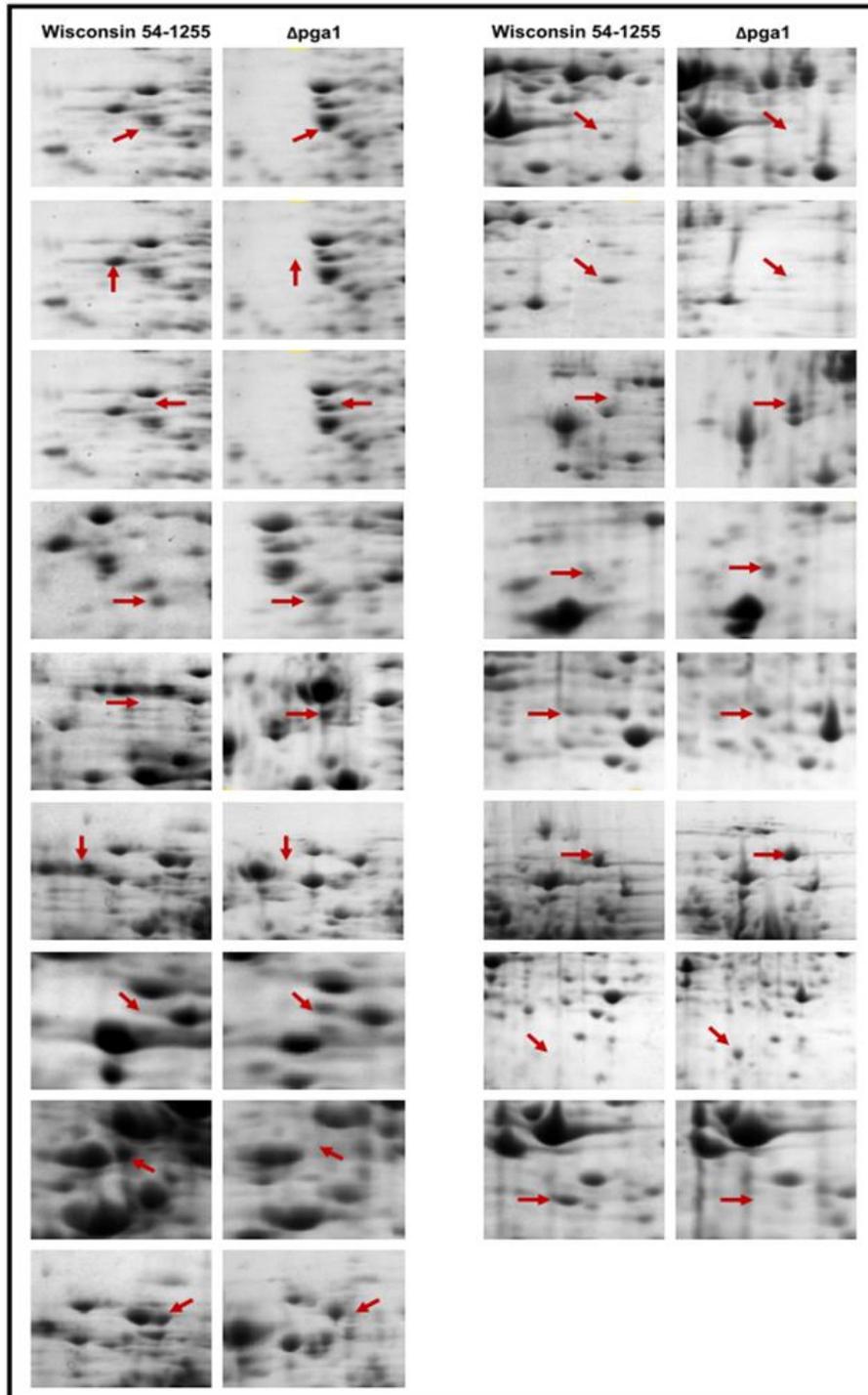


Figura 14. Acercamiento de los *puntos* que muestran cambios de abundancia de las cepas Wis 54-1255 y Δ *pga1*

En nuestro estudio, tal como se muestra en la tabla 5, se ha logrado identificar cinco proteínas que presentan algún cambio de abundancia en respuesta a la subunidad α Pga1. La identificación se llevó a cabo mediante análisis de huella peptídica, dada la facilidad de detección por MALDI TOF (Thiede y col., 2005) y la ventaja de acceder a la secuencia del genoma de *P. chrysogenum* (van den Berg y col., 2008).

Tabla 5. Proteínas identificadas mediante “huella peptídica” en respuesta a $G\alpha$ Pga1 en *P. chrysogenum*. El análisis se realizó por espectrometría de masas MALDI TOF.

Spot (número ssp PDQuest)	Código UNIPROT	pl experimental/pl teórico	Mr experimental/Mr teórico	Score (%)	Cobertura de secuencia (%)	Número de péptidos identificados	Nombre de la proteína	Función	Cambio
2901	B6HA23	4.9 / 5.36	73.07 / 72.67	89.9	8.6	7	Fenol 2-monooxigenasa	Metabolismo de Histidina, degradación de compuestos fenólicos	Solo presente en la cepa Wisconsin 54-1255
6202	B6HPM0	7 / 5.91	31 / 31.9	43.03	33	6	Uroporfirinogeno-III sintasa	Metabolismo secundario, metabolismo de porfirinas	Solo presente en la cepa Wisconsin 54-1255
9301	B6HPT3	8.7 / 9.17	33.62 / 32.96	92.06	33	8	FMN oxidoreductasa dependiente de NADH	Transporte de electrones, proteína con propiedades antioxidantes	Solo presente en la cepa Wisconsin 54-1255
403	B6HTK3	4.1 / 4.69	36 / 35.2	89.5	23	9	Similar a una Muraminidasa de <i>Aspergillus kawachii</i>	¿Virulencia?	Solo presente en la cepa $\Delta pga1$
1802	B6HA00	4.2 / 4.7	60.5 / 59.2	90.71	15	9	Subunidad delta de un coatómero	Rutas de secreción, transporte de complejo de Golgi a Retículo endoplasmico	Solo presente en la cepa $\Delta pga1$

6.1.4. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.

Las cinco proteínas identificadas por “huella peptídica” fueron clasificadas de acuerdo a sus funciones fisiológicas y dominios conservados, usando la información de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), de Uniprot (www.uniprot.org) y de KEGG (www.genome.jp/kegg/). Se ha observado que las proteínas G están involucradas en varios procesos celulares, como diferenciación celular, virulencia e incluso la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios como la penicilina (García-Rico y col., 2008b). En *P. chrysogenum*, la subunidad $G\alpha$ Pga1 regula negativamente la conidiogénesis, además de ser un regulador de los niveles intracelulares de AMPc (García-Rico y col., 2008b), sin embargo aún quedan por conocer las consecuencias de eventos transcripcionales que ocurren en respuesta a $G\alpha$ Pga1,

es por esta razón que hemos realizado un análisis proteómico con el fin de identificar proteínas que modifiquen su abundancia por señales mediadas por G α Pga1.

Una de las proteínas identificadas, sólo en la cepa Wis 54-1255, fue una fenol 2-monooxigenasa. Esta proteína presenta cerca del extremo N-terminal un dominio de unión a NAD(P) y en el C-terminal un dominio conservado que es característico de las fenol hidroxilasas-dependientes de FAD (familia PHOX). La enzima cataliza la hidroxilación de fenol y derivados de fenol simples en la posición orto, con el consumo de NADPH y oxígeno y es probable que esté involucrada en el metabolismo de la histidina, catalizando la conversión de 4-imidazolona-5-propanoato en hidantoin-5-propionato (compuestos que también forman parte de la ruta de biosíntesis de glutamato: KEGG PATHWAY Database).

Otra de las proteínas identificadas únicamente en la cepa Wis 54-1255 fue una uroporfirinógeno-III sintasa. Esta enzima cataliza la ciclación de tetrapirrol a uroporfirinógeno-III. Sin embargo, de acuerdo a la información de la base de datos KEGG (pcs #00860), en *P. chrysogenum* la reacción podría ocurrir a partir de hidroximetilbilano. Esta enzima participa en el metabolismo secundario y el metabolismo de porfirinas. Estudios previos han demostrado que la cepa $\Delta pga1$ de *P. chrysogenum* muestra un fenotipo hiperconidiante y una disminución en la biosíntesis de metabolitos secundarios como la penicilina y roquefortina. Asimismo, la delección del gen *pga1* que codifica la subunidad α Pga1 provocó una reducción en la expresión de los genes *pcbC* y *penDE* de la ruta de biosíntesis de penicilina **(García-Rico y col., 2008b)**.

Otra de las diferencias detectadas entre las dos cepas fue la presencia de una flavín-oxidorreductasa (FMN-reductasa). Esta enzima presenta un dominio característico de las flavín-mononucleótido oxidorreductasas, que utilizan como cofactor NAD(P)H para la reducción de FMN y FAD en procesos biológicos de óxido-reducción (transporte de electrones). Además, esta proteína podría participar en respuesta a diversas condiciones de estrés.

Una de las dos proteínas que se identificó solamente en la cepa *Δpga1* fue una proteína similar a una muraminidasa de *Aspergillus kawachii*, sin embargo el análisis en NCBI y Uniprot no identifica sitios conservados en esta proteína, por lo que sería conveniente estudiarla a fondo para asignarle una función más precisa.

También, sólo presente en la cepa *Δpga1*, se identificó la subunidad delta de un coatómero. Esta proteína tiene un sitio conservado cerca del C-terminal llamado Mu (MHD) de la subunidad delta de una proteína de recubrimiento (δ COP) y forma parte de un complejo de proteínas llamado coatómero (COPI). Las vesículas recubiertas por COPI forman parte de vía secretora temprana y median el transporte retrógrado desde el sistema de Golgi al retículo endoplásmico, particularmente el transporte de proteínas luminales y de membrana (**Beck y col., 2009**). En *Aspergillus nidulans* se ha observado que la disrupción del gen *sodVI C* (que codifica la subunidad α de un coatómero) es letal para el hongo, indicando que esta proteína es esencial para el crecimiento del mismo (**Whittaker y col., 1999**). Otro estudio mostró que la delección del gen *erp* (que codifica una proteína de unión a COPI y COPII) provoca una disminución de la esporulación en *Trichoderma reesei* y en *Penicillium decumbens*, En dicho estudio se comprobó una alta sensibilidad al SDS de las cepas con dicha delección, lo que podría sugerir daño en la membrana plasmática (**Wang y col., 2013**). Estudios en *P. chrysogenum* mostraron que la inactivación y delección de *pga1* permite el crecimiento del hongo en presencia de SDS (**García-Rico y col., 2011**). Esto indicaría que Pga1 podría estar regulando negativamente el tráfico vesicular, dado que la subunidad δ COP no se detectó en la cepa Wis 54-1255 (la cual mantiene un funcionamiento normal de la vía de proteínas G) y sí en la cepa *Δpga1*. Hay que mencionar, de forma adicional, que en la cepa *Δpga1* el dímero $\beta\gamma$ se encuentra libre y funcional (**García-Rico y col., 2011**) con lo que se esperaría que este complejo también pudiera intervenir en el transporte vesicular. Los resultados anteriores sugieren que Pga1 tiene un efecto en el funcionamiento del transporte vesicular desde el aparato de Golgi al retículo endoplásmico.

6.2. Análisis proteómico mediante la técnica 2D-DIGE.

6.2.1. Detección e identificación de proteínas que muestran cambios de abundancia dependiente de Pga1.

Después de utilizar la técnica de 2D-PAGE y el análisis con PDquest se decidió usar una técnica de 2D-DIGE acoplada a LC-MS/MS para llevar a cabo un análisis más completo y preciso de los cambios en el proteoma de *P. chrysogenum*, y poder identificar nuevos efectores de la vía de señalización mediada por la subunidad α Pga1, se llevó a cabo un análisis por la técnica 2D-DIGE acoplada a LC-MS/MS. Se determinó la concentración intracelular de AMPc de las cepas Wis 54-1255, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1$ +AMPc (esta condición fue utilizada con el fin de distinguir entre la señalización mediada por Pga1-AMPc y la independiente de AMPc). La figura 15 muestra la concentración de AMPc de estas cepas, en la cual se puede observar la menor concentración de AMPc en la cepa $\Delta pga1$ en comparación con las cepa Wis 54-1255 y la condición $\Delta pga1$ +AMPc.

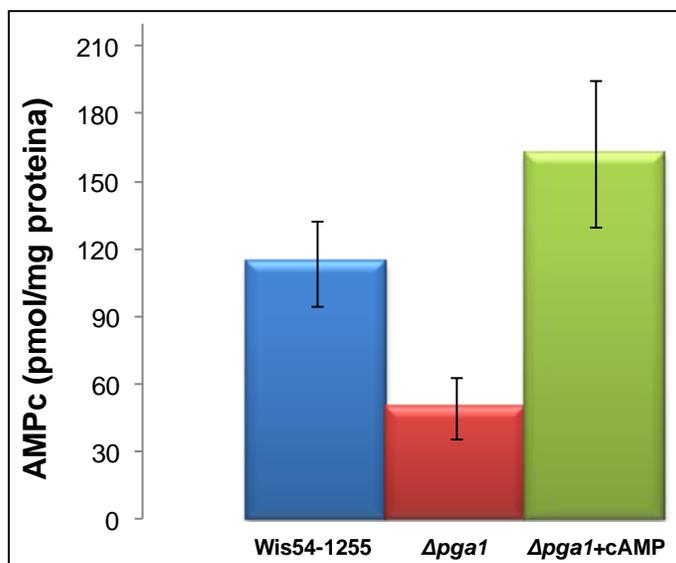


Figura 15. Concentración de AMPc de las cepas Wis 54-255, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1$ +AMPc después de 72 horas de cultivo (medio PMMY).

Estudios previos mostraron incrementos en los niveles de AMPc en función de Pga1 (**García-Rico y col., 2008b; García-Rico y col., 2011**). Sin embargo, Pga1 regula la conidiación de una forma mayoritariamente independiente de AMPc (**García-Rico y col., 2008b**).

Se logró localizar un total de 30 puntos que muestran cambios de abundancia al comparar los proteomas intracelulares de las cepas en función de Pga1, estos *puntos* se pueden visualizar en la figura 16a, la cual es un gel representativo de los ocho geles totales del experimento. La técnica de 2D-DIGE nos permitió llevar a cabo un análisis proteómico de cuatro cepas distintas en un solo experimento. La ventaja de esta técnica sobre la clásica electroforesis bidimensional (2D-PAGE) radica en el uso de tres distintos fluorocromos conocidos como CyDye DIGE fluors, cuyo uso permite correr múltiples muestras en el experimento y reducir el número de geles requeridos (lo que trae consigo una menor variabilidad), además de la posibilidad de usar un estándar interno (**Alban y col., 2003**) en todos los geles. El estándar interno es la mezcla de cantidades iguales de proteína provenientes de todas las muestras empleadas en el experimento, lo que también permite una mayor reproducibilidad y sensibilidad, en comparación con la tradicional 2D (**Alban y col., 2003, Marouga y col., 2005**). La tabla 6 muestra el nombre y función de las proteínas identificadas por LC-MS/MS que presentaron cambios de abundancia entre las cepas estudiadas.

6.2.2. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a su función biológica.

Las proteínas diferencialmente producidas en respuesta a los diferentes genotipos de Pga1 pueden ser clasificadas en 13 grupos, dependiendo su función biológica, tal y como se muestran en la figura 16b.

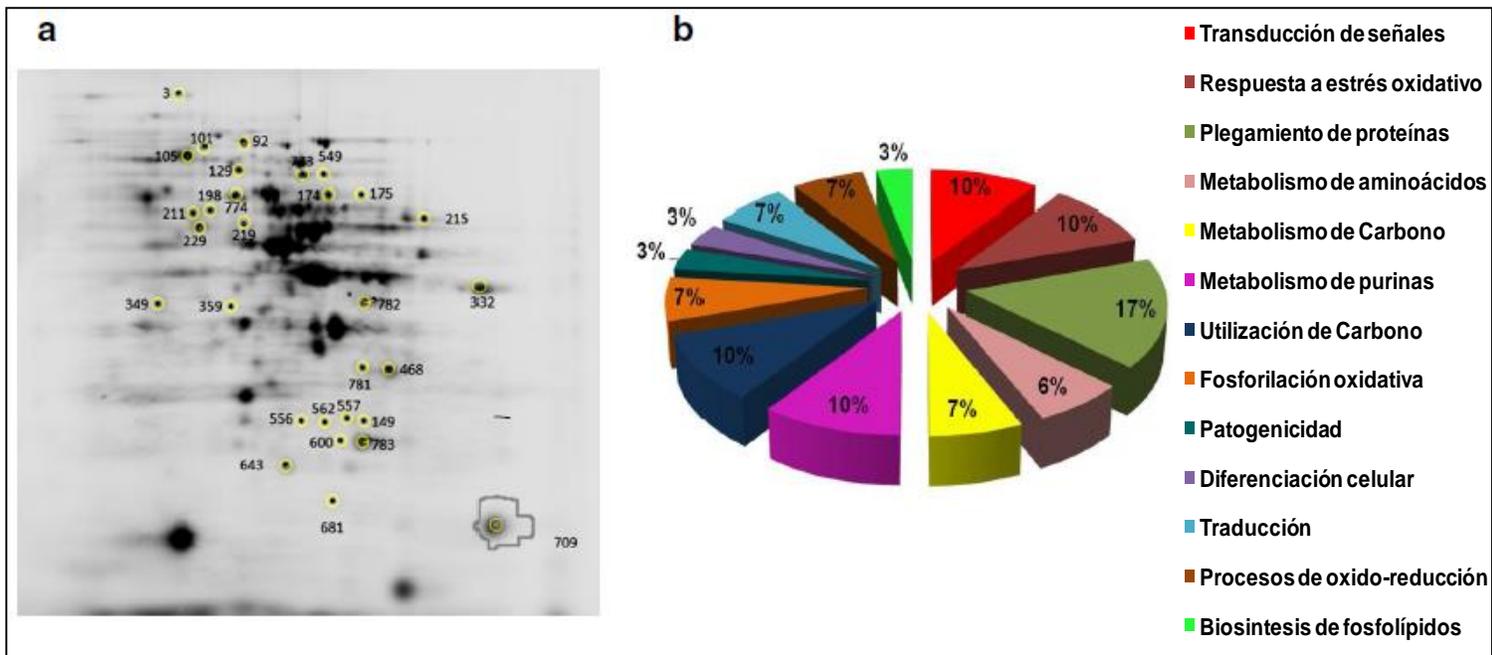


Figura 16. Gel 2D-DIGE representativo y clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a su función biológica. a) Los *puntos* que muestran cambios de abundancia están numerados y encerrados en círculos. b) La clasificación funcional de las proteínas identificadas se llevó a cabo mediante la información de NCBI, Uniprot, KEGG y de referencias bibliográficas.

Tabla 6. Proteínas identificadas que muestran cambios significativos de abundancia entre las cepas con diferentes actividades de Pga1 en *P. chrysogenum*.

#Punto	Proteína	Nombre	Función
101	Pc12g05640	Fuerte similitud a la proteína de choque térmico sspB - <i>Aspergillus niger</i> (HSP90)	Plegamiento de proteínas
105	Pc22g11240	Fuerte similitud a la proteína de choque térmico HSP70 - <i>Ajellomyces capsulatus</i>	Plegamiento de proteínas
129	Pc22g10220	Fuerte similitud a la chaperona molecular (dnaK) Ssb2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Plegamiento de proteínas
774	Pc16g11070	Fuerte similitud a la proteína mitocondrial de choque térmico Hsp60 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Plegamiento de proteínas
681	Pc22g19060	Fuerte similitud a la proteína ciclofilina cypB - <i>Aspergillus nidulans</i>	Plegamiento de proteínas
3	Pc22g05690	Fuerte similitud a la proteína hipotética contig12.tfa_1730cg - <i>Aspergillus fumigatus</i> (Proteína que contiene un dominio PH (Pleckstrin domain))	Transducción de señales
198	Pc22g17420	Fuerte similitud a la proteína hipotética contig_1_153_scaffold_12.tfa_500cg - <i>Aspergillus nidulans</i> (Proteína que contiene un dominio de repetidos de ankyrin)	Transducción de señales
562	Pc22g01260	Fuerte similitud a la pequeña proteína G Gsp1 - <i>Candida albicans</i> (Ran small GTPase)	Transducción de señales
92	Pc16g11860	Fuerte similitud a la catalasa R catR - <i>Aspergillus niger</i>	Respuesta a estrés oxidativo
600	Pc22g25220	Fuerte similitud a la 1,4-benzoquinona reductasa qr - <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Respuesta a estrés oxidativo
643	Pc22g25220	Fuerte similitud a la 1,4-benzoquinona reductasa qr - <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Respuesta a estrés oxidativo
175	Pc18g05320	Fuerte similitud a la IMP deshidrogenasa IMH3 - <i>Candida albicans</i>	Metabolismo de purinas
468	Pc22g20960	Fuerte similitud a la urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
709	Pc22g19100	Fuerte similitud a la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribotido transformilasa Ade17 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Metabolismo de purinas
211	Pc21g12590	Similar a la 6-hidroxi-D-nicotina oxidasa 6-HDNO - <i>Arthrobacter oxidans</i>	Utilización de carbono
549	Pc22g24530	Similar a la proteína hipotética MDB19 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Dienelactona hidrolasa)	Utilización de carbono
557	Pc21g10590	Fuerte similitud a la anhidrasa carbónica pca1 - <i>Porphyridium purpureum</i>	Utilización de carbono
149	Pc20g07710	sulfato adeniltransferasa	Metabolismo de aminoácidos
332	Pc22g13130	Fuerte similitud a la aspartato aminotransferasa mitocondrial mAspAT - <i>Mus musculus</i>	Metabolismo de aminoácidos
174	Pc18g06000	Fuerte similitud a la Piruvato cinasa pkiA - <i>Aspergillus niger</i>	Metabolismo de carbono
773	Pc13g12450	Fuerte similitud a la transetolasa Tkl1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Metabolismo de carbono
215	Pc12g03370	Fuerte similitud a la F1-ATPasa (α) Atp1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fosforilación oxidativa
229	Pc21g10070	Fuerte similitud a la ATP sintasa (β) - <i>Neurospora crassa</i>	Fosforilación oxidativa
556	Pc20g05750	Fuerte similitud a la levodiona reductasa An03g05050 - <i>Aspergillus niger</i> (deshidrogenasa de cadena corta)	Procesos de óxido reducción
782	Pc13g07960	Fuerte similitud a la alcohol deshidrogenasa ADH like protein An04g02690 - <i>Aspergillus niger</i>	Procesos de óxido reducción
781	Pc18g02110	Fuerte similitud a la proteína hipotética contig1471_1.tfa_1240wg - <i>Aspergillus fumigatus</i> (proteína ribosomal S3)	Traducción
783	Pc16g10560	Fuerte similitud a la proteína ribosomal (subunidad larga) L10 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Traducción
349	Pc13g09680	Fuerte similitud a la aspartil-proteasa candidapepsin - <i>Candida albicans</i>	Patogenicidad
359	Pc13g04170	Fuerte similitud a la proteína de polaridad celular tea1p - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Diferenciación celular
219	Pc22g04840	Fuerte similitud a la proteína hipotética fosfatidil sintasa SPAC22A12.08c - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Biosíntesis de fosfolípidos

Es interesante observar que el mayor grupo de proteínas identificadas está involucrado en procesos de plegamiento de proteínas (chaperonas), lo que sugiere grandes cambios en la síntesis de proteínas, porque además el análisis proteómico también muestra cambios en la expresión de dos proteínas ribosomales (Pc18g02110 y Pc16g10560). Un 10% de las proteínas identificadas están asociadas en los grupos de señalización celular, 10% en respuesta a estrés oxidativo y 10% en metabolismo de purinas. Otras proteínas involucradas en importantes funciones celulares son las integrantes del grupo de metabolismo de aminoácidos (6.6%), lo que podría sugerir que la vía de señalización celular mediada por proteínas G en *P. chrysogenum* tiene un efecto importante en metabolismo de aminoácidos, tal y como se ha descrito en el hongo *Magnaporthe oryzae* (Zhang y col., 2014). Dos proteínas identificadas (6.6%) pertenecen a rutas del metabolismo del carbono (glucólisis y pentosas fosfato), asimismo se identificaron dos proteínas del sistema de fosforilación oxidativa (una F1 ATP sintasa (α) y una ATP sintasa (β)). Se identificaron tres proteínas involucradas en procesos de utilización de carbono. Dos proteínas identificadas participarían en mecanismos de óxido-reducción (6.6%), una en mecanismos de diferenciación celular y otra en procesos de biosíntesis de fosfolípidos.

Al comparar los proteomas de las cepas mutantes con la cepa Wis 541255 se observan grandes cambios en el metabolismo primario de *P. chrysogenum*. La figura 17 muestra los cambios de abundancia de las proteínas en función de Pga1 (comparación entre las cepas G42R, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1$ +AMPc con la cepa control, que en este estudio es la cepa Wis 54-1255).

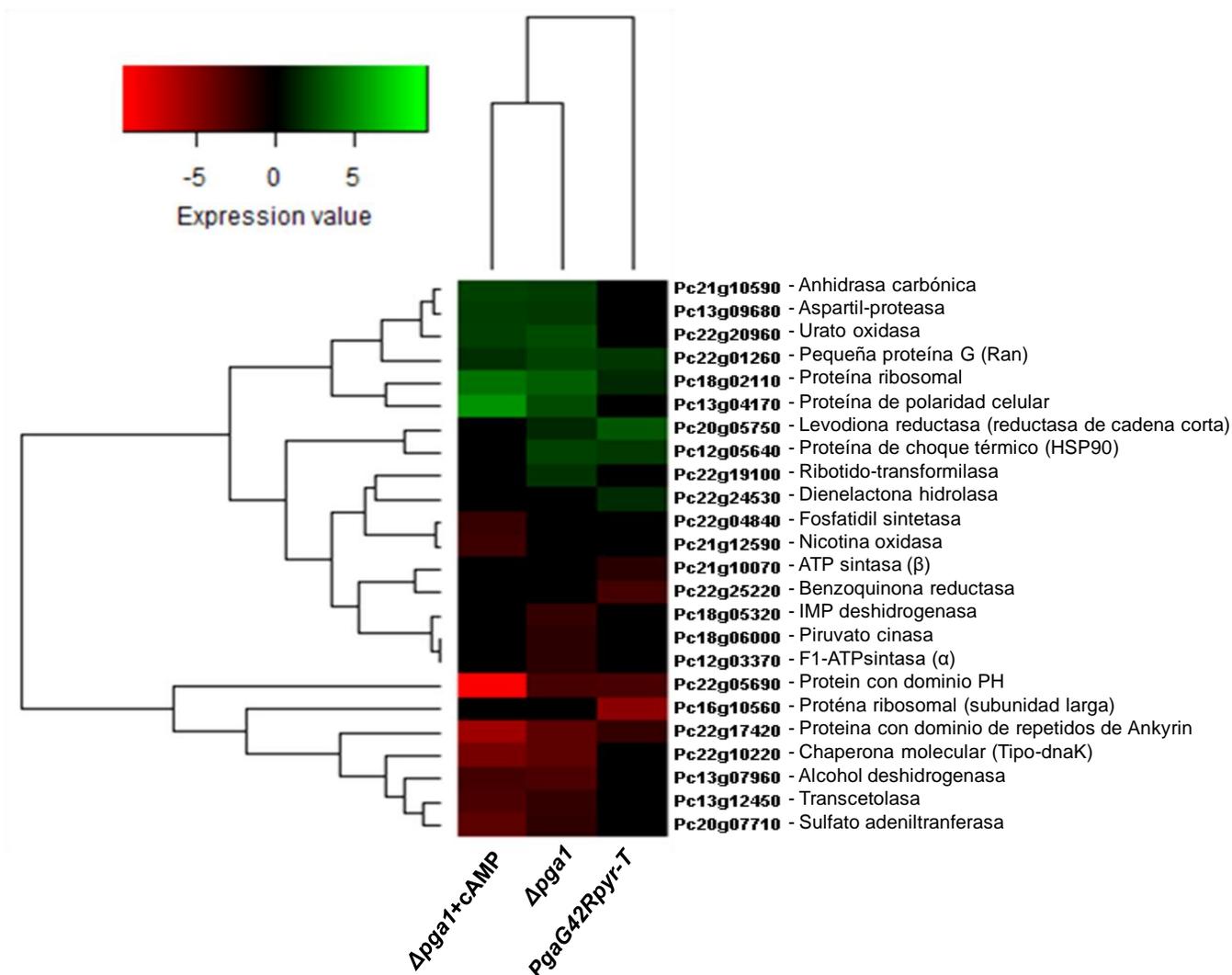


Figura 17. Heat map donde se observan los cambios de abundancia de proteínas entre las cepas PgaG42Rpyr-T, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1+AMPC$ con respecto a la cepa Wis 54-1255 (Pga1 silvestre). El color neutral (marrón) indica que no existen cambios significativos de abundancia con respecto a la cepa Wis 54-1255, mientras que los colores rojo y verde indican disminución e incremento de abundancia, respectivamente. El gráfico fue generado con el programa R.

Los cambios de abundancia de proteínas entre las cepas PgaG42Rpyr-T, $\Delta pga1$ y la condición $\Delta pga1$ +AMPc se muestran en la figura 18.

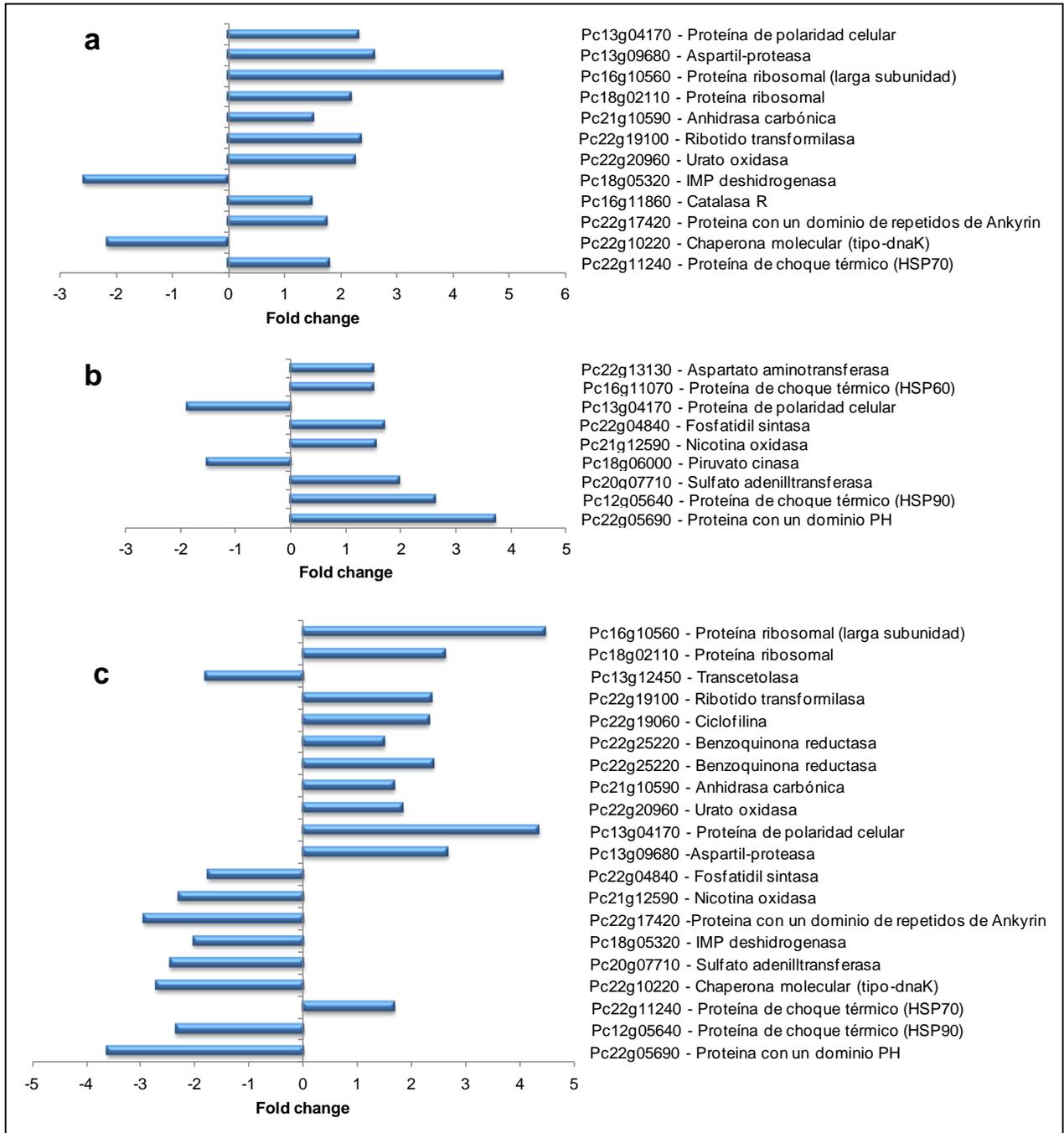


Figura 18. Cambios de abundancia entre las cepas: $\Delta pga1$ vs. PgaG42Rpyr-T (a), $\Delta pga1$ +AMPc (b), y $\Delta pga1$ +AMPc vs. PgaG42Rpyr-T (c).

En *P. chrysogenum*, la subunidad G α Pga1 regula negativamente la conidiogénesis, además de ser un regulador de los niveles intracelulares de AMPc (**García-Rico y col., 2008b**). En nuestro análisis proteómico se observaron grandes cambios en el metabolismo primario de *P. chrysogenum* en función de Pga1, las proteínas que muestran cambios de abundancia entre las cepas mutantes están involucradas en importantes procesos celulares como glucolisis, pentosas fosfato, fosforilación oxidativa, metabolismo de purinas, metabolismo de aminoácidos y biosíntesis de fosfolípidos.

6.2.2. Regulación del metabolismo central y la fosforilación oxidativa por Pga1

Una piruvato cinasa (Pc18g06000) y una transcetolasa (Pc13g12450) mostraron cambios de abundancia en función de Pga1. En la figura 11 se observa que la enzima piruvato cinasa está disminuida en la cepa $\Delta pga1$ en comparación con la cepa Wis-541255 (-1.6 veces de cambio). Esta enzima cataliza el último paso de la glucolisis, en donde el fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato. **García-Rico y col., (2011)** observaron que la germinación de la cepa $\Delta pga1$ es más baja en comparación con la cepa Wis-541255 en medio Czapek suplementado con glucosa y otras fuentes de carbono. La disminución de la enzima piruvato cinasa sugiere alteraciones en el metabolismo de la glucosa en la cepa $\Delta pga1$, lo que podría explicar el efecto de Pga1 sobre la germinación de esporas de *P. chrysogenum* cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono. Es interesante observar que la piruvato cinasa identificada podría ser fosforilada por PKA, ya que se encontraron dos sitios putativos de fosforilación por PKA (RRXS \underline{S}), en los residuos Ser 36 (RRTS) y Ser 237 (RRGS), con una puntuación de 1.71 y 0.97 calculadas con el programa pkaPS (**Neuberger, 2007**). Estudios previos han demostrado que la piruvato cinasa Pyk1 de *Saccharomyces cerevisiae* es fosforilada *in vivo* e *in vitro* por PKA (**Cytryńska y col., 2001, Portela y col., 2002**).

Diferentes estudios han mostrado el papel de las proteínas G en la detección de la fuente de carbono. En *Saccharomyces cerevisiae* un receptor acoplado a proteínas G (Gpr1) interactúa con Gpa2 (subunidad α de una proteína G) para la síntesis de

AMPc dependiente de glucosa, lo que sugiere que el sistema Gpr1-Gpa2 es esencial para la detección de glucosa con la subsecuente activación de la vía del AMPc (**Kraakman., 1999**). Un efecto similar de cambios de expresión de genes de la vía glucolítica se ha observado en *Neurospora crassa*: **Xie y col. (2004)** observaron cambios en los transcritos de genes de la glucolisis al limitar la disponibilidad de glucosa en este hongo. Los niveles de ARNm de genes que codifican enzimas de la vía glucolítica declinan después del cambio de un medio rico en glucosa a uno disminuido. Además, se sabe que la disminución de glucosa en cultivos líquidos aireados promueve la conidiación de *Neurospora crassa* (**Madi y col., 1997**). En *Aspergillus nidulans*, la proteína GanB (subunidad α de una proteína G) regula la síntesis de AMPc durante el inicio de la germinación. La ausencia de GanB provoca una disminución en la germinación en medios con distintas fuentes de carbono, lo que sugiere que GanB es necesaria para la detección de la fuente de carbono y la subsecuente activación de la vía AMPc/PKA (**Lafon y col., 2005**). Se ha observado que la cepa $\Delta pga1$ presenta niveles más bajos de AMPc en comparación con la cepa Wis 54-1255, estos resultados podrían sugerir que la ausencia de Pga1 afecta a la detección de glucosa, comprometiendo la vía de AMPc y provocando una disminución de la germinación de *P. chrysogenum*.

La delección de *pga1* en *P. chrysogenum* da como resultado una menor abundancia de una probable F1-ATP sintasa (α) mitocondrial (Pc12g03370), en comparación con la cepa Wis-54-1255 (veces de cambio -1.61). Esta proteína forma parte del complejo V de la fosforilación oxidativa, el cual a su vez está compuesto del subcomplejo F0 (translocación de protones) y el subcomplejo F1 (síntesis de ATP) (**Velours y Arselin, 2000**). Hay que mencionar que la proteína F1-ATP sintasa (α) puede unir el nucleótido, pero es catalíticamente inactiva. Por el contrario, una probable ATP sintasa (β) catalíticamente activa es menos abundante en la cepa G42Rpyr-T (activación constitutiva de Pga1) en comparación con la cepa Wis 54-1255 (-1.5 veces de cambio). Es interesante observar que la F1-ATP sintasa (α) sólo es detectada en presencia del inductor 1,3-diaminopropano en un cultivo líquido

de *P. chrysogenum* Wis-54-1255 (**García-Estrada y col., 2013**). Se sabe que el 1,3-diaminopropano es un inductor de la biosíntesis de penicilina y de la expresión de los genes de biosíntesis de dicho compuesto *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* (**Martín y col., 2011, Martín y col., 2012**). Estudios anteriores mostraron que estos genes de biosíntesis presentan una menor expresión en la cepa $\Delta pga1$ (García-Rico y col., 2008 Micro). Nuestro resultado muestra que la delección y activación constitutiva de *pga1* podrían afectar a la síntesis de ATP a través de los cambios de abundancia de las ATP sintasas, por lo que es probable que la baja producción de penicilina en la cepa $\Delta pga1$ sea consecuencia de una disminución en su capacidad de sintetizar ATP. Estudios anteriores demuestran que altas tasas de producción de penicilina por *P. chrysogenum* se correlacionan con altos niveles de ATP, requerido por la enzima ACV sintetasa. Por el contrario, cuando no hay producción de penicilina se observan bajos niveles de ATP (**Nasution y col., 2008**).

6.2.3. Señalización celular de Pga1 y su efecto sobre la producción de penicilina.

Estudios anteriores mostraron el efecto de Pga1 sobre la biosíntesis de penicilina (**García-Rico y col., 2008a**). La enzima transcetolasa fue menos abundante en la cepa $\Delta pga1$ (-1.94 veces de cambio), esta proteína cataliza la reacción que da como productos D-ribosa 5-fosfato y D-xilulosa 5-fosfato a partir de sedoheptulosa 7-fosfato y D-gliceraldehido 3-fosfato en la vía de las pentosas fosfato. Esta vía es de gran importancia para la generación del NADPH requerido para procesos de biosíntesis. Es interesante observar que la enzima transcetolasa y otras enzimas de la vía de las pentosas fosfato son muy abundantes en la cepa AS-P-78, una cepa de alta producción de penicilina (**Jami y col., 2010a**). Las cepas $\Delta pga1$ y G203R-T presentan una disminución en la producción de penicilina y, por el contrario, la cepa con el alelo *pga1*^{G42R} permite que aumente la producción del antibiótico en la cepa Wis 54-1255 (**García-Rico y col., 2008a**). Estudios previos mostraron que la producción de penicilina por *P. chrysogenum* requiere altas concentraciones de NADPH, el cual es generado a partir de la vía de pentosas fosfato (**Jørgensen y col., 1995**). Esta demanda de NADPH es consecuencia de la biosíntesis de los

aminoácidos valina y cisteína, los cuales son precursores del núcleo β -lactámico de la penicilina (Kleijn y col., 2007). La delección de *pga1* podría traer como consecuencia bajos flujos de NADPH, al disminuir la abundancia de la enzima trascetolasa, y esto explicaría la baja producción de penicilina en la cepa Δ *pga1*. En nuestro estudio fueron identificadas también dos proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos. Una de ellas fue una sulfato adeniltransferasa, la cual está involucrada en la biosíntesis de cisteína. Esta proteína presentó una baja abundancia la cepa Δ *pga1* (-1.7 veces de cambio) y menor aún en la cepa Δ *pga1*+AMPc (-3.8), en comparación con la cepa Wis 54-1255. Es interesante observar que los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de cisteína, entre las que se encuentra la sulfato adeniltransferasa (Pc20g07710) tuvieron una mayor expresión en la cepa de *P. chrysogenum* DS17690 (cepa de alta producción) en comparación con la cepa Wis 54-1255 (van den Berg y col., 2008). Asimismo, Jami y col. (2010) encontraron en la cepa de *P. chrysogenum* AS-P-78 (cepa de alta producción) una mayor abundancia de proteínas involucradas en la biosíntesis de cisteína. Estudios previos han mostrado que la biosíntesis de penicilina requiere grandes flujos de cisteína, uno de los aminoácidos precursores de este antibiótico (Nasution y col., 2008). La disminución de la enzima sulfato adeniltransferasa provocaría una disminución en la biosíntesis de cisteína, lo cual tendría como resultado una menor biosíntesis de penicilina. Esto puede correlacionarse con estudios previos, que mostraron una menor producción de penicilina en la cepa Δ *pga1* (García-Rico y col., 2008a). Nuestros resultados muestran, además, que el incremento de las concentraciones de AMPc intracelular no permiten incrementar la abundancia de la enzima sulfato adeniltransferasa. Este resultado puede explicar por qué el aumento de las concentraciones de AMPc no tiene efecto en la biosíntesis de penicilina (García-Rico y col., 2008a). Se ha observado, incluso, que la concentración de AMPc es mayor en cultivos de *P. chrysogenum* con nula producción de penicilina (Nasution y col., 2008), lo que confirma que la regulación de la biosíntesis de penicilina es independiente del AMPc.

6.2.4. Regulación de proteínas involucradas en el metabolismo de purinas en función de Pga1.

La delección de *pga1* muestra una disminución en la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (Pc18g05320) (-1.89 veces de cambio). Esta enzima cataliza la conversión de IMP (inosina 5'-monofosfato) a xantosina-5'-monofosfato (XMP) en la biosíntesis de nucleótidos de guanina (GTP, GDP). La disminución en la abundancia de esta enzima provocaría, pues, la aparición de menores concentraciones de nucleótidos de guanina, como el GTP. Esta proteína se ha visto incrementada en mutantes del gen *crgA* (ubiquitina ligasa) en *Mucor circinelloides* (Navarro y col., 2013), así como en estados de anaerobiosis de levaduras (de Groot y col., 2007). Al contrario de lo que sucede en *P. chrysogenum*, la delección de *gna1* (proteína G α) provoca el aumento de una GMP sintasa en *Stagonospora nodorum* (Casey y col., 2010), lo que traería consigo un aumento del GTP intracelular. El fenotipo de la cepa Δ *pga1* es, por lo tanto, contrario al de la cepa delecionada de *Stagonospora nodorum*. Dos proteínas involucradas en el metabolismo de purinas presentaron una mayor abundancia en la cepa Δ *pga1*: la enzima fosforribosil aminoimidazol carboxamida formiltransferasa (Pc22g19100) y una urato oxidasa (Pc22g20960) (cambio 2.84), la cual también resulto aumentada en la cepa Δ *pga1*+AMPc (cambio 2.34), lo que sugiere una regulación independiente de AMPc. La enzima urato oxidasa o uricasa es una proteína de peroxisoma que cataliza la oxidación de ácido úrico a alantoína. Estudios previos han mostrado que la delección de genes que codifican RGS en *Magnaporthe oryzae*, provocaron cambios en la abundancia de una uricasa y otras proteínas involucradas en el metabolismo de nucleótidos (Zhang y col., 2014). Estos resultados sugieren que la vía de señalización de las proteínas G regulan parte del metabolismo de nucleótidos de purinas.

6.2.5. Chaperonas que son reguladas por Pga1.

En el proteoma de *P. chrysogenum* se encontró que el 10.84% de las proteínas identificadas están involucradas en procesos de plegamiento de proteínas (Jami y col., 2010). En nuestro estudio se identificaron un total de cinco proteínas con función en el plegamiento de proteínas, además de dos proteínas involucradas en

procesos de síntesis de proteínas. Una de estas proteínas es una HSP90 (Pc12g05640) la cual presenta un dominio ATPasa cercano al extremo amino terminal. Esta proteína muestra un aumento en las cepas $\Delta pga1$ (cambio 2.44) y G42R (cambio 2.17), en comparación con la cepa Wis 54-1255. La mayor abundancia de la chaperona HSP70 (Pc22g11240) en la cepa $\Delta pga1$ puede estar relacionada con el incremento de la viabilidad de los conidios de esta cepa después de un choque térmico **(García-Rico y col., 2011)**.

Una chaperona molecular del tipo dnaK (Pc22g10220), similar a la proteína Ssb2 de *S. cerevisiae*, es menos abundante en la cepa $\Delta pga1$ en comparación con las cepas Wis 54-1255 y PgaG42Rpyr-T. Es interesante observar que se han descrito aumentos en la abundancia de esta proteína en presencia del autoinductor 1, 3-diaminopropano **(García-Estrada y col., 2013)**. De acuerdo con estas observaciones, esta chaperona es más abundante en las condiciones que estimulan la producción de penicilina, es decir, cuando hay una proteína Pga1 funcional y en presencia de 1, 3-diaminopropano. Ssb2 es necesaria para mantener a la proteína cinasa Snf1 en su forma activa **(von Plehwe y col., 2009)**. La proteína cinasa Snf1 favorece la expresión de genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de carbono en ausencia de glucosa, al inhibir la acción del complejo represor Mig1/Ssn6/Tup1 **(Rolland y col., 2002)**, responsable de la represión catabólica.

En *P. chrysogenum* los genes de biosíntesis de penicilina están sujetos a la represión catabólica, que se ejerce por el factor de transcripción CreA **(Cepeda-García y col., 2014)**. Por lo tanto, será de gran interés estudiar la posible participación de Pc22g10220 en la represión catabólica, y analizar si la regulación de los genes de biosíntesis de penicilina está mediada por esta chaperona y CreA.

6.2.6. Pga1 y la respuesta a estrés oxidativo.

Se identificaron dos proteínas con una probable función de resistencia a estrés oxidativo: una catalasa R (Pc1611860) y una benzoquinona reductasa (Pc22g25220). Las dos proteínas muestran una mayor abundancia cuando Pga1 presenta una baja actividad. Ese resultado concuerda con resultados previos, ya que se ha observado que la inactivación o ausencia de Pga1 se traduce en una

mayor resistencia al estrés oxidativo inducido por H₂O₂ (**García-Rico y col., 2011**). Un incremento similar se ha observado en la cepa de alta producción de penicilina AS-P-78 en comparación con cepas de baja producción del antibiótico (**Jami y col., 2010a**). En *Stagonospora nodorum* se observó una menor abundancia de una catalasa en la mutante $\Delta gna1$, en comparación con la cepa silvestre (**Casey y col., 2010**). Sin embargo, la cepa mutante $\Delta gna1$ es incapaz de esporular, siendo de nuevo un fenotipo opuesto al de la cepa mutante $\Delta pga1$ de *P. chrysogenum*.

6.2.7. Efecto de Pga1 en procesos de óxido-reducción.

Se encontró una mayor expresión de una levodieno reductasa (Pc20g05750) en la cepa $\Delta pga1$ con respecto a la cepa Wis 54-1255 (1.53 veces de cambio). Sin embargo, la mayor abundancia (3.18 veces de cambio con respecto a la cepa Wis 54-1255) se observó en la cepa G42Rpyr-T (activación constitutiva de Pga1). Esta proteína presenta un dominio Pfam típico de la familia de deshidrogenasas de cadena corta, las cuales son oxidorreductasas dependientes de NAD⁺ o NADP⁺. En un análisis proteómico, **Tan y col. (2008)** observaron una mayor abundancia de una deshidrogenasa de cadena corta (Sch1) en una cepa de *Stagonospora nodorum* con la disrupción del gen *gna1* (subunidad α de una proteína G heterotrimérica) al compararla con la cepa silvestre. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en *P. chrysogenum*, donde la delección de *pga1* muestra un efecto hiperconidiante (**García-Rico y col., 2008b**), las cepas de *Stagonospora nodorum* con la inactivación de *gna1* son incapaces de esporular y presentan un fenotipo albino (**Solomon y col., 2004**). Asimismo, la delección del gen *sch1* afectó al crecimiento vegetativo y la esporulación asexual en *Stagonospora nodorum*, (**Casey y col., 2010**). Esos mismos autores encontraron cambios de abundancia de una manitol deshidrogenasa y una deshidrogenasa de cadena corta al comparar los proteomas de una cepa con la delección del gen *gna1* del hongo *Stagonospora nodorum*, con la cepa parental, lo que demuestra el importante efecto que presentan las proteínas G en los procesos de óxido-reducción en hongos filamentosos.

Por su parte, se observó disminución en la abundancia de una alcohol deshidrogenasa en la cepa $\Delta pga1$ (-2.76 veces de cambio) y en la cepa

$\Delta pga1$ +AMPc (-2.55) en comparación con la cepa Wis-54-1255, lo que sugiere que la abundancia de esta proteína es independiente del AMPc. Se ha descrito la inducción de una alcohol deshidrogenasa (ADHIII) en *Aspergillus nidulans* en condiciones de anaerobiosis (Kelly y col., 1990). Asimismo, se sabe que el factor de transcripción CreA afecta a la transcripción del gen *alcA*, el cual codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADHI) de *Aspergillus nidulans* (Mogensen y col., 2006). Corrales Escobosa y col. (2011) mostraron que la pérdida de actividad, causada por mutaciones en el gen *adh1*, de una alcohol deshidrogenasa provoca alteraciones en el metabolismo del etanol bajo condiciones aeróbicas, así como alteraciones del crecimiento cuando se usa glucosa como fuente de carbono (en condiciones de hipoxia). La delección de *pga1* estaría, pues, afectando tanto el metabolismo de la glucosa como al de otras fuentes de carbono.

6.2.8. Proteínas posiblemente involucradas en señalización celular que son reguladas por Pga1.

Tres proteínas involucradas en transducción de señales muestran cambios de abundancia en función de Pga1. Una proteína presenta un dominio de homología a plekstrina (*PH domain*) cerca del carboxilo terminal (Pc22g05690) y su abundancia fue menor en las cepas $\Delta pga1$ y G42R (-2.57 y -2.66 veces de cambio). La disminución fue mayor aún en la cepa $\Delta pga1$ +AMPc (-9.6 veces de cambio). Es probable que la producción de esta proteína dependa de una función normal de la vía Pga1 (cepa Wis 54-1255), ya que la cepa Wis-54-1255 fue la que presentó la mayor abundancia de esta proteína (Fig. 19a). Diversos estudios han mostrado las distintas funciones de las proteínas que poseen este dominio, entre las que se encuentran la transducción de señales y organización del citoesqueleto (Lemmon y col., 2000, Ingle y Hemmings. 1994, Musacchio y col., 1993, Gibson y col., 1994), Otros estudios han mostrado que el dominio PH de cinasas de receptor de proteínas G (GRKs) puede interactuar con el dímero G $\beta\gamma$ provocando un incremento de la fosforilación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Scheffzek y col., 2012). Es interesante observar que la proteína Spo7 de *Schizosaccharomyces pombe*, la cual contiene un dominio PH y una región de

hélice superenrollada similar a la de proteína Pc22g05690 (Fig. 19b) es esencial para la morfogénesis y la iniciación del ensamblaje de la membrana en esta levadura (**Nakamura-Kubo y col., 2011**). **Fadri y col. (2005)**, por su parte, observaron que las proteínas Slm1 y Slm2 (proteínas con dominios PH y regiones de hélice superenrollada) interaccionan con el segundo mensajero fosfatidil-4,5-bisfosfato, además de que participan en la polarización del citoesqueleto y en el crecimiento celular, Dichos autores también reportaron que estas proteínas interaccionan con las proteínas Avo2 and Bit61, las cuales son componentes del complejo TORC2.

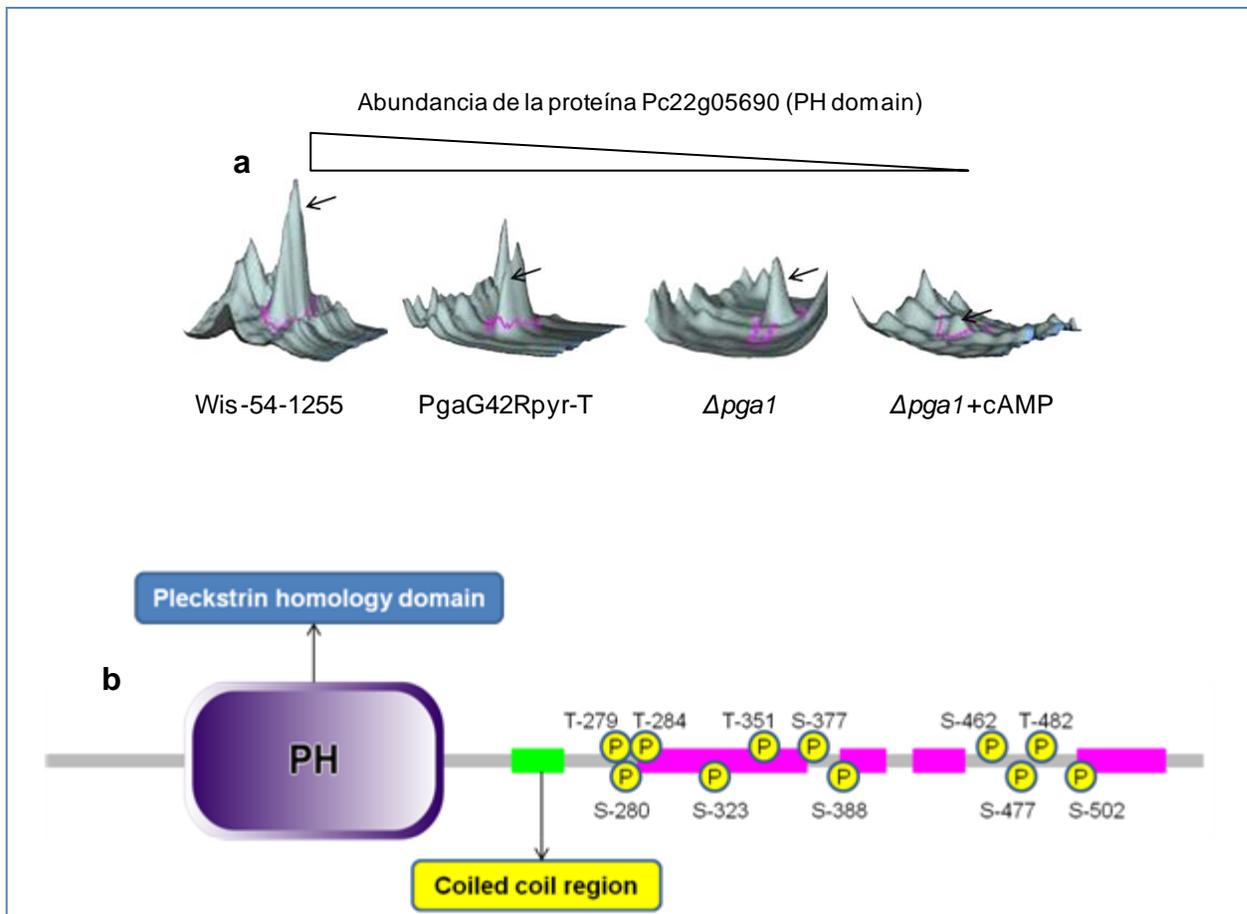


Figura 19. a) Abundancia de la proteína Pc22g05690 en las diferentes cepas y condiciones. La señal de fluorescencia fue obtenida mediante el programa "DeCyder 2-D differential software". **b)** Representación esquemática de la proteína Pc22g05690, la cual muestra el dominio de homología a pleckstrina (PH) y 11 sitios fosforilados que fueron identificados por LC-MS/MS. Los dominios de esta proteína fueron generados con el programa SMART.

Además de su identificación, se encontró que la proteína Pc22g05690 se encuentra hiperfosforilada (Fig. 19b), lo que refuerza el probable rol de esta proteína en la señalización celular, ya que es bien conocido que la fosforilación controla muchas de las vías de señalización celular (**Rigbolt y col., 2012**). La fosforilación de proteínas juega un papel muy importante en la regulación de procesos celulares como metabolismo, homeostasis y diferenciación celular (**Tichy y col., 2011**). Como se puede observar en la figura 19b, mediante LC-MS/MS se lograron identificar 11 sitios fosforilados *in vivo*, cuatro de los cuales están presentes en residuos de treonina y siete en residuos de serina. Se realizó un análisis *in silico* mediante el programa NetPhosK 1.0 Server (**Blom y col., 1999**) con el fin de conocer las probables cinasas que fosforilan a la proteína Pc22g05690. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 7, en la que se puede observar que hay cinco probables sitios de fosforilación por PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc). Esto situaría a esta proteína dentro de la ruta de transducción de señales que involucra a proteínas G y la vía del AMPc-PKA, lo que se sustenta con resultados anteriores, en los que se observa que proteínas con este dominio pueden unir el dímero G $\beta\gamma$ de proteínas G (**Wang y col., 1994**).

Tabla 7. Predicción de las cinasas que fosforilan a la proteína Pc22g05690 con respecto a los fosfopéptidos identificados por LC-MS/MS.

Sitio	Cinase	Score	Fosfopéptidos identificados (LC-MS/MS)
T-279	PKA	0.64	(R)KRpTSIFGTLLGK(K)
S-280	PKA	0.64	(R)KRTpSIFGTLLGK(K) (K)RTpSIFGTLLGK(K) (R)TpSIFGTLLGK(K)
T-284	PKC	0.85	(R)KRpTSIFGpTLLGK(K)
S-323	-	-	(K)AAEPTTESpSAEAPAPVAAETAETAAPT(A)
T-351	CKII	0.55	(K)AAEPTAEpTPAETTEAAKEEAK(D)
S-377	PKA	0.78	(K)RApSIFGNFFQK(V)
S-388	p38MAPK	0.56	(K)VApSPSQEK(S) (K)VApSPSQEKSEK(E)
S-462	PKA	0.8	(K)RRTpSFFGNLGMK(K)
S-477	CKII	0.66	(K)EKKADpSDNEVTDGEAK(E) (K)ADpSDNEVTDGEAK(E) (K)KADpSDNEVpTDGEAKETK(A)
T-482	CKII	0.72	(K)KADSDNEVpTDGEAKETK(A) (K)KADpSDNEVpTDGEAKETK(A)
S-502	PKA	0.69	(R)KPPSKAVKLDKEEVAEAETEAK(A)

La fosforilación por PKC en el sitio T-284 presentó el mayor score en el análisis *in silico* (ver tabla 6) lo que sugiere que esta proteína pudiera ser sustrato de PKC. Otro dato interesante es la fosforilación del sitio S-388, el cual es presumiblemente fosforilado por la cinasa p38MAPK humana. Pero esta cinasa presenta una homóloga en *Saccharomyces cerevisiae*, conocida como Hog1, la cual es una cinasa involucrada en procesos de estrés osmótico y mitofagia (**Westfall y col., 2004; Mao y col., 2011**). La fosforilación de proteínas con dominios PH por parte de Hog1 ha sido demostrada, por ejemplo **Lee y col. (2013)** describieron que la proteína Rgc2 (regulador del canal de glicerol, proteína que contiene un dominio PH) es sustrato de Hog1. Otras proteínas con dominios PH en el ser humano muestran sitios de fosforilación, como por ejemplo la proteína IRS-1 (sustrato 1 del receptor de insulina), la cual participa en respuesta inflamatoria y señalización de la insulina (**Kin y col., 2005**). La proteína cinasa D presenta múltiples sitios de fosforilación, el dominio PH de esta enzima inhibe el dominio cinasa, sin embargo este proceso se revierte al unirse con el dímero G β γ (**Van-Lint, 2002**). La proteína Pc22g17420 también fue menos abundante en las cepas $\Delta pga1$ y G42Rpyr-T, sin embargo, fue aún menos abundante en la condición $\Delta pga1$ +AMPc (al igual que la proteína Pc22g05690) (Fig. 14a) lo que indica una desregulación en proteínas involucradas en señalización celular cuando el ciclo de Pga1 esta desregulado.

La proteína Pc22g17420 contiene un dominio de repeticiones de ankyrin (Figura 20b), y, de acuerdo a los datos de NCBI, también presenta un dominio de factor Von Willebrand tipo A (vWA). El dominio de repeticiones de ankyrin está involucrado en interacciones proteína-proteína: las proteínas que contienen este dominio tienen funciones como reguladoras del ciclo celular, iniciadores transcripcionales, y transporte de iones, además de participar en procesos de señalización celular (**Bork y col., 1993**). En hongos, se ha encontrado que los factores de transcripción pertenecientes a la familia APSES contienen dominios de ese tipo (**Zhao y col., 2015**). Se ha demostrado que Pga1 regula la conidiación en *P. chrysogenum* mediante la represión de los genes *brlA* y *wetA* (**García-Rico RO y col., 2008b**), sin embargo aún quedan por conocer proteínas que intervienen en el proceso de

conidiación y germinación en *P. chrysogenum*. El presente estudio muestra que la proteína Pc22g17420 pudiera ser un efector de la vía de señalización celular mediada por Pga1, además de que podría intervenir en el proceso de conidiación, ya que se ha observado que un gen que codifica una proteína con un dominio de repeticiones de ankyrin muestra cambios de expresión durante la conidiación del hongo *Exserohilum turcicum* (Flaherty y col., 2005). Sería recomendable llevar a cabo experimentos adicionales con el fin de determinar la función de esta proteína y su posible rol en la conidiación de *P. chrysogenum*.

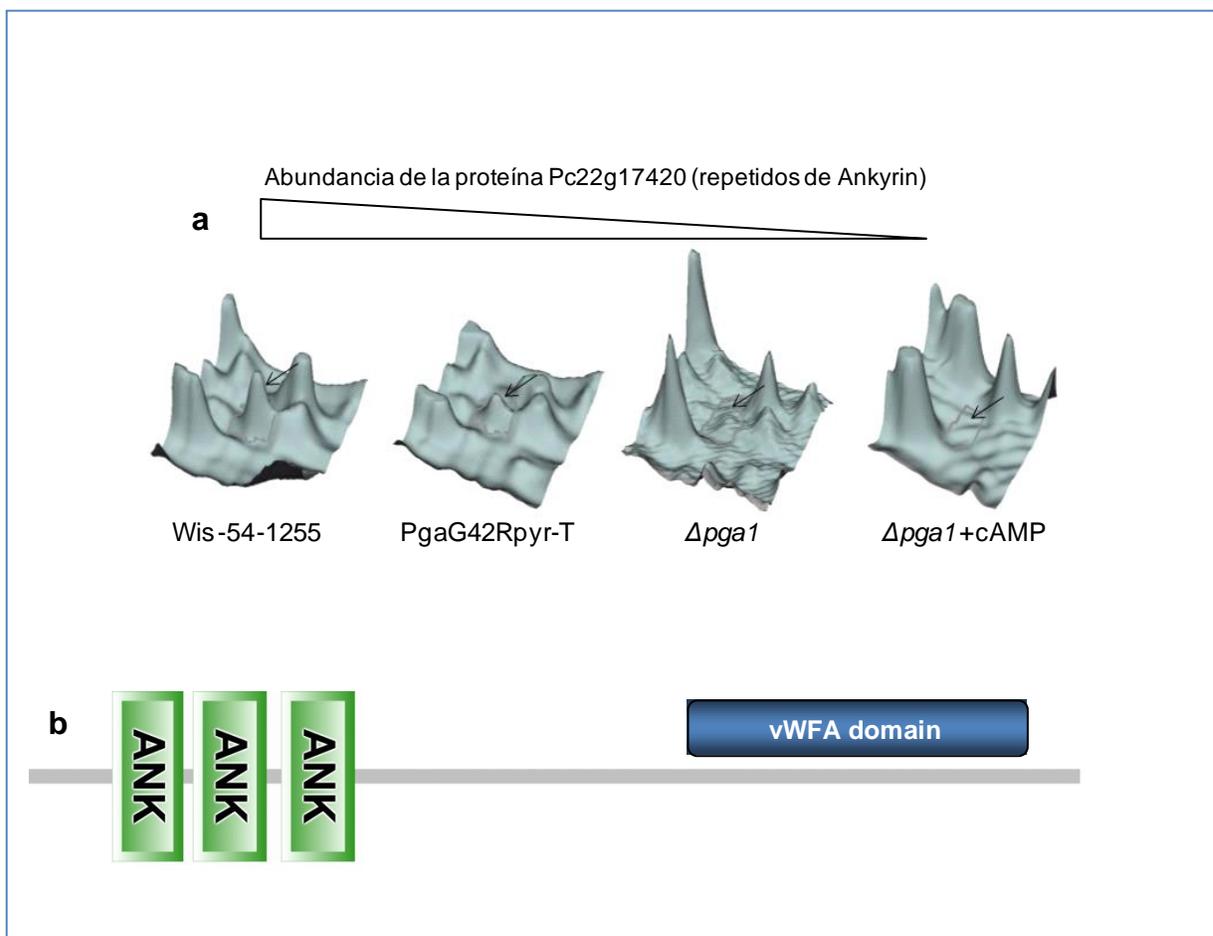


Figura 20. a) Abundancia de la proteína Pc22g17420 en las diferentes cepas y condiciones. La señal de fluorescencia fue obtenida mediante el programa "DeCyder 2-D differential software". **b)** Representación esquemática de la proteína Pc22g05690, la cual muestra el dominio de repeticiones de ankyrin (ANK) y un dominio vWFA. Los dominios de esta proteína fueron generados con el programa SMART.

6.2.9. Efecto de Pga1 en la biosíntesis de lípidos.

La proteína Pc22g04840 mostró una mayor abundancia en la cepa $\Delta pga1$ (1.73 veces de cambio), en comparación con la cepa $\Delta pga1+AMPc$ (figura 18). Esta proteína es similar a una fosfatidil sintasa de *Schizosaccharomyces pombe*. De acuerdo a la información de Uniprot, esta enzima podría estar involucrada en la biosíntesis de cardiolipina, un fosfolípido que es uno de los principales componentes de la membrana mitocondrial, además de ser esencial para muchos procesos mitocondriales (**Chang y col., 1998**). La delección del gen *crd1* (que codifica una cardiolipina sintasa) provocó una reducción del potencial de la membrana mitocondrial, por lo que la función mitocondrial se vio afectada (**Jiang y col., 2000**). Este resultado sugiere que Pga1 podría regular de varias formas la función mitocondrial, ya que también se encontraron cambios de abundancia en dos proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa.

Además de los cambios observados, por LC-MS/MS se lograron identificar cuatro sitios fosforilados en la proteína Pc22g04840 (figura. 21), por lo que se realizó una análisis *in silico* (NetPhosK) con el fin de predecir las posibles cinasas que pudieran haber fosforilado a esta proteína (tabla 8). De los cuatro sitios fosforilados se puede destacar el sitio S-79 ya que el análisis por NetPhosk arrojó un valor de 0.89 para la fosforilación por parte de PKA, lo que sugeriría que esta proteína forma parte de la vía de señalización celular mediada por Pga1 y AMPc-PKA.



Figura 21. Esquema de la proteína Pc22g04840 en la cual se aprecian los dominios hidrolasa y los cuatro sitios de fosforilación que fueron identificados por LC-MS/MS.

Tabla 8. Predicción de las cinasas que fosforilan a la proteína Pc22g04840 con respecto a los fosfopéptidos identificados por LC-MS/MS.

Sitio	Kinase	Score	Phosphopeptides identified (LC-MS/MS)
S-28	P38MAPK/CDK5	0.57/0.57	(R)AQDPQGALpSPR(D) (R)AQDPQGALpSPRDQR(A)
S-79	PKA	0.89	(R)RGpSRNSFGTSLPIPR(S)
S-82	CKI	0.61	(R)RGSRNpSFGTSLPIPR(S)
S-99	PKC	0.72	(R)LSRLpSSAQR(G)

6.2.10. La proteína nuclear de transporte RAN-GTPasa es regulada por Pga1.

La proteína Pc22g01260, la cual es similar a la proteína Gsp1 (proteína G pequeña) de *Candida albicans*, fue más abundante en las cepas mutantes ($\Delta pga1$ y G42Rpyr-T) en comparación con la cepa Wis-54-1255, y aún más en la cepa $\Delta pga1$ (2.39 veces de cambio). Los datos de Uniprot y NCBI concuerdan en que la proteína Pc22g01260 es una GTPasa Ran pequeña, un miembro de la familia de las GTPasas relacionadas con Ras. Esta proteína aporta la energía requerida para el transporte núcleo-citoplasma, energía que proviene de la hidrólisis de GTP por parte de Ran, la cual forma parte de la vía de importación nuclear mediada por el heterodimero importina α /importin β (Fried y col., 2003). En trabajos previos, se ha identificado que la delección de *gna1* ($G\alpha$) del hongo *Stagonospora nodorum* causa un aumento en la abundancia de una importina β -4 (Casey y col., 2010), lo que indica que la el transporte nuclear podría estar regulado por la vía de las proteínas G. Mediante un análisis proteómico, Chandler y col. (2008) reportaron un incremento de una proteína con un dominio Ran-GTPasa, designada como RanA, en el hongo dimórfico *Penicillium marneffe* durante las fases iniciales del desarrollo de levadura de este hongo. Los autores observaron que el incremento de esta proteína correlacionaba con una división nuclear y celular coordinada. Estos resultados sugieren que Ran podría participar en los procesos de diferenciación celular mediados por proteínas G. Estos cambios de abundancia de Ran también han sido reportados durante el proceso de conidiación del hongo *Exserohilum turcicum* (Flaherty y col., 2005), lo que soporta la hipótesis de que Ran es una proteína reguladora de la conidiación. Esto podría explicar el microciclo de

esporulación de la cepa $\Delta pga1$ en cultivo sumergido, reportado previamente (García-Rico y col., 2008b).

6.2.11. Una proteína relacionada con el crecimiento polarizado es más abundante en la cepa $\Delta pga1$.

La proteína Pc13g04170, la cual es similar a la proteína de polarización celular Tea1p de *Schizosaccharomyces pombe*, se encontró en mayor abundancia en las cepas $\Delta pga1$ (2.86 veces de cambio) y $\Delta pga1+AMPc$ (5.31 veces de cambio). En *Schizosaccharomyces pombe* la proteína Tea1p regula el crecimiento celular polarizado (Feierbach y col., 2004). Un homólogo de Tea1 ha sido identificado en *Aspergillus nidulans* y la delección de este gen (designado como *teaA*) causa un crecimiento serpenteante de las hifas (Takeshita y col., 2008). Estudios previos han mencionado que Pga1 regula negativamente la extensión apical en *P. chrysogenum* (García-Rico y col., 2008a), sin embargo aún no se conoce la forma en la que Pga1 regula este proceso. Los resultados del presente trabajo sugieren que la proteína Pc13g04170 podría estar relacionada con el crecimiento polarizado (además de la extensión apical) y ser un efector de la vía de señalización mediada por Pga1, lo que podría explicar parte de los cambios fenotípicos de las distintas mutantes de Pga1.

6.2.12. Modelo propuesto de la vía de señalización mediada por Pga1.

Con el fin de identificar posibles interacciones entre las proteínas que cambian de abundancia en función de Pga1, se llevó a cabo un análisis *in silico* mediante el programa STRING 10 (Szklarczyk y col., 2015). Este diagrama de interacción se muestra en la figura 22, en la cual se pueden observar 16 interacciones, de las cuales 14 se involucran con Pga1. Cinco proteínas interaccionarían directamente con Pga1.

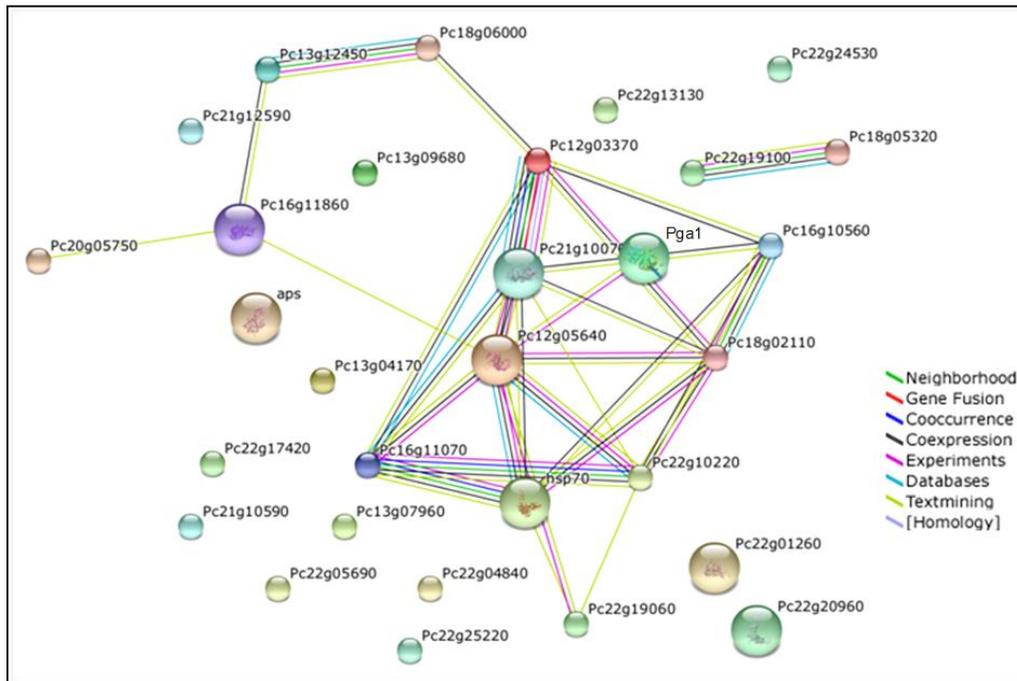


Figura 22. Interactoma *in silico* de las proteínas de *P. chrysogenum* identificadas en el presente trabajo. Para este análisis se empleó el programa STRING v.10.

Es interesante observar que existen dos interacciones directas entre Pga1 y la proteína Pc12g05640 (con alta similitud con la proteína de choque térmico *sspB* de *Aspergillus niger*), la cual es una probable HSP90. Una interacción similar ha sido previamente identificada en humanos entre una proteína $G\alpha$ y una HSP90, interacción que es importante para la señalización celular de dicha proteína $G\alpha$ (Vaiskunaite y col., 2001). Estudios previos han propuesto modelos de la vía de señalización mediada por Pga1 con base en sus resultados (García-Rico y col., 2007, García-Rico y col., 2008a, 2008b). De acuerdo a estos estudios se sabe que Pga1 regula positivamente la biosíntesis de penicilina favoreciendo la expresión de los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* (genes de la ruta de biosíntesis de penicilina). Por otra parte, Pga1 regula negativamente la conidiación por medio de la represión de los genes *brlA* y *wetA* (García-Rico y col., 2007; García-Rico y col., 2008b). Pga1 además modifica la integridad de la pared celular, reduciendo la resistencia a diferentes condiciones de estrés (García-Rico y col., 2011). Tomando en consideración estos datos y los obtenidos en el presente trabajo, se ha construido un modelo que se puede observar en la figura 23.

En el presente trabajo hemos encontrado que la señalización mediada por Pga1 ejerce un control sobre las rutas catabólicas centrales. Algunas proteínas probablemente involucradas en procesos morfogénicos son reguladas por Pga1 (Tea1, Ran). La resistencia a condiciones de estrés es regulada negativamente por Pga1 (**García-Rico y col., 2011**), ya que se identificaron algunos efectores que intervienen en este proceso (HSP90 y CatR). Pga1 regula positivamente la biosíntesis de penicilina (**García-Rico y col., 2008a**), en el presente trabajo se encontraron proteínas que participan en la biosíntesis de ATP, NADPH y cisteína, los cuales son esenciales para obtener alta producción del antibiótico.

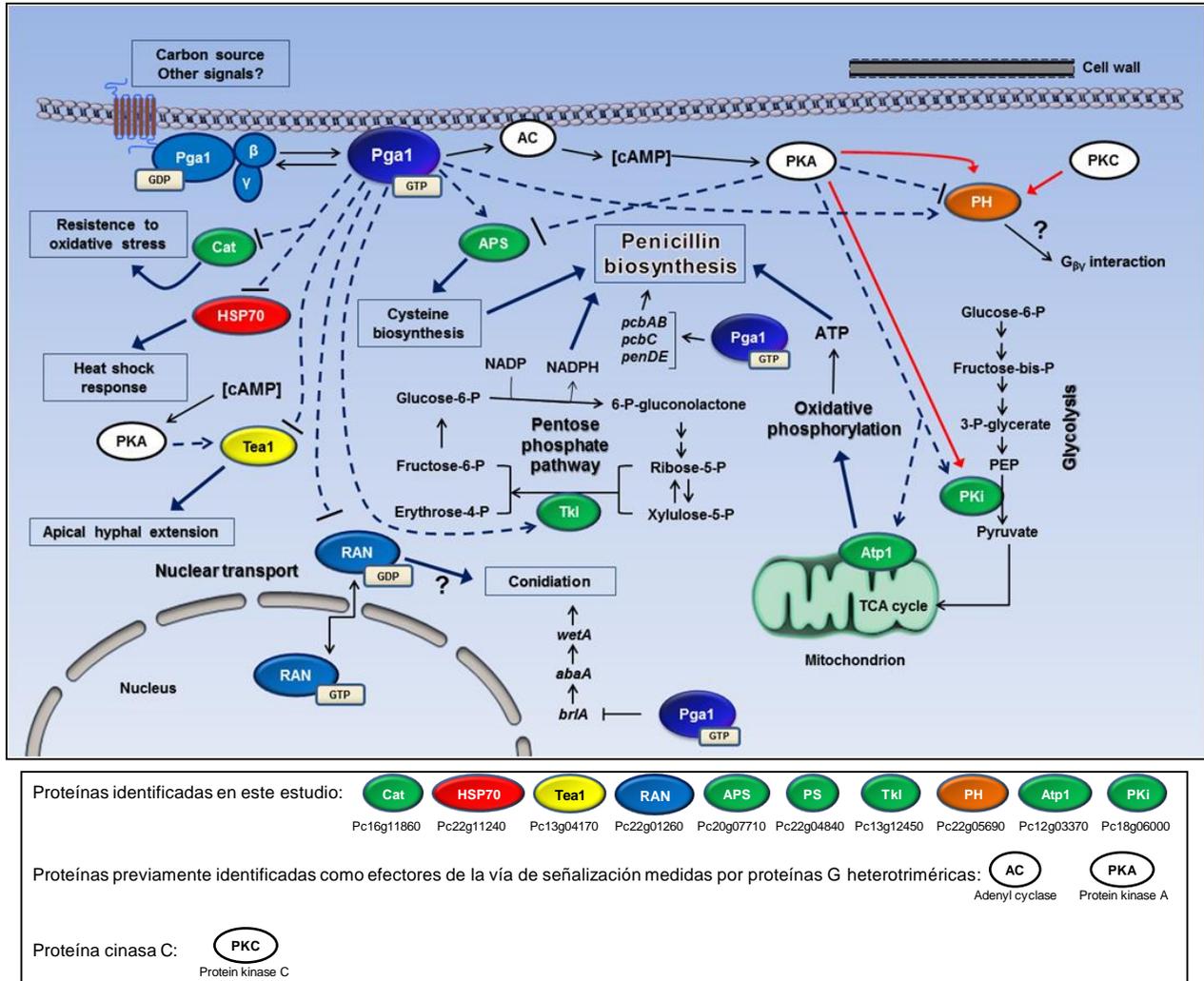


Figura 23. Modelo de la transducción de señales mediada por Pga1, se muestran los efectores adenilato-ciclase (AC) y PKA, las cuales se han reportado previamente en otros hongos. Las flechas solidas delgadas indican pasos en rutas metabólicas, procesos de transporte e interacciones establecidas del subgrupo I de Gα. Las líneas punteadas indican cambios de expresión positiva (flecha) o negativa (barra) con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo. Las flechas rojas sólidas indican fosforilación por PKA y PKC. Las flechas solidas gruesas indican el proceso celular de las proteínas reguladas por Pga1. El gen *briA* es uno de los principales reguladores de la conidiación y es negativamente regulado por la señalización de Pga1 (García-Rico y col., 2007). Los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, son los tres genes de la ruta de biosíntesis, los cuales son regulados positivamente por Pga1 (García-Rico y col., 2008a).

6.2.13. Efecto de Pga1 en la producción de biomasa de *P. chrysogenum*.

La vía de señalización mediada por Pga1 puede ser manipulada a través de mutaciones del gen *pga1*, como se muestra en este y anteriores trabajos (**García-Rico y col., 2008a, 2008b, 2011**). Por lo tanto, la vía Pga1 puede utilizarse como objetivo para la mejora de los procesos biotecnológicos en *P. chrysogenum*, incluida la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos. La manipulación de la vía mediada por Pga1 puede conducir a mayores rendimientos de producción de penicilina (**García-Rico y col., 2008a**), inducir conidiación en cultivos sumergidos (**García-Rico y col., 2008b**), aumentar la resistencia a condiciones de estrés (**García-Rico y col., 2011**), que puede ocurrir en biorreactores, y además, aunque poco caracterizado aún, causan cambios en la morfología de las hifas (**García-Rico y col., 2008b**) y la morfología macroscópica del micelio. La manipulación de la actividad de Pga1 puede ser así una herramienta para la mejora de procesos industriales biotecnológicos con *P. chrysogenum*. En este sentido, es importante considerar cómo la actividad de Pga1 afecta la producción de biomasa en cultivos sumergidos, por lo que se realizó un cultivo de 120 horas con las cuatro condiciones utilizadas en el análisis proteómico, y se midió la biomasa producida cada 24 h (Figura 24). Los resultados indicaron que existen diferencias significativas en la biomasa a partir de 72 h de cultivo en adelante, la falta de actividad de Pga1 (cepa $\Delta pga1$) causó una disminución en la biomasa producida con respecto a las cepas con un Pga1 activo, un efecto que no se revirtió mediante el aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Este es un punto que debe tenerse en cuenta al diseñar estrategias que impliquen el uso del gen *pga1* para mejorar el rendimiento de *P. chrysogenum*. Sin embargo, el comportamiento de las cepas que llevan mutaciones del gen *pga1* puede variar dependiendo del sistema de cultivo, por ejemplo cultivo continuo o en lote

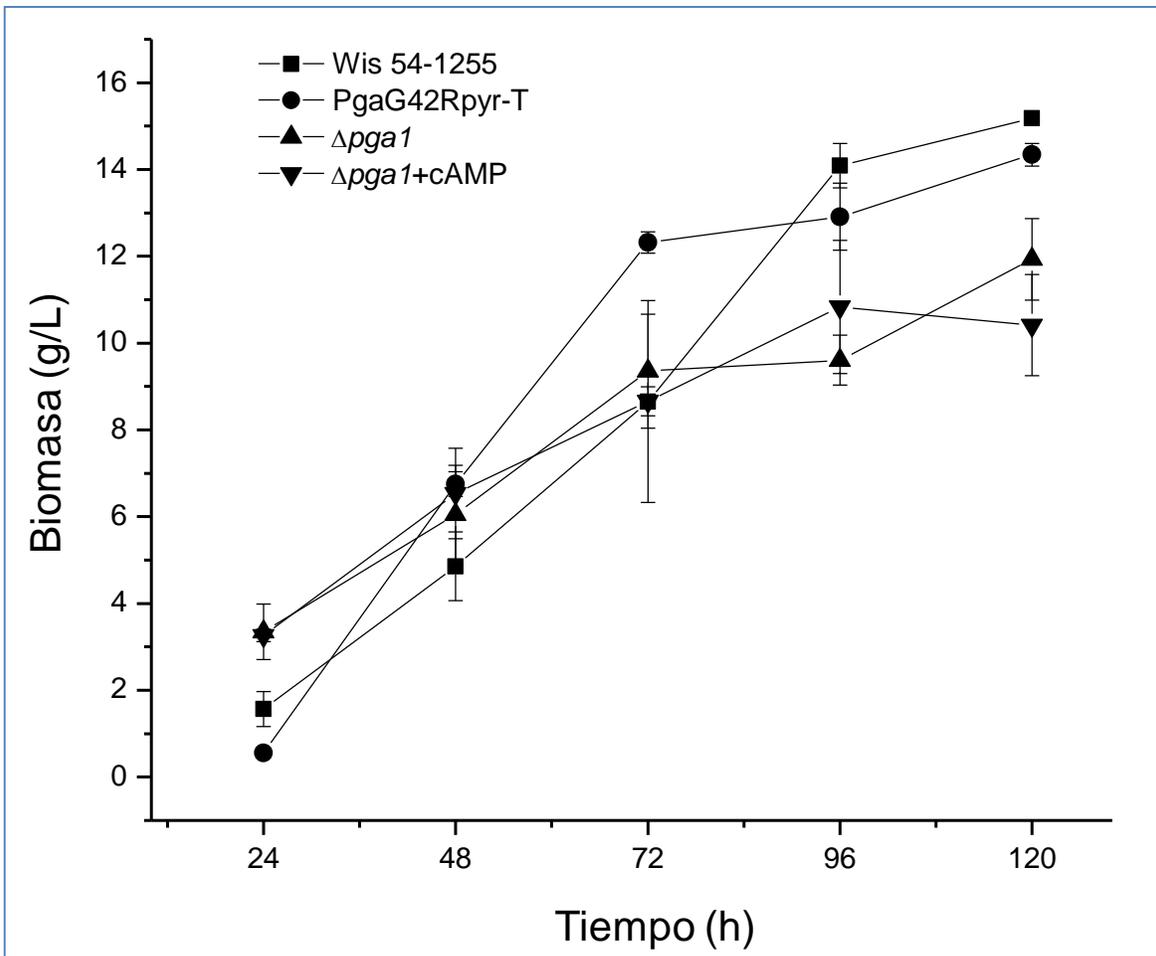


Figura 24. Producción de biomasa (peso seco), de las diferentes cepas y condiciones utilizadas en este estudio. Para el cultivo líquido se empleó el medio PMMY.

6.3. Análisis diferencial de proteínas fosforiladas previamente enriquecidas mediante 2D-DIGE.

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más comunes e importantes. La fosforilación regula importantes procesos metabólicos en la célula, como la regulación a nivel transcripcional y traduccional, señalización celular y proliferación y diferenciación celular (Tichy y col., 2011). Por esta razón, se llevó a cabo un análisis proteómico cuantitativo (2D-DIGE) de extractos enriquecidos en proteínas fosforiladas. La tabla 9 muestra las proteínas identificadas en este experimento.

Tabla 9. Fosfoproteínas identificadas mediante 2D-DIGE

#Spot	Proteína	Nombre	Función
175	Pc16g13280	Fuerte similitud a la glutatión reductasa Glr1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Respuesta a estrés oxidativo
243	Pc12g04310	Fuerte similitud al gen inducible por acetato aciA - <i>Aspergillus nidulans</i>	Procesos de oxido-reducción
246	Pc12g04310	Fuerte similitud al gen inducible por acetato aciA - <i>Aspergillus nidulans</i>	Procesos de oxido-reducción
249	Pc12g04310	Fuerte similitud al gen inducible por acetato aciA - <i>Aspergillus nidulans</i>	Procesos de oxido-reducción
293	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
474	Pc22g10040	Fuerte similitud a la glucosamina-6-fosfato deaminasa - <i>Aspergillus niger</i>	Metabolismo de carbohidratos
543	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
735	Pc12g07440	Similar a la subunidad VIb de la citocromo oxidasa Cox12 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fosforilación oxidativa
950	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
951	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
953	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
955	Pc16g13280	Fuerte similitud a la glutatión reductasa Glr1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Respuesta a estrés oxidativo
956	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
957	Pc16g13280	Fuerte similitud a la glutatión reductasa Glr1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Respuesta a estrés oxidativo
960	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas
963	Pc22g20960 Pc12g07280	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i> Fuerte similitud la citocromo C cyc - <i>Aspergillus niger</i>	Metabolismo de purinas Fosforilación oxidativa
964	Pc22g20960	Fuerte similitud a la Urato oxidasa uaz - <i>Aspergillus flavus</i>	Metabolismo de purinas

Como se puede observar en la tabla 9, se hicieron un total de 18 identificaciones a partir de los puntos extraídos de los geles 2D-DIGE, de las cuales 6 corresponden a diferentes proteínas. Es interesante observar que la urato oxidasa está presente en el 50 % de los puntos, este resultado nos indica que esta proteína presenta modificaciones que hacen variar su punto isoelectrico y/o peso molecular, las cuales podrían corresponder a diferentes grados de fosforilación de la proteína. Se sabe que la fosforilación puede modificar el punto isoelectrico de las proteínas (Zhu y col., 2005, Anderson y col., 2014).

6.3.1. Cambios en la abundancia de las proteínas fosforiladas identificadas por 2D-DIGE en función de Pga1.

Los cambios de abundancia de las proteínas fosforiladas se muestran en la figura 25.

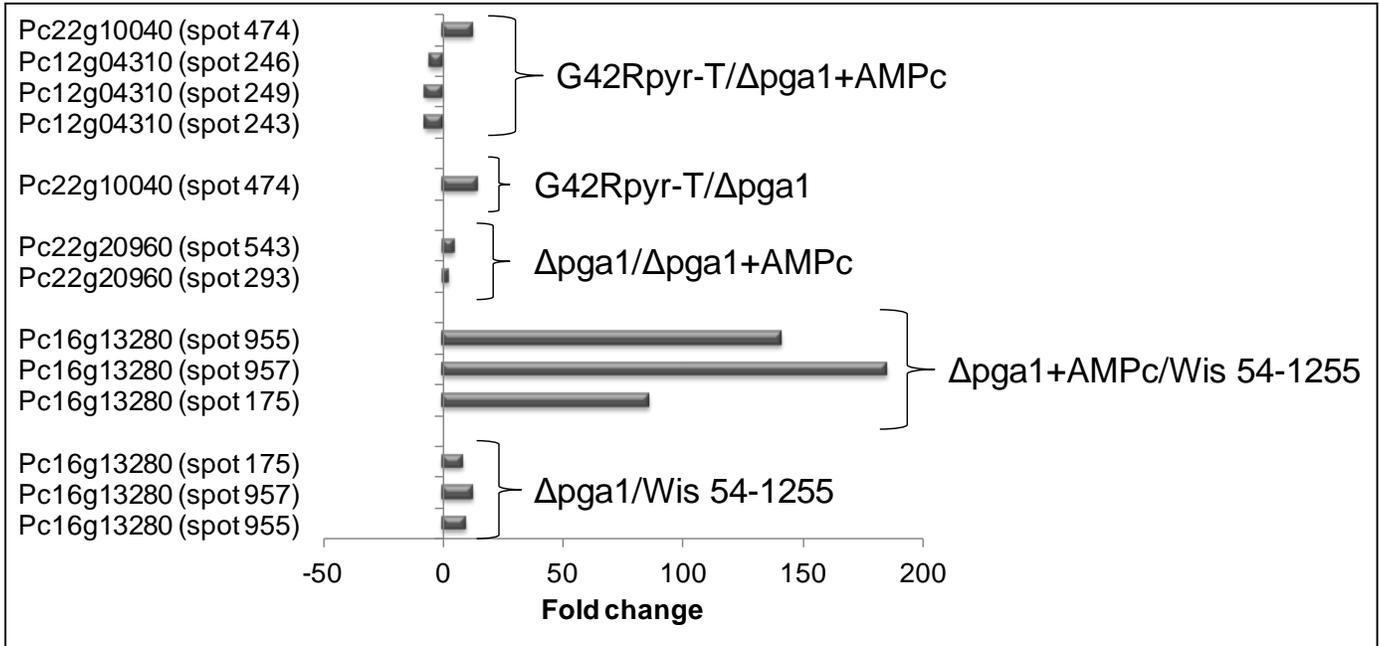


Figura 25. Cambios de abundancia de las proteínas fosforiladas entre las diferentes cepas y condiciones (ANOVA p value ≤ 0.05). Los nombres de las proteínas se pueden observar en la tabla 9

Como se puede observar en la figura 25, no se observaron cambios de proteínas fosforiladas cuando se compara la cepa G42Rpyr-T con la cepa Wis 54-1255. Los cambios de abundancia más drásticos son de la proteína Pc16g13280 (glutación reductasa), la cual presenta un aumento de abundancia en las cepas con la delección del gen *pga1*, cuando se comparan con la cepa Wis 54-1255. Esta proteína presenta una alta similitud con la proteína Glr1 de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual está involucrada en la protección celular contra el estrés oxidativo. Es interesante mencionar que esta proteína es regulada por el factor de transcripción γ AP-1 (Grant y col., 1996). Parece probable que esta proteína esté involucrada en la mayor resistencia a condiciones de estrés que confiere la inactivación de Pga1 en *P. chrysogenum* (García-Rico y col., 2011).

Otro de los cambios importantes encontrados es el de la proteína Pc12g04310 (muy similar al producto del gen *aciA*, el cual es inducido por acetato). Esta proteína presentó una menor abundancia en la cepa G42R-pyr-T en comparación con la cepa $\Delta pga1$ +AMPc. Reportes previos demuestran que el gen *aciA* (el cual codifica para una formato deshidrogenasa) es regulado por el factor de transcripción AmdA de *Aspergillus nidulans* (Andrianopoulos y col., 1997). El promotor del gen *aciA* presenta dos sitios de unión para AmdA y reportes previos sugieren que AmdA podría unirse a secuencias similares a las del factor de transcripción CreA (Lints y col., 1995).

En la siguiente sección se describe la identificación de un sitio de fosforilación *in vivo* de la proteína Pc21g01800, la cual es el homólogo del factor de transcripción AmdA en *Penicillium chrysogenum*. En esta proteína se identificó, mediante LC-MS/MS, un sitio fosforilado en el fosfopéptido: (R)pSPGPSQALTLPK(A).

6.3.2. Identificación *in vivo* de los sitios de fosforilación de la proteína Pc22g10040.

Se logró identificar tres sitios de fosforilación en tres diferentes fosfopéptidos, los cuales se muestran en la figura 26. En ella se puede apreciar el dominio característico de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa, la cual cataliza la conversión reversible de la glucosamina-6-fosfato a D-fructosa-6-fosfato y amonio, el último pasó en la ruta del metabolismo de la N-acetil-D-glucosamina-6-fosfato.

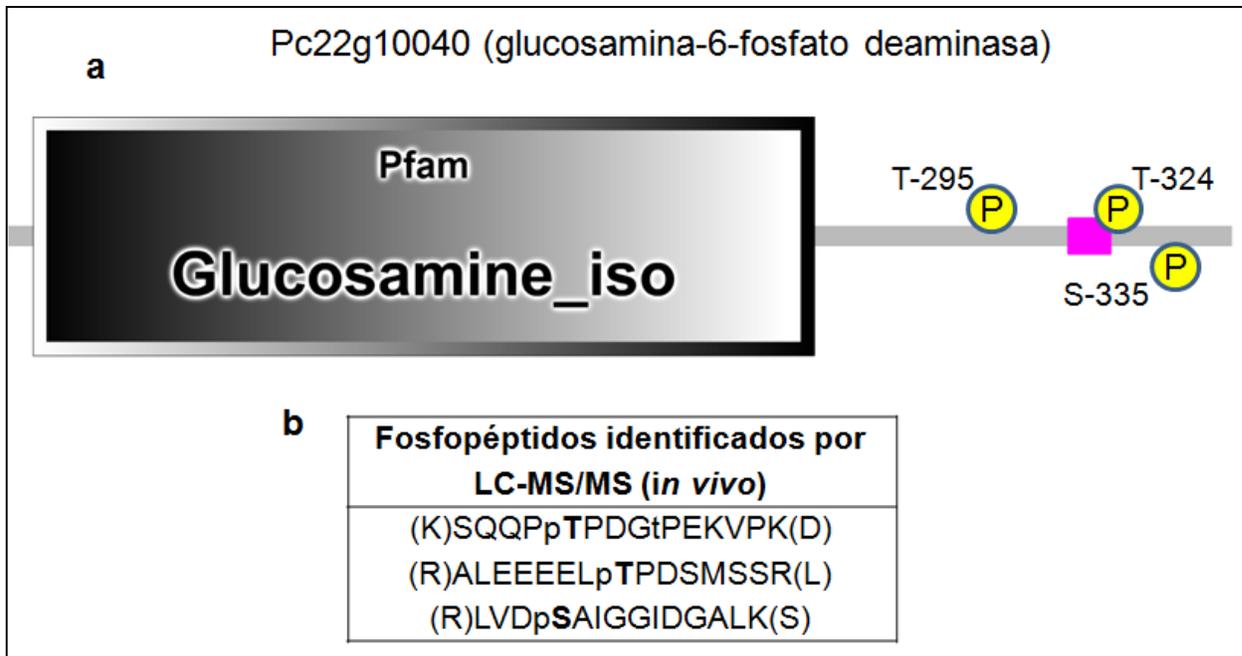


Figura 26. a) Representación gráfica de la proteína Pc22g10040, en la cual se observa el dominio característico de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa. Se muestran los tres sitios fosforilados que fueron identificados por LC-MS/MS. b) Fosfopéptidos identificados *in vivo* (LC-MS/MS). La imagen donde se muestra el dominio de proteína Pc22g10040 fue generada usando el programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de>)

6.4. Análisis fosfoproteómico mediante la técnica LC-MS/MS "Label Free".

Con el propósito de identificar un mayor número de fosfoproteínas en *P. chrysogenum*, así como las diferencias en los patrones de fosforilación en función de la actividad de Pga1, se llevó a cabo un análisis global (shot-gun) por medio de LC-MS/MS, para lo cual se empleó la técnica conocida como "Label Free", la cual se caracteriza por ser relativamente sencilla, ya que básicamente consta de cuatro pasos:

- 1.- Extracción de proteínas
- 2.- Digestión
- 3.- Separación por LC y análisis por MS/MS
- 4.- Análisis de resultados

Además de ser una técnica proteómica en la cual no se realiza separación previa por electroforesis ("gel free"), también presenta la ventaja de no ser necesaria la incorporación de etiqueta a las proteínas o péptidos ("label free"). Esta técnica permite estudios de proteómica cuantitativa a gran escala de una manera relativamente rápida y a bajo costo (Zhu y col., 2010).

En el presente estudio se usó una combinación de cromatografía de afinidad (TiO₂) y LC-MS/MS (Label free) con el fin de investigar la fosforilación de proteínas en *P. chrysogenum*. En general, se identificaron 383 proteínas a partir de 8343 espectros, en el anexo 2 se muestra la tabla con las proteínas identificadas.

6.4.1. Categorización funcional del fosfoproteoma de *P. chrysogenum*.

Se llevó a cabo un análisis de ontología genética (Gene Ontology: GO) mediante la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Todas las proteínas identificadas fueron clasificadas de acuerdo a su proceso biológico y componente celular. La figura 27 muestra la clasificación de proteínas de acuerdo a su proceso biológico identificado en la base de datos Uniprot. De las 383 proteínas identificadas, 238 proteínas pudieron ser clasificadas y puede observarse que la gran mayoría de proteínas fosforiladas se encuentran distribuidas en varios procesos biológicos.

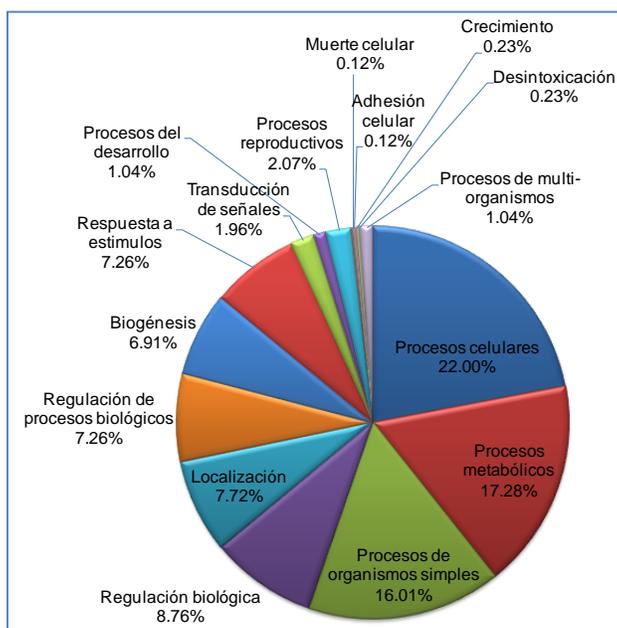


Figura 27. Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo a su proceso biológico (<http://www.uniprot.org>).

Estudios de fosfoproteómica en otros hongos filamentosos han mostrado resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo. En *Aspergillus flavus* se encontró que la mayoría de las proteínas fosforiladas se encuentran en las categorías de procesos celulares y procesos biológicos (Ren y col., 2016), asimismo, más del 70% de las fosfoproteínas del hongo *Beauveria bassiana* se agrupa en las categorías de procesos celulares y procesos biológicos (Wang y col., 2016).

El análisis de componente celular se muestra en la figura 28a, a su vez las proteínas presentes en el núcleo representan el mayor porcentaje del estudio (Figura 28b),

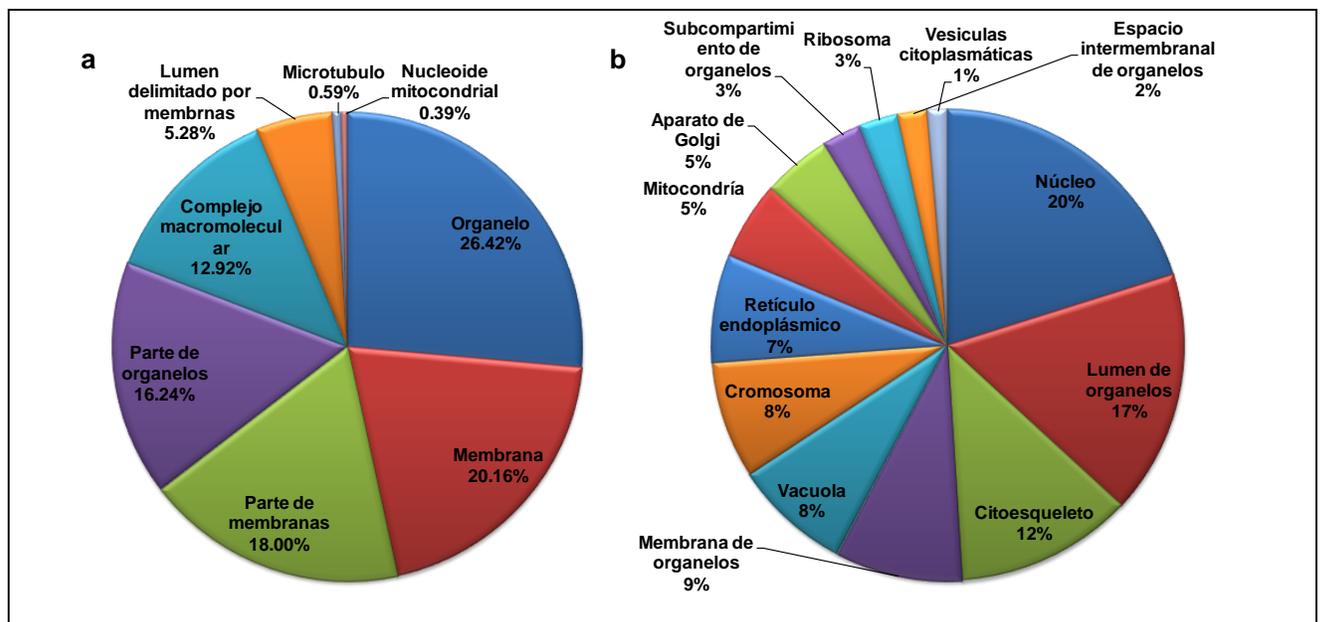


Figura 28. a) Identificación del componente celular en el cual se ubican las proteínas fosforiladas de *P. chrysogenum*. b) Análisis específico del organelo o estructura en el cual realizan su función las proteínas fosforiladas.

La figura 29 muestra el proceso celular específico de las proteínas fosforiladas de *P. chrysogenum*, se puede observar que el grupo con un mayor número de proteínas es el correspondiente al de transporte a través de membrana

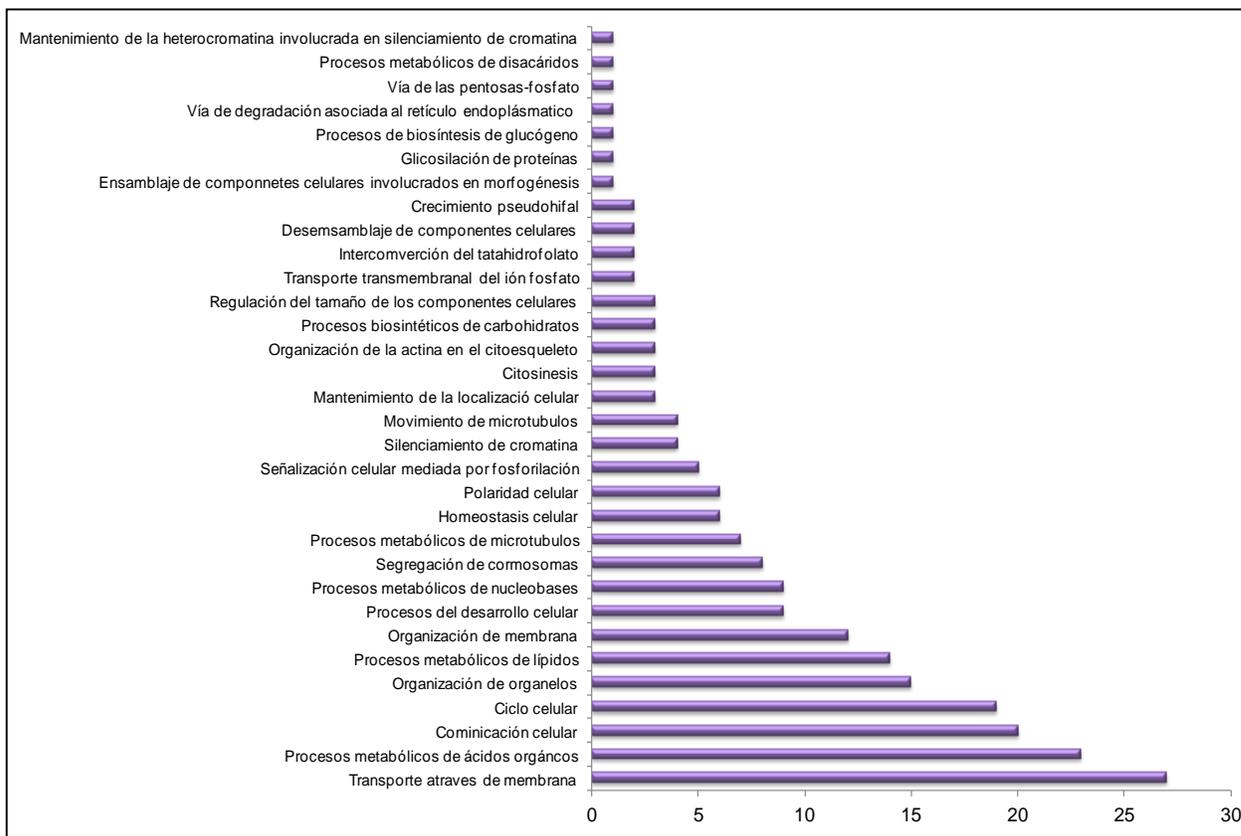


Figura 29. Procesos celulares específicos de las proteínas fosforiladas de *P. chrysogenum*. El análisis de GO (ontología genética) se realizó usando la base de datos Uniprot.

Es interesante observar que varias proteínas fosforiladas están implicadas en procesos celulares involucrados en el crecimiento polarizado y morfogénesis (resultados similares a los obtenidos en el fosfoproteoma de *Aspergillus nidulans*), dado que se observan proteínas fosforiladas cuya función se asocia a organización del citoesqueleto y crecimiento polarizado (**Ramsubramaniam y col., 2014**).

Nuestros resultados sugieren que varios procesos metabólicos son regulados mediante la fosforilación de proteínas, lo que queda de manifiesto en la figura 30a. En ella se puede apreciar que la mayor parte de proteínas fosforiladas corresponden al metabolismo primario. La figura 30b muestra los procesos del metabolismo primario en los que se encuentran las proteínas fosforiladas identificadas en este estudio.

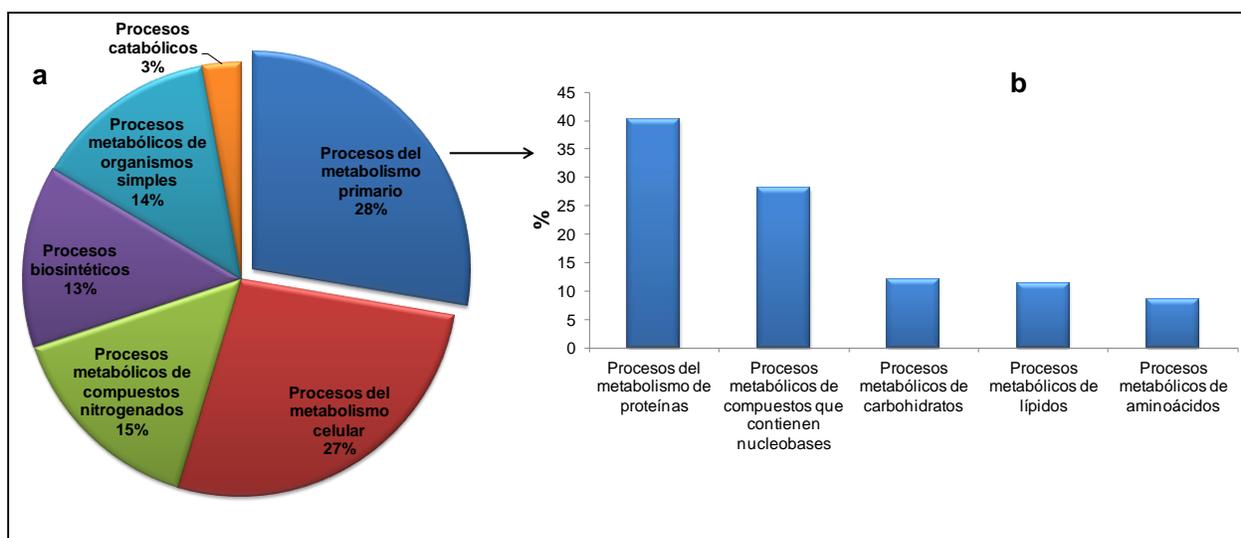


Figura 30. a) Procesos metabólicos de las proteínas fosforiladas de *P. chrysogenum*. b) Procesos del metabolismo primario del fosfoproteoma.

6.4.2. Identificación de factores de transcripción y proteínas con probables funciones epigenéticas.

Los factores de transcripción son proteínas reguladoras de la expresión génica, regularmente se unen a secuencias de ADN de alrededor de 6-12 pb (**Spitz y Furlong, 2012**). Por otra parte, se conoce que las modificaciones de la cromatina juegan un papel muy importante en la regulación de la transcripción (**Brosch y col., 2008**). Los cambios en la expresión génica que no involucran modificaciones en la secuencia de ADN (epigenética) se llevan a cabo mediante la metilación del ADN y la remodelación de la cromatina mediada por la modificación de las histonas (**Aghcheh y col., 2015**). También se sabe que los bromodominios presentes en algunas proteínas juegan un papel muy importante como lectores epigenéticos de la acetilación de histonas, estos dominios están involucrados en la remodelación de la cromatina y la regulación genética (**Ferri y col., 2016**). Sin embargo, aún se desconoce la función exacta de potenciales factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina presentes en los genomas/proteomas de hongos filamentosos. La fosforilación de los factores de transcripción y proteínas

modificadoras de la cromatina puede afectar a la localización celular de estas proteínas, así como a la unión al ADN y a la interacción con otras proteínas **(Whitmarsh y col., 2000)**.

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en conocer la expresión de factores de transcripción en hongos filamentosos bajo distintas condiciones experimentales, son muy pocos (o casi nulos) los trabajos dirigidos a conocer el efecto de la fosforilación en la función de los factores de transcripción de hongos filamentosos. Los resultados del análisis de fosfoproteómica del presente estudio muestran que varios factores de transcripción son fosforilados. La tabla 10 muestra los factores de transcripción y proteínas fosforiladas remodeladoras de la cromatina que fueron identificadas en este trabajo; en esta tabla se puede observar que la proteína Pc22g07210 (factor de transcripción Bdf1) presenta cuatro sitios de fosforilación. De acuerdo con los datos de NCBI y Uniprot, esta proteína presenta dos bromodominios (sub-familia BDF1/BDF2) y un dominio BET (bromodominio extra-terminal) localizado en el carboxilo terminal. En *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína Bdf1 es fosforilada por la proteína cinasa CK2; la fosforilación de Bdf1 podría afectar a la transcripción y la estructura de la cromatina **(Sawa y col., 2004)**. El análisis realizado en NetPhos muestra que los sitios fosforilados en la proteína Pc22g07210 que fueron identificados por LC-MS/MS podrían ser fosforilados por las cinasas PKC (S-410, T-416), Cdk5 (S-411), DNAPK (S-414).

Tabla 10. Factores de transcripción y proteínas remodeladoras de cromatina fosforiladas en *P. chrysogenum*.

Proteína	Nombre	Fosfopéptidos identificados <i>in vivo</i> (LC-MS/MS)
Pc12g10390	Fuerte similitud con el regulador de la reproducción sexual y asexual DopA - <i>Aspergillus nidulans</i>	(R)RQpSIPQLPQPPER(L)
Pc21g21800	Débil similitud con la proteína CRAG - <i>Drosophila melanogaster</i>	(K)TLARLpSITDVADR(Y) (K)TLARLSIpTDVADR(Y) (R)LpSITDVADR(Y) (R)DHGpSFVRPSTR(D) (R)SSpTSMMSVSSSTFPER(S)
Pc22g07210	Fuerte similitud con el factor de transcripción Bdf1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(K)ApSSPQSQTFALGPEGLPVIR(R) (K)ASpSPQSQTFALGPEGLPVIR(R) (K)ASSPQSQpTFALGPEGLPVIR(R) (K)ASSPQpSQTFALGPEGLPVIR(R)
Pc16g10400	Débil similitud con la proteína hipotética YGL131c - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(K)LLDDVADDHDDpSAFDSEK(A) (K)LLDDVADDHDDSAFDpSEK(A) (K)LLDDVADDHDDSAFDpSEKAVVQK(R)
Pc12g06620	Fuerte similitud con la proteína remodeladora de cromatina y regulador transcripcional Rsc8 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> "	(K)KIENTPGSDNPMADAPpSPKPR(N) (K)IENTPGSDNPMADAPpSPKPR(N)
Pc21g11110	Fuerte similitud con la ATPasa tipo-AAA Yta7 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(K)AApSRPvpTPTSQFK(S) (R)TRAPpTEEAEEAELEDLTGR(T) (R)DApSEDIYALTNSGR(H)
Pc22g06240	Débil similitud a una proteína hipotética reguladora de la transcripción - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	(R)GGpTSSPGLGGDANFLAR(D) (R)GGTSpSPGLGGDANFLAR(D) (R)GGTpSSPGLGGDANFLAR(D) (R)GGTpSpSPGLGGDANFLAR(D) (R)KApSFALSPVVGDAER(S)
Pc21g19240	Fuerte similitud con el activador de la transcripción Snf5 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(R)ASLGQpSApTPEPVYHEPR(V) (R)QQYREEpSVDDSDKLIVR(L)
Pc12g11270	Fuerte similitud con la proteína hipotética contig1492_0.tfa_1860cg - <i>Aspergillus fumigatus</i>	(K)RPpTSSSATKPTTGTSR(T) (K)RPTpSSSATKPTTGTSR(T) (K)LQAEISALQSSpSK(A) (K)SSPEVSKEpSPAASPAK(A) (R)TATSTSTpTRPATARPTSTTSTVR(S)
Pc21g19170	Similar a la subunidad de la proteína remodeladora de la cromatina Isw2 perteneciente a complejo Itc1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(R)APpSPPPVKYPIEDLDLAPNPEK(Q)
Pc22g02170	Baja similitud con el regulador de la utilización de purina uaY - <i>Aspergillus nidulans</i>	(K)MLETAASMpSLR(Q)
Pc13g04820	Fuerte similitud con la proteína hipotética An05g00610 - <i>Aspergillus niger</i>	(R)RRpSNENLGVR(G) (K)SLVDSPTpSQQLpSPSMMHSAGR(A)
Pc20g07510	Fuerte similitud con la proteína reguladora Leu3 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(R)HVSVPVEpSHSSIATPLTMK(R)
Pc21g19860	Fuerte similitud con la proteína reguladora amdX - <i>Aspergillus nidulans</i>	(R)KYpSQPASGLLSNR(E) (R)RDpSIADLGVSDLAIK(T)
Pc22g06860	Fuerte similitud con la histona-acetiltransferasa An04g05760 - <i>Aspergillus niger</i>	(K)ApSSIEAEEHTPVLR(K) (K)ASpSIEAEEHTPVLR(K)

La proteína Pc12g10390 presenta un sitio de fosforilación en la S-1077 (tabla 8) el cual podría ser fosforilado por PKA (NetPhos). Esta proteína es similar al regulador DopA, que regula la morfología celular en *Aspergillus nidulans* (Pascon y col., 2000). La delección del gen *dopA* modifica la transcripción de genes reguladores del ciclo sexual y asexual como lo son *brlA*, *abaA* y *steA* (Pascon y col., 2000). Como se mencionó anteriormente, la proteína Pc12g10390 presenta un sitio putativo de fosforilación por PKA, por lo que podría ser un efector intermediario entre la vía de Pga1-PKA con el factor de transcripción BrlA.

Otro factor de transcripción que presenta un probable sitio de fosforilación por PKA es la proteína Pc21g19860 (S-951, ver tabla 10). Esta proteína es muy similar al factor de transcripción AmdX de *Aspergillus nidulans*, el cual ejerce una regulación de la transcripción del gen *amdS* (que codifica la enzima acetoaminidasa, involucrada en el metabolismo del nitrógeno) (Murphy y col., 1997). El promotor del gen *amdS* presenta un sitio de unión para el factor de transcripción CreA, el cual es similar al sitio de reconocimiento del factor de transcripción AmdX (Murphy y col., 1997). Es probable que la vía de las proteínas G/PKA forme parte de la regulación de nitrógeno, ya que estudios previos muestran que la vía RAS2/PKA en *Saccharomyces cerevisiae* regula la asimilación de nitrógeno (Sáenz y col., 1997).

6.4.3. Fosforilación diferencial de factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina

En análisis fosfoproteómico permitió identificar cambios en los patrones de fosforilación de factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina, La tabla 11 muestra los cambios de fosforilación en dichas proteínas.

Tabla 11. Cambios en los patrones de fosforilación de los factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina.

Proteína	Cambios en los patrones de fosforilación
Pc16g10400	pS-738 presente en todas las condiciones, pS-742 solo presente en <i>Δpga1</i>
Pc21g21800	pS-745 presente en todas las condiciones, pS-10 solo presente en <i>Δpga1</i> +AMPc, pT-848 solo presente en Wis-54-1255
Pc22g07210	pS-410 y pS-411 presentes en todas las condiciones, pS-414 solo en las cepa <i>Δpga1</i> y en la condición <i>Δpga1</i> +AMPc, pT-416 solo presente en Wis-54-1255
Pc12g06620	pS-60 presente en Wis 54-1255 y <i>Δpga1</i> +AMPc, no se encontró fosforilación en <i>Δpga1</i>
Pc21g11110	pS-1313 y pS-1317 presentes en todas las condiciones, pS-156 y pS-393 solo están presentes en <i>Δpga1</i> +AMPc
Pc22g06240	pS-588 presente en <i>Δpga1</i> y <i>Δpga1</i> +AMPc, pT-587 y pS-64 solo están presentes en <i>Δpga1</i> +AMPc, no se encontró fosforilación en Wis 54-1255
Pc21g19240	pS-66 y pT-68 solo están presentes en Wis 54-1255 y <i>Δpga1</i> , no se encontró fosforilación en <i>Δpga1</i> +AMPc

Como se puede observar en la tabla 11, la proteína Pc16g10400 presenta dos sitios fosforilados, el sitio pS-738 está presente en todas las condiciones, sin embargo el sitio pS-742 solo se encontró en la cepa *Δpga1*, la figura 31 muestra los dominios y los sitios de fosforilación identificados en esta proteína

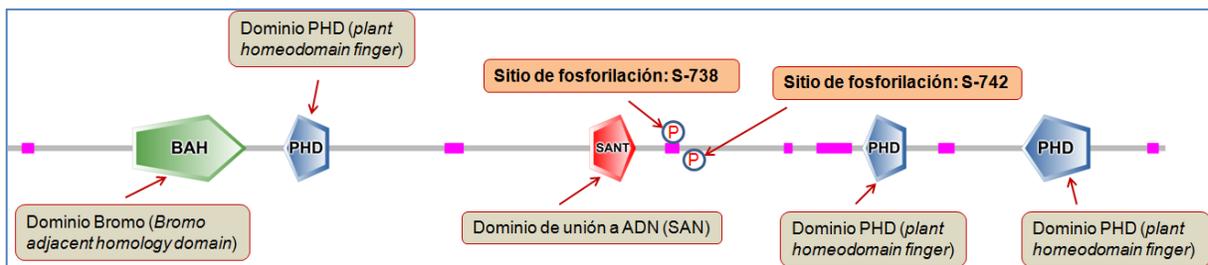


Figura 31. Esquema de la proteína Pc16g10400. Se observan los tres dominios PHD (caracterizados como Cys₄HisCys₃), además del dominio Bromo. Se muestran los sitios de fosforilación identificados por LC-MS/MS.

Los Dominios PHD son conocidos por modular la transcripción génica, recientemente se ha observado que dichos dominios son "*lectores*" epigenéticos, capaces de reconocer el patrón de modificaciones postraduccionales de las histonas y reclutando proteínas reguladoras y factores de transcripción, controlando de esta manera la expresión génica (**Sánchez y Zoo, 2011**).

6.5. Obtención de los plásmidos para el silenciamiento de los genes Pc22g17420 y Pc22g05690.

Con el fin de profundizar en la caracterización de la vía de señalización mediada por Pga1, se decidió estudiar la función de dos proteínas identificadas en el análisis 2D-DIGE que presentaban un patrón de expresión similar en función de la actividad de Pga1 (Figs. 19 y 20), y que contienen dominios típicos de interacción con otras proteínas, lo que las hace candidatas a ser efectores de vías de señalización. Estas dos proteínas son Pc22g17420 (contiene un dominio Ankyrin repeats) y Pc22g05690 (contiene un dominio PH, pleckstrin homology). La caracterización se ha iniciado con el silenciamiento de los dos genes mediante una estrategia basada en la vía RNAi. Se utilizó el plásmido pJL43-RNAi (**Ullán y col., 2008**) para obtener fragmentos dsRNA de ambos genes que desencadenen la vía de silenciamiento RNAi. Las construcciones se muestran en la figura 32.

El plásmido pJL43-RNAi ha sido empleado en el silenciamiento de los genes *pcbC*, *pcrfx1*, *creA* y *pcfkh1* de *P. chrysogenum* (**Ullán y col., 2008, Domínguez-Santos y col., 2012, Cepeda-García y col., 2014, Domínguez-Santos y col., 2015**); con este vector ha sido posible también el silenciamiento del gen *cefEF* de *Acremonium chrysogenum* (**Ullán y col., 2008**) y el gen *pcz1* de *Penicillium roqueforti* (**Gil-Durán y col., 2015**).

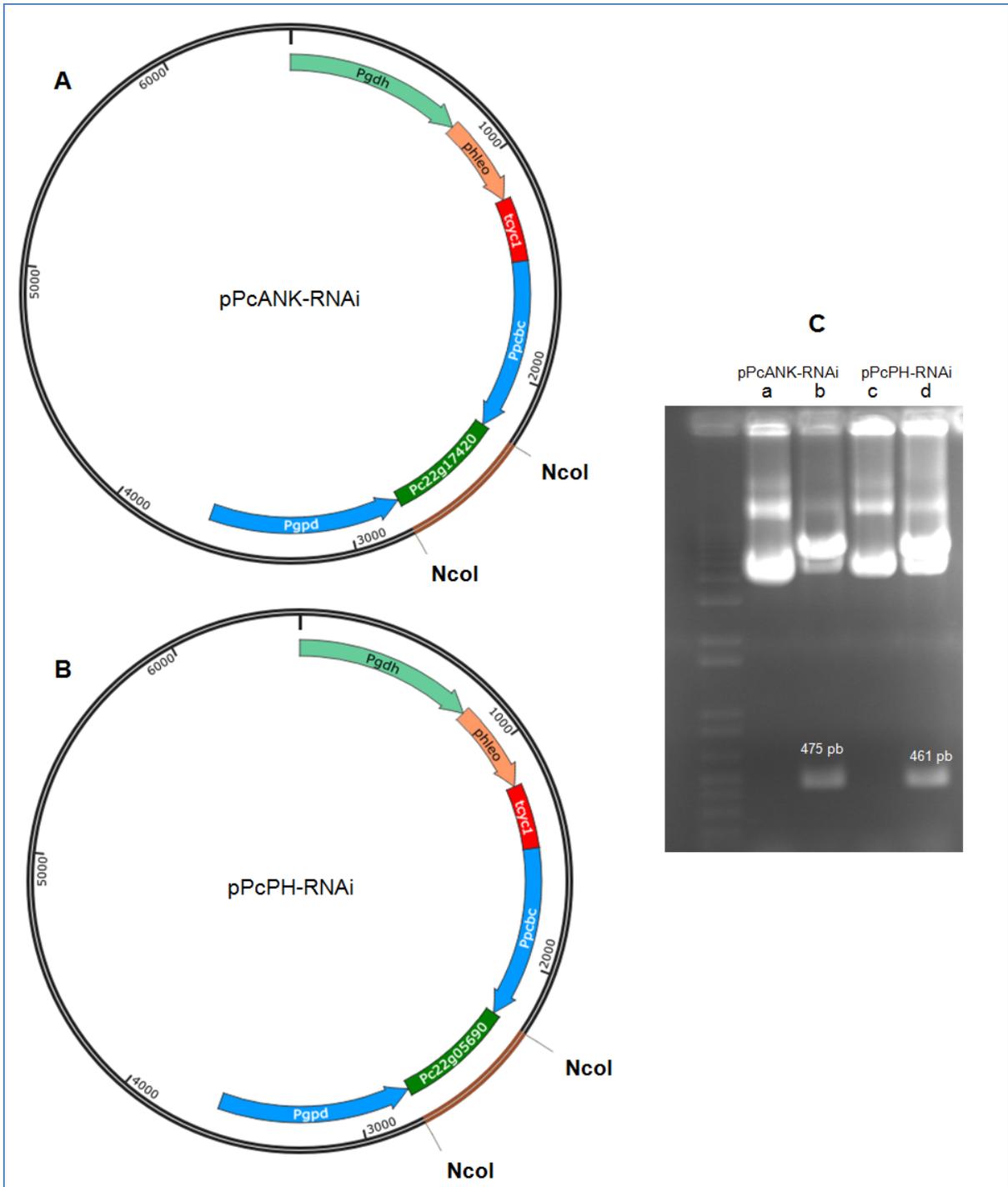


Figura 32. Construcción de los plásmidos para el silenciamiento de los dos genes. A) Mapa del plásmido pPcANK-RNAi (para silenciar el gen Pc22g17420, B) Mapa del plásmido pPcPH-RNAi (para silenciar el gen Pc22g05690. C) Lisis alcalina del plásmido pPcANK-RNAi (a) y del plásmido pPcPH-RNAi (c), digestión con *NcoI*: pPcANK-RNAi (b), pPcPH-RNAi (d).

6.5.1. Transformación de *P. chrysogenum* con los plásmidos pPcANK-RNAi y pPcPH-RNAi.

Con el fin de silenciar los genes Pc22g17420 y Pc22g05640 se construyeron los plásmidos pPcANK-RNAi y pPcPH-RNAi a partir del plásmido pJL43-RNAi (Figura 33). Para confirmar la presencia de los plásmidos en el genoma de las cepas transformantes se extrajo ADN genómico de las transformantes y se llevó a cabo una PCR con los oligos que hibridan en los promotores *Ppcbc* y *Pgpd* de los plásmidos construidos. La figura 33 y 34 muestra los productos de PCR de los transformantes positivos.

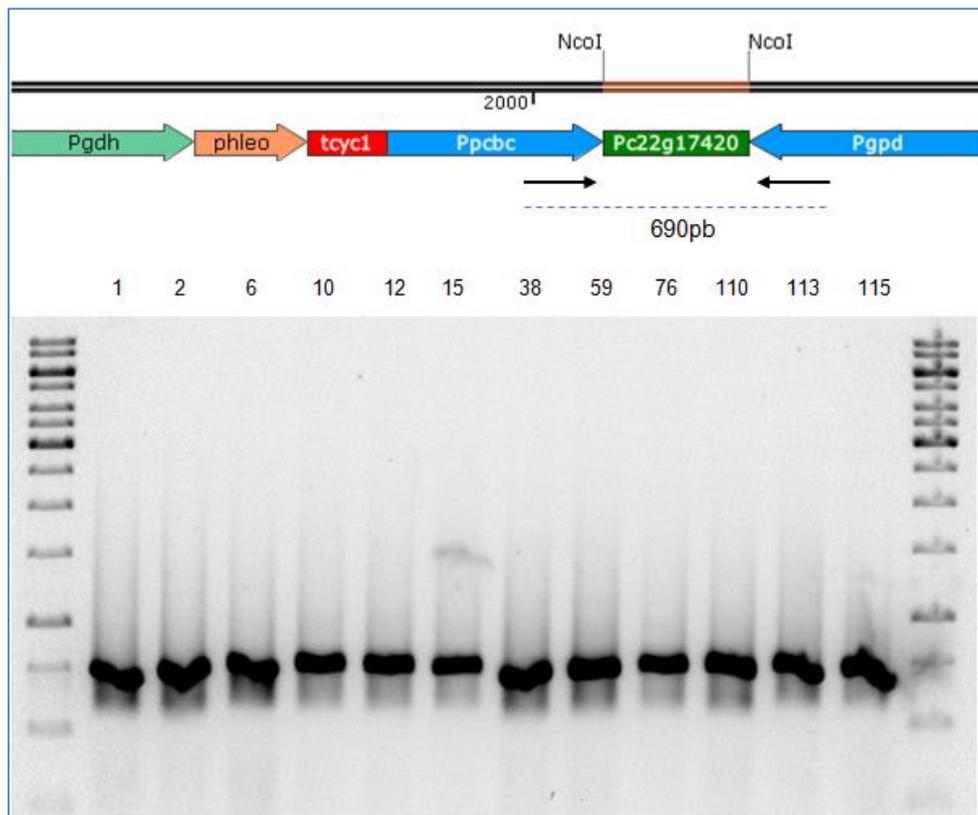


Figura 33. Gel de agarosa de los productos de PCR que muestra la integración completa del cassette de silenciamiento en los transformantes de *Pencillium chrysogenum*, transformados con el plásmido pPcANK-RNAi (silenciamiento del gen *Pc22g17420*). Cada línea representa el número de transformante positivo.

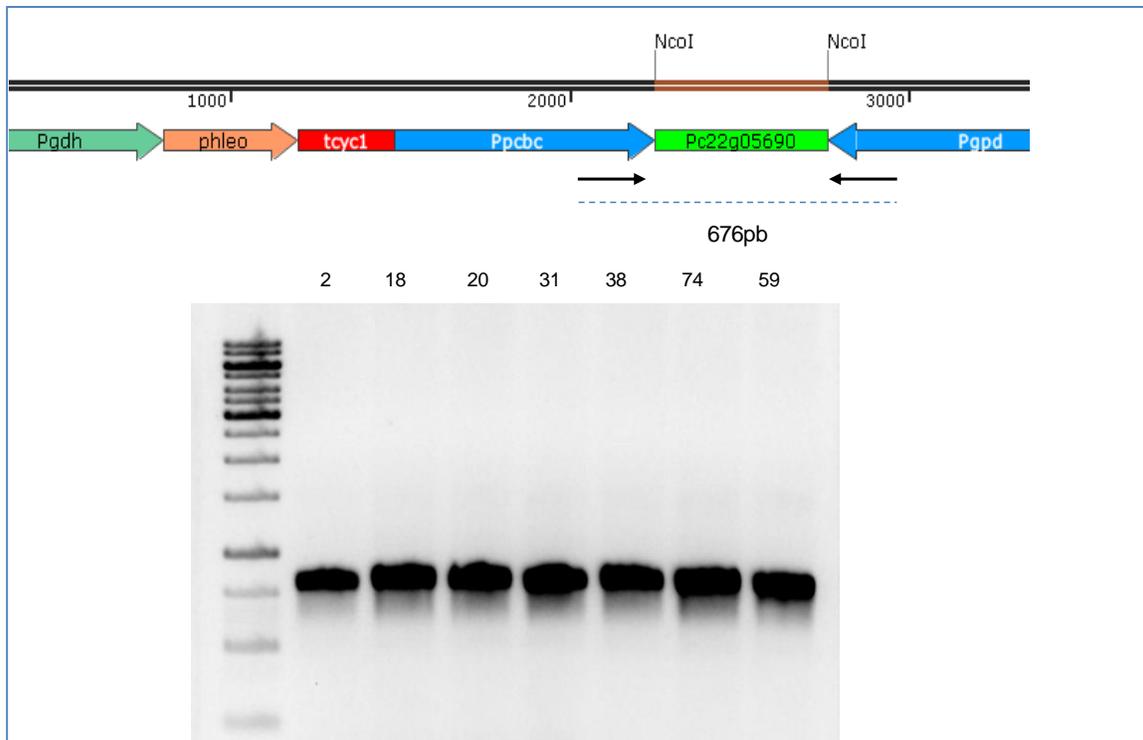


Figura 34. Gel de agarosa de los productos de PCR que muestra la integración completa del cassette de silenciamiento en los transformantes de *Pencillium chrysogenum*, transformados con el plásmido pPcPH-RNAi (silenciamiento del gen *Pc22g05690*). Cada línea representa el número de transformante positivo.

Una de las perspectivas del presente estudio, es la caracterización del fenotipo y de la producción de penicilina en los transformantes, con el fin de conocer la función de estos dos genes.

7. CONCLUSIONES.

El análisis proteómico de las cepas con diferentes niveles de actividad de la subunidad $G\alpha$ Pga1 ha permitido identificar posibles nuevos efectores de la vía de señalización mediada por esta subunidad.

El uso de la condición $\Delta pga1 + AMPc$ ha permitido distinguir la señalización dependiente e independiente de AMPc.

Los resultados de este estudio proteómico sugieren que la vía de señalización mediada por Pga1 regula la biosíntesis de penicilina mediante la regulación de la abundancia de proteínas involucradas en la biosíntesis de cisteína, ATP y NADPH, tres compuestos requeridos para una elevada producción de penicilina.

Se identificaron dos proteínas probablemente involucradas en vías de transducción de señales, Pc22g17420, que contiene un dominio *Ankyrin repeats*, y Pc22g05690, que contiene un dominio PH, *pleckstrin homology*.

El análisis de fosfoproteómica muestra cambios en la abundancia de proteínas fosforiladas en función de $G\alpha$ Pga1. Se identificaron factores de transcripción y proteínas remodeladoras de cromatina que presentan varios sitios de fosforilación. Dos factores de transcripción previamente estudiados en otros hongos contienen sitios putativos de fosforilación por PKA, lo que indica que estas proteínas probablemente formen parte de la vía de proteínas G-PKA.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207.
2. Aghcheh RK, Kubicek CP. Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Aug;99(15):6167-81.
3. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003 Jan;3(1):36-44.
4. Anderson JC, Peck SC. Detection of protein phosphorylation and charge isoforms using vertical one-dimensional isoelectric focusing gels. *Methods Mol Biol*. 2014;1171:39-46.
5. Andrianopoulos A, Brons J, Davis MA, Hynes MJ. The amdA regulatory gene of *Aspergillus nidulans*: characterization of gain-of-function mutations and identification of binding sites for the gene product. *Fungal Genet Biol*. 1997 Feb;21(1):50-63.
6. Barber M, Bordoli RS, Elliott GJ, Sedgwick RD, Tyler AN. Fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem*. 1982, 54 (4): 645-657.
7. Bartoszewska M, Kiel JA, Bovenberg RA, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy deficiency promotes β -lactam production in *P. chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Feb;77(4):1413-22.
8. Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer S, Kwon NJ, Keller NP, Yu JH, Braus GH. VeIB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*. 2008 Jun 13;320(5882):1504-6.
9. Beck R, Rawet M, Wieland FT, Cassel D. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett*. 2009 Sep 3;583(17):2701-9.

10. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999 Dec 17;294(5):1351-62.
11. Bok JW, Keller NP. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell.* 2004 Apr;3(2):527-35.
12. Bork P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally?. *Proteins.* 1993 Dec;17(4):363-74.
13. 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 May 7;72:248-54.
14. Brakhage AA, Schroeckh V. Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol.* 2011 Jan;48(1):15-22.
15. Brakhage AA, Spröte P, Al-Abdallah Q, Gehrke A, Plattner H, Tüncher A. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2004; 88:45-90.
16. Brakhage AA. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(1):21-32.
17. Brosch G, Loidl P, Graessle S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 May;32(3):409-39.
18. Candiano G1, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 2004 May;25(9):1327-33.
19. Cepeda-García C, Domínguez-Santos R, García-Rico RO, García-Estrada C, Cajiao A, Fierro F, Martín JF. Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the pcbAB gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Aug;98(16):7113-24.
20. Chahrour O, Cobice D, Malone J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Sep 10;113:2-20.
21. Chandler JM, Treece ER, Trenary HR, Brenneman JL, Flickner TJ, Frommelt JL, Oo ZM, Patterson MM, Rundle WT, Valle OV, Kim TD, Walker GR, Cooper CR

- Jr. Protein profiling of the dimorphic, pathogenic fungus, *Penicillium marneffe*. *Proteome Sci.* 2008 Jun 4;6:17. doi: 10.1186/1477-5956-6-17.
22. Chang MH, Chae KS, Han DM, Jahng KY. The GanB G α -protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 2004 Jul;167(3):1305-15.
 23. Chang SC, Heacock PN, Mileykovskaya E, Voelker DR, Dowhan W. Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1998 Jun 12;273(24):14933-41.
 24. Chen G, Pramanik BN, Liu YH, Mirza UA. Applications of LC/MS in structure identifications of small molecules and proteins in drug discovery. *J Mass Spectrom.* 2007 Mar;42(3):279-87.
 25. Choudhary C, Mann M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Jun;11(6):427-39.
 26. Corrales Escobosa AR, Rangel Porras RA, Meza Carmen V, Gonzalez Hernandez GA, Torres Guzman JC, Wrobel K, Wrobel K, Roncero MI, Gutierrez Corona JF. *Fusarium oxysporum* Adh1 has dual fermentative and oxidative functions and is involved in fungal virulence in tomato plants. *Fungal Genet Biol.* 2011 Sep;48(9):886-95.
 27. Cytryńska M, Frajnt M, Jakubowicz T. *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate kinase Pyk1 is PKA phosphorylation substrate in vitro. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Sep 25;203(2):223-7.
 28. De Groot MJ, Daran-Lapujade P, van Breukelen B, Knijnenburg TA, de Hulster EA, Reinders MJ, Pronk JT, Heck AJ, Slijper M. Quantitative proteomics and transcriptomics of anaerobic and aerobic yeast cultures reveals post-transcriptional regulation of key cellular processes. *Microbiology.* 2007 Nov;153(Pt 11):3864-78.
 29. De Oliveira JMPF, de Graaff LH. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Jan;89(2):225-37.
 30. Domínguez-Santos R, García-Estrada C, Kosalková K, Prieto C, Santamarta I, Martín JF. PcFKH1, a novel regulatory factor from the forkhead family, controls the biosynthesis of penicillin in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie.* 2015 Aug;115:162-76.

31. Domínguez-Santos R, Martín JF, Kosalková K, Prieto C, Ullán RV, García-Estrada C. The regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes of β -lactam biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol.* 2012 Nov;49(11):866-81.
32. Doyle S. Fungal proteomics: from identification to function. *FEMS Microbiol Lett.* 2011 Aug;321(1):1-9.
33. Espeso EA, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 1993 Oct;12(10):3947-56.
34. Evans C, Noirel J, Ow SY, Salim M, Pereira-Medrano AG, Couto N, Pandhal J, Smith D, Pham TK, Karunakaran E, Zou X, Biggs CA, Wright PC. An insight into iTRAQ: where do we stand now?. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Sep;404(4):1011-27.
35. Fadri M, Daquinag A, Wang S, Xue T, Kunz J. The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol Biol Cell.* 2005 Apr;16(4):1883-900.
36. Feierbach B, Verde F, Chang F. Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol.* 2004 Jun 7;165(5):697-707.
37. Ferri E, Petosa C, McKenna CE. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2016 Apr 15;106:1-18.
38. Flaherty JE, Dunkle LD. Identification and expression analysis of regulatory genes induced during conidiation in *Exserohilum turcicum*. *Fungal Genet Biol.* 2005 May;42(5):471-81.
39. Flaherty JE, Dunkle LD. Identification and expression analysis of regulatory genes induced during conidiation in *Exserohilum turcicum*. *Fungal Genet Biol.* 2005 May;42(5):471-81.
40. Florens L, Washburn MP. Proteomic analysis by multidimensional protein identification technology. *Methods Mol Biol.* 2006;328:159-75.
41. Fridgen T, McMahon T. Fundamentals of and Applications to Organic (and Organometallic) Compounds. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry.* 2005; 4: 327-337.

42. Fried H, Kutay U. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Aug;60(8):1659-88.
43. Fuller KK, Zhao W, Askew DS, Rhodes JC. Deletion of the protein kinase A regulatory subunit leads to deregulation of mitochondrial activation and nuclear duplication in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2009 Mar;8(3):271-7.
44. García-Estrada C, Barreiro C, Jami MS, Martín-González J, Martín JF. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine cause the reprogramming of metabolism in *Penicillium chrysogenum*, leading to multiple vesicles and penicillin overproduction. *J Proteomics.* 2013 Jun 24;85:129-59.
45. García-Rico RO, Fierro F, Martín JF. Heterotrimeric G α protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. *Biochem Cell Biol.* 2008b Feb;86(1):57-69.
46. García-Rico RO, Fierro F, Mauriz E, Gómez A, Fernández-Bodega MA, Martín JF. The heterotrimeric G α protein pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology.* 2008a Nov;154(Pt 11):3567-78.
47. García-Rico RO, Martín JF, Fierro F. Heterotrimeric G α protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genet Biol.* 2011 Jun;48(6):641-9.
48. 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 Jun;158(5):437-46.
49. Gautam P, Shankar J, Madan T, Sirdeshmukh R, Sundaram CS, Gade WN, Basir SF, Sarma PU. Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Dec;52(12):4220-7.
50. Gibson TJ1, Hyvönen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci.* 1994 Sep;19(9):349-53.

51. Grant CM, Collinson LP, Roe JH, Dawes IW. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol.* 1996 Jul;21(1):171-9.
52. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Mar;66(1):39-63.
53. Griffiths J. A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008 Aug 1;80(15):5678-83.
54. Griffiths WJ, Wang Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem Soc Rev.* 2009 Jul;38(7):1882-96.
55. Grosse C, Heinekamp T, Kniemeyer O, Gehrke A, Brakhage AA. Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Aug;74(15):4923-33.
56. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9390-5.
57. 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 Oct;17(10):994-9.
58. Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1720-30.
59. Haas H, Marzluf GA. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Curr Genet.* 1995 Jul;28(2):177-83.
60. Hjerrild M, Gammeltoft S. Phosphoproteomics toolbox: computational biology, protein chemistry and mass spectrometry. *FEBS Lett.* 2006 Sep 4;580(20):4764-70.
61. Ingley E, Hemmings BA. Pleckstrin homology (PH) domains in signal transduction. *J Cell Biochem.* 1994 Dec;56(4):436-43.
62. 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*. 2010a Jun;9(6):1182-98.
63. Jami MS, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado AA, Salehi-Najafabadi Z, Martín JF. The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. *Mol Cell Proteomics*. 2010b Dec;9(12):2729-44.
 64. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jun;7(6):391-403.
 65. Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N, Greenberg ML. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):22387-94.
 66. Jørgensen H, Nielsen J, Villadsen J, Møllgaard H. Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnol Bioeng*. 1995 Apr 20;46(2):117-31.
 67. Kaufmann H, Bailey JE, Fussenegger M. Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2001 Feb;1(2):194-9.
 68. Kauko O, Laajala TD, Jumppanen M, Hintsanen P, Suni V, Haapaniemi P, Corthals G, Aittokallio T, Westermarck J, Imanishi SY. Label-free quantitative phosphoproteomics with novel pairwise abundance normalization reveals synergistic RAS and CIP2A signaling. *Sci Rep*. 2015 Aug 17;5:13099.
 69. Kelly JM, Drysdale MR, Sealy-Lewis HM, Jones IG, Lockington RA. Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically induced and post-transcriptionally regulated. *Mol Gen Genet*. 1990 Jul;222(2-3):323-8.
 70. Kim JA, Yeh DC, Ver M, Li Y, Carranza A, Conrads TP, Veenstra TD, Harrington MA, Quon MJ. Phosphorylation of Ser24 in the pleckstrin homology domain of insulin receptor substrate-1 by Mouse Pelle-like kinase/interleukin-1 receptor-associated kinase: cross-talk between inflammatory signaling and insulin signaling that may contribute to insulin resistance. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):23173-83.

71. Kim MS, Pandey A. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics*. 2012 Feb;12(4-5):530-42.
72. Kleijn RJ1, Liu F, van Winden WA, van Gulik WM, Ras C, Heijnen JJ. Cytosolic NADPH metabolism in penicillin-G producing and non-producing chemostat cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Metab Eng*. 2007 Jan;9(1):112-23.
73. Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev Proteomics*. 2011 Feb;8(1):81-94.
74. Kosalková K, García-Estrada C, Ullán RV, Godio RP, Feltrer R, Teijeira F, Mauriz E, Martín JF. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*. 2009 Feb;91(2):214-25.
75. Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Teunissen AW, Donaton MC, Van Dijck P, Winderickx J, de Winde JH, Thevelein JM. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol*. 1999 Jun;32(5):1002-12.
76. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
77. Lafon A, Seo JA, Han KH, Yu JH, d'Enfert C. The heterotrimeric G-protein GanB(alpha)-SfaD(beta)-GpgA(gamma) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2005 Sep;171(1):71-80. Epub 2005 Jun 8.
78. Lee J, Reiter W, Dohnal I, Gregori C, Beese-Sims S, Kuchler K, Ammerer G, Levin DE. MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators. *Genes Dev*. 2013 Dec 1;27(23):2590-601.
79. Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*. 2000 Aug 15;350 Pt 1:1-18.
80. Li L, Wright SJ, Krystofova S, Park G, Borkovich KA. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:423-52.

81. Li S, Dabir A, Misal SA, Tang H, Radivojac P, Reilly JP. Impact of Amidination on Peptide Fragmentation and Identification in Shotgun Proteomics. *J Proteome Res.* 2016 Oct 7;15(10):3656-3665.
82. Lin D, Tabb DL, Yates JR III. Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Mar 21;1646(1-2):1-10.
83. Lints R, Davis MA, Hynes MJ. The positively acting *amdA* gene of *Aspergillus nidulans* encodes a protein with two C2H2 zinc-finger motifs. *Mol Microbiol.* 1995 Mar;15(5):965-75.
84. López JL. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Apr 15;849(1-2):190-202.
85. Ma B, Johnson R. De novo sequencing and homology searching. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Feb;11(2):O111.014902.
86. Madi L, McBride SA, Bailey LA, Ebbole DJ. *rco-3*, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics.* 1997 Jun;146(2):499-508.
87. Makarov, A., Denisov, E., Lange, Horning S. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006. 17: 977.
88. Mao K, Wang K, Zhao M, Xu T, Klionsky DJ. wo MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 2011 May 16;193(4):755-67.
89. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005 Jun;382(3):669-78.
90. Martín J, García-Estrada C, Kosalková K, Ullán RV, Albillos SM, Martín JF. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine produce a drastic increase in the expression of the penicillin biosynthetic genes for prolonged time, mediated by the *laeA* regulator. *Fungal Genet Biol.* 2012 Dec;49(12):1004-13.
91. Martín J, García-Estrada C, Rumbero A, Recio E, Albillos SM, Ullán RV, Martín JF. Characterization of an autoinducer of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Aug 15;77(16):5688-96.

92. Martín JF. Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J Bacteriol.* 2000 May;182(9):2355-62.
93. Mithoe SC, Menke FL. Phosphoproteomics perspective on plant signal transduction and tyrosine phosphorylation. *Phytochemistry.* 2011 Jul;72(10):997-1006.
94. Moco S, Vervoort J. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends Analyt Chem.* 2007 Oct; 26(9): 855–866.
95. Mogensen J, Nielsen HB, Hofmann G, Nielsen J. Transcription analysis using high-density micro-arrays of *Aspergillus nidulans* wild-type and creA mutant during growth on glucose or ethanol. *Fungal Genet Biol.* 2006 Aug;43(8):593-603. Epub 2006 May 15.
96. Murphy RL, Andrianopoulos A, Davis MA, Hynes MJ. Identification of amdX, a new Cys-2-His-2 (C2H2) zinc-finger gene involved in the regulation of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 1997 Feb;23(3):591-602.
97. Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem Sci.* 1993 Sep;18(9):343-8.
98. Nakamura-Kubo M, Hirata A, Shimoda C, Nakamura T. The fission yeast pleckstrin homology domain protein Spo7 is essential for initiation of forespore membrane assembly and spore morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 2011 Sep;22(18):3442-55.
99. Nasution U, van Gulik WM, Ras C, Proell A, Heijnen JJ. A metabolome study of the steady-state relation between central metabolism, amino acid biosynthesis and penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Metab Eng.* 2008 Jan;10(1):10-23.
100. Navarro E, Peñaranda A, Hansberg W, Torres-Martínez S, Garre V. A white collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet Biol.* 2013 Mar;52:42-52.

101. Neuberger G, Schneider G, Eisenhaber F. pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biol Direct*. 2007 Jan 12;2:1.
102. Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2006 May;72(5):3448-57.
103. Oh YT, Ahn CS, Kim JG, Ro HS, Lee CW, Kim JW. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 2010 Mar;47(3):246-53.
104. Ozcengiz G, Demain AL. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnol Adv*. 2013; 31(2):287-311.
105. 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 Jun;36(6):1250-64.
106. Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom*. 2001 Oct;36(10):1083-91.
107. Portela P, Howell S, Moreno S, Rossi S. In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J Biol Chem*. 2002 Aug 23;277(34):30477-87.
108. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics*. 2010 Oct 10;73(11):2064-77.
109. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics*. 2011 Sep 6;74(10):1829-41.
110. Ramsubramaniam N, Harris SD, Marten MR. The phosphoproteome of *Aspergillus nidulans* reveals functional association with cellular processes involved in morphology and secretion. *Proteomics*. 2014 Nov;14(21-22):2454-9.
111. Ren S, Yang M, Li Y, Zhang F, Chen Z, Zhang J, Yang G, Yue Y, Li S, Ge F, Wang S. Global phosphoproteomic analysis reveals the involvement of

phosphorylation in aflatoxins biosynthesis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. Sci Rep. 2016 Sep 26;6:34078.

112. Revilla G, Ramos FR, López-Nieto MJ, Alvarez E, Martín JF. Glucose represses formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. J Bacteriol. 1986 Nov;168(2):947-52.
113. Rigbolt KT, Blagoev B. Quantitative phosphoproteomics to characterize signaling networks. Semin Cell Dev Biol. 2012 Oct;23(8):863-71.
114. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. FEMS Yeast Res. 2002 May;2(2):183-201.
115. Sáenz DA, Chianelli MS, Stella CA, Mattoon JR, Ramos EH. RAS2/PKA pathway activity is involved in the nitrogen regulation of L-leucine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Biochem Cell Biol. 1997 Mar;29(3):505-12.
116. Sanchez R, Zhou MM. The PHD finger: a versatile epigenome reader. Trends Biochem Sci. 2011 Jul;36(7):364-72.
117. Sawa C, Nedea E, Krogan N, Wada T, Handa H, Greenblatt J, Buratowski S. Bromodomain factor 1 (Bdf1) is phosphorylated by protein kinase CK2. Mol Cell Biol. 2004 Jun;24(11):4734-42.
118. Scheffzek K, Welti S. Pleckstrin homology (PH) like domains - versatile modules in protein-protein interaction platforms. FEBS Lett. 2012 Aug 14;586(17):2662-73.
119. 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 Feb;157(2):591-600.
120. Smith DJ, Burnham MK, Bull JH, Hodgson JE, Ward JM, Browne P, Brown J, Barton B, Earl AJ, Turner G. β -lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. EMBO J. 1990 Mar;9(3):741-7.
121. 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 May;17(5):456-66.

122. Spitz F, Furlong EE. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet.* 2012 Sep;13(9):613-26.
123. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Sep;5(9):699-711.
124. Stefan E, Malleshaiah MK, Breton B, Ear PH, Bachmann V, Beyermann M, Bouvier M, Michnick SW. PKA regulatory subunits mediate synergy among conserved G-protein-coupled receptor cascades. *Nat Commun.* 2011 Dec 20;2:598.
125. Suárez T, Peñalva MA. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB-pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol Microbiol.* 1996 May;20(3):529-40.
126. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 29;101(26):9528-33.
127. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.
128. Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R. Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell.* 2008 Jan;19(1):339-51.
129. 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 Nov;7(11):1916-29.
130. Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR. Peptide mass fingerprinting. *Methods.* 2005 Mar;35(3):237-47.
131. Tichy A, Salovska B, Rehulka P, Klimentova J, Vavrova J, Stulik J, Hernychova L. Phosphoproteomics: searching for a needle in a haystack. *J Proteomics.* 2011 Nov 18;74(12):2786-97.

- 132.** Ullán RV, Godio RP, Teijeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltrer R, Kosalkova K, Martín JF. RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression. *J Microbiol Methods*. 2008 Oct;75(2):209-18.
- 133.** Vaiskunaite R, Kozasa T, Voyno-Yasenetskaya TA. Interaction between the G α subunit of heterotrimeric G(12) protein and Hsp90 is required for G α (12) signaling. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):46088-93.
- 134.** Van de Kamp M, Driessen AJ, Konings WN. Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999 Jan-Feb;75(1-2):41-78.
- 135.** Van Den Berg M, Gidijala L, Kiela J, Bovenberg R, Vander K. Biosynthesis of active pharmaceuticals: β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2010; 27:1-32.
- 136.** Van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen AJ, Garcia-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WH, Joardar V, Kiel JA, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, van der Klei IJ, van Peij NN, Veenhuis M, von Döhren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RA. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1161-8.
- 137.** Van der Lende TR, van de Kamp M, Berg M, Sjollema K, Bovenberg RA, Veenhuis M, Konings WN, Driessen AJ. δ -(l- α -Aminoadipyl)-l-cysteinyl-d-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal Genet Biol*. 2002 Oct;37(1):49-55.
- 138.** Velours J, Arselin G. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*. 2000 Aug;32(4):383-90.
- 139.** Von Plehwe U, Berndt U, Conz C, Chiabudini M, Fitzke E, Sickmann A, Petersen A, Pfeifer D, Rospert S. The Hsp70 homolog Ssb is essential for glucose sensing via the SNF1 kinase network. *Genes Dev*. 2009 Sep 1;23(17):2102-15.
- 140.** Wang DS, Shaw R, Winkelmann JC, Shaw G. Binding of PH domains of beta-adrenergic receptor kinase and beta-spectrin to WD40/beta-transducin repeat

containing regions of the β -subunit of trimeric G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Aug 30;203(1):29-35.

141. Wang F, Liang Y, Wang M, Yang H, Liu K, Zhao Q, Fang X. Functional diversity of the p24 γ homologue Erp reveals physiological differences between two filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 2013 Dec;61:15-22.
142. 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 Apr 7;11(4):e0153007.
143. Weber SS, Bovenberg RA, Driessen AJ. Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol J.* 2012 Feb;7(2):225-36.
144. Westfall PJ, Ballon DR, Thorner J. When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science.* 2004 Nov 26;306(5701):1511-2.
145. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Aug;57(8-9):1172-83.
146. Whittaker SL, Lunness P, Milward KJ, Doonan JH, Assinder SJ. sodVIC is an α -COP-related gene which is essential for establishing and maintaining polarized growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 1999 Apr;26(3):236-52.
147. Xie X, Wilkinson HH, Correa A, Lewis ZA, Bell-Pedersen D, Ebbole DJ. Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 2004 Dec;41(12):1104-19.
148. Yan GR, Yin XF, Xiao CL, Tan ZL, Xu SH, He QY. Identification of novel signaling components in genistein-regulated signaling pathways by quantitative phosphoproteomics. *J Proteomics.* 2011 Dec 21;75(2):695-707.
149. Yin W, Keller NP. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J Microbiol.* 2011 Jun;49(3):329-39.
150. Zhang H, Ma H, Xie X, Ji J, Dong Y, Du Y, Tang W, Zheng X, Wang P, Zhang Z. Comparative proteomic analyses reveal that the regulators of G-protein signaling proteins regulate amino acid metabolism of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Proteomics.* 2014 Nov;14(21-22):2508-22.

151. Zhang X, Fang A, Riley CP, Wang M, Regnier FE, Buck C. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics-a review. *Anal Chim Acta*. 2010 Apr 7;664(2):101-13.
152. Zhao Y, Su H1, Zhou J, Feng H, Zhang KQ, Yang J. The APSES family proteins in fungi: Characterizations, evolution and functions. *Fungal Genet Biol*. 2015 Aug;81:271-80.
153. Zhu K, Zhao J, Lubman DM, Miller FR, Barder TJ. Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Anal Chem*. 2005 May 1;77(9):2745-55.
154. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:840518.

ANEXO 1

Información adicional de los parametros empleados para la identificación de proteínas por LC-MS/MS

- Database Name: the *Penicillium_chrysogenum_txid500485* database (*Penicillium rubens* Wis 54-1255)
- Search Engine: Mascot Version:
2.3.02
- Fragment Tolerance: 0.60 Da (Monoisotopic)
- Parent Tolerance: 10.0 PPM (Monoisotopic)
- Fixed Modifications: +57 on C (Carbamidomethyl)
- Variable Modifications: +16 on M (Oxidation), +80 on STY (Phospho)
- Digestion Enzyme: Trypsin
- Max Missed Cleavages: 3
- Scaffold: Version: Scaffold_4.3.4
- Peptide Thresholds: 95.0% minimum
- Protein Thresholds: 99.0% minimum and 2 peptides minimum

ANEXO 2

Pc12g11470	Pc15g01800	Pc21g10310	Pc22g15780	Pc12g09190	Pc20g01600	Pc18g02490
Pc13g05610	Pc16g11070	Pc21g08090	Pc12g09430	Pc21g16250	Pc16g09840	Pc22g11560
Pc22g06090	Pc21g16870	Pc21g08260	Pc20g08440	Pc21g17500	Pc13g04800	Pc15g00600
Pc16g14630	Pc20g04720	Pc18g01550	Pc20g06410	Pc22g21110	Pc13g06000	Pc16g06130
Pc20g04080	Pc18g01390	Pc16g09030	Pc21g15020	Pc16g08890	Pc22g04840	Pc22g18030
Pc12g04550	Pc14g01120	Pc18g03880	Pc21g03300	Pc16g11960	Pc20g01660	Pc13g15520
Pc13g11280	Pc21g20480	Pc21g07480	Pc21g19350	Pc21g05820	Pc21g11060	Pc20g00430
Pc22g15460	Pc13g03920	Pc13g09560	Pc12g00540	Pc12g00100	Pc22g13490	Pc22g25400
Pc22g21280	Pc21g14560	Pc22g07150	Pc21g11720	Pc13g01620	Pc22g22110	Pc22g09730
Pc20g02220	Pc18g02660	Pc21g14530	Pc21g17940	Pc21g20090	Pc12g06550	Pc13g07040
Pc12g16490	Pc13g05750	Pc21g23260	Pc21g06960	Pc21g11840	Pc22g20610	Pc22g14380
Pc13g11680	Pc22g10220	Pc22g07210	Pc16g02320	Pc16g04660	Pc22g14720	Pc20g15310
Pc22g13280	Pc22g11240	Pc21g19210	Pc21g14340	Pc22g06980	Pc20g08430	Pc18g06430
Pc12g12440	Pc12g06650	Pc20g09090	Pc12g06100	Pc16g14060	Pc21g21800	Pc12g02550
Pc12g04590	Pc18g05190	Pc13g04720	Pc13g14470	Pc13g09940	Pc22g14770	Pc22g01020
Pc12g11730	Pc21g12780	Pc21g07010	Pc21g05940	Pc22g21670	Pc20g03280	Pc14g00750
Pc12g16540	Pc21g20490	Pc16g02610	Pc16g07550	Pc13g10700	Pc20g14170	Pc12g06080
Pc22g13370	Pc13g11420	Pc12g11620	Pc20g05620	Pc13g07160	Pc22g11510	Pc18g04190
Pc16g09660	Pc21g21940	Pc12g16020	Pc20g09340	Pc22g08930	Pc21g06470	Pc13g03050
Pc21g19860	Pc21g07620	Pc22g19160	Pc16g01850	Pc22g11430	Pc20g01630	Pc20g02180
Pc22g10040	Pc20g00640	Pc22g16480	Pc21g16180	Pc16g14460	Pc21g15340	Pc20g00750
Pc20g12410	Pc22g11670	Pc13g10530	Pc16g01980	Pc21g15390	Pc16g08740	Pc16g08430
Pc20g08000	Pc12g15350	Pc12g02600	Pc12g11590	Pc20g15300	Pc18g00550	Pc15g00510
Pc18g02330	Pc23g00460	Pc21g03560	Pc20g07510	Pc13g02310	Pc12g11270	Pc16g04070
Pc22g20250	Pc22g15550	Pc20g00530	Pc22g06240	Pc21g19240	Pc16g09980	Pc16g01710
Pc12g14810	Pc13g07230	Pc20g14410	Pc16g12130	Pc12g01030	Pc14g01450	Pc20g03790
Pc18g03270	Pc20g03080	Pc22g09200	Pc20g07810	Pc20g12160	Pc22g10140	Pc16g10400
Pc12g02990	Pc21g13400	Pc20g01640	Pc21g14880	Pc22g06860	Pc21g01360	Pc20g01220
Pc15g00670	Pc21g01230	Pc16g06020	Pc13g09470	Pc13g04820	Pc22g22480	Pc14g00740
Pc13g08290	Pc22g06700	Pc22g19640	Pc22g03420	Pc12g07850	Pc22g00040	Pc20g03880
Pc22g04100	Pc21g15690	Pc22g02140	Pc18g00510	Pc22g03170	Pc21g03270	Pc12g04520
Pc20g08350	Pc21g23270	Pc16g09020	Pc22g05740	Pc22g11130	Pc18g04150	Pc21g04170
Pc21g21710	Pc22g05690	Pc18g00960	Pc21g07090	Pc13g02880	Pc13g10050	Pc21g01490
Pc22g15390	Pc12g08280	Pc21g10250	Pc21g07990	Pc22g04230	Pc20g03330	Pc12g07460
Pc16g10450	Pc12g14620	Pc22g08300	Pc18g00150	Pc18g05230	Pc22g20500	Pc21g08890
Pc21g14060	Pc21g13620	Pc20g09150	Pc12g15950	Pc22g01910	Pc22g22490	Pc06g00610
Pc12g10390	Pc21g19270	Pc22g17850	Pc20g07990	Pc18g04690	Pc12g07080	Pc20g15000
Pc14g00610	Pc20g15270	Pc21g17250	Pc12g05960	Pc16g06890	Pc21g11890	Pc16g13600
Pc21g03470	Pc13g03030	Pc13g11340	Pc20g08480	Pc20g07880	Pc22g02900	Pc21g14830
Pc18g01270	Pc13g07220	Pc18g00930	Pc15g00940	Pc20g07940	Pc12g05080	Pc21g18660
Pc22g09220	Pc13g08940	Pc22g17020	Pc12g11760	Pc20g09120	Pc16g04810	Pc20g05300
Pc20g05490	Pc22g03990	Pc21g00710	Pc13g06350	Pc16g12280	Pc12g01620	Pc22g02170
Pc22g06130	Pc20g07670	Pc13g04710	Pc12g11740	Pc13g09310	Pc21g10110	Pc13g04290
Pc16g07730	Pc06g00490	Pc20g02560	Pc21g04300	Pc20g03470	Pc06g02330	Pc21g12770
Pc13g05480	Pc12g09800	Pc21g23240	Pc16g07860	Pc22g19080	Pc21g11400	Pc12g12820
Pc22g03440	Pc21g01970	Pc13g08760	Pc21g07110	Pc21g02010	Pc22g14110	Pc22g11710
Pc22g17300	Pc16g02070	Pc20g13910	Pc20g04860	Pc18g01060	Pc13g13350	Pc20g00560
Pc13g04330	Pc21g13500	Pc21g17040	Pc20g09260	Pc12g11330	Pc16g02220	Pc20g05590
Pc22g24120	Pc20g08030	Pc14g01460	Pc13g03700	Pc20g02430	Pc21g11110	Pc13g10100
Pc20g14830	Pc21g15910	Pc16g10280	Pc21g17400	Pc21g18310	Pc18g03250	Pc12g12880
Pc13g10180	Pc18g05750	Pc12g12410	Pc13g02740	Pc20g01020	Pc21g17060	Pc18g03850
Pc12g00340	Pc20g03840	Pc12g11060	Pc16g02130	Pc16g09860	Pc13g07030	Pc12g13030
Pc13g14680	Pc20g08250	Pc12g06620	Pc22g04330	Pc12g13060	Pc22g21630	Pc22g00700
Pc12g00090	Pc16g06290	Pc21g13150	Pc20g07160	Pc16g02430	Pc21g01800	
Pc22g22150	Pc13g11660	Pc21g19170	Pc15g01830	Pc13g15710	Pc20g09070	



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00182

Matrícula: 209381332

Análisis proteómico de las vías de señalización mediadas por la subunidad G α de una proteína G heterotrimerica de *Penicillium chrysogenum*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 24 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA
DRA. ROSARIO VERA ESTRELLA
DR. HORACIO REYES VIVAS

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: ULISES CARRASCO NAVARRO

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

Aprobatoria

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



ULISES CARRASCO NAVARRO
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL

DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA

VOCAL

DRA. ROSARIO VERA ESTRELLA

SECRETARIO

DR. HORACIO REYES VIVAS