



Análisis Proteómico de la vías de señalización mediadas por la subunidad α Pga1 de una proteína G heterotrimérica de *Penicillium chrysogenum* mediante la técnica 2D-DIGE

Ulises Carrasco¹, Francisco J. Fernández¹, Horacio Reyes², Rosario Vera³, Bronwyn J. Barkla³, Francisco Fierro¹

¹UAM, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. ²Instituto Nacional de Pediatría. ³Instituto de Biotecnología, UNAM³. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa Av. San Rafael Atlixco No.186. Col. Vicentina, México, D.F. C.P. 09340. Tel. (55)5804 6438 ulises.c.n@gmail.com

Palabras clave: *Penicillium chrysogenum*, 2D-DIGE, Proteínas G

Introducción. *Penicillium chrysogenum* es el hongo empleado industrialmente para la producción de penicilina. Uno de los factores que influyen en la biosíntesis de este antibiótico y otros metabolitos secundarios son las proteínas G (1). El objetivo de este trabajo es un análisis proteómico mediante la técnica de 2D-DIGE para identificar cambios en el proteoma de *P. chrysogenum* en función de la subunidad α Pga1 de una proteína G heterotrimérica.

Metodología. Se compararon los proteomas de la cepas de *P. chrysogenum* Wis-541255 (control) y $\Delta pga1$ (delección del gen *pga1*) (1). Los extractos proteicos de cuatro replicas biológicas se obtuvieron según lo reportado (2). Las proteínas se marcaron con los fluorógenos Cy2 (estándar interno), Cy3 y Cy5 de acuerdo a lo reportado (3). Para la separación por punto isoeléctrico se usaron tiras IPG de 17 cm, pH 3-10, en un equipo de isoelectroenfoque (Bio-Rad). Para la segunda dimensión (SDS-PAGE) se usaron geles al 12% en el equipo de electroforesis ETTAN DALT Six (GE). La adquisición de imágenes se realizó en el equipo de escaneo Typhoon 9400 (GE). El análisis de expresión diferencial se realizó en el programa DeCyder-2D v6.5 (GE). Los puntos de proteínas de interés (Cambio: ± 1.5 , ANOVA: valor-p ≤ 0.05) fueron extraídos de los geles en el equipo ETTAN Spot Handling Workstation (GE). La identificación de proteínas se realizó por LC-MS/MS en el equipo LTQ-Orbitrap (Thermo) y la validación en el programa Scaffold (Scaffold 4.0.5).

Resultados. La figura 1 muestra la imagen representativa de uno de los geles 2D-DIGE del experimento. La tabla 1 muestra las proteínas diferencialmente expresadas al comparar los proteomas. La figura 2 muestra la intensidad de los puntos 3 y 198.

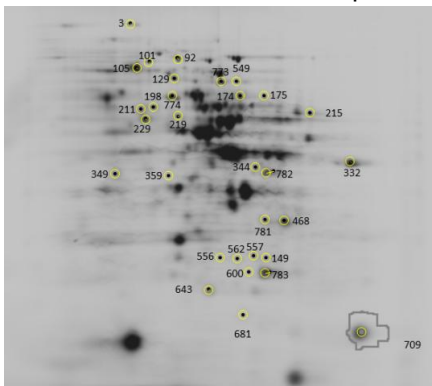


Fig 1. 2D-DIGE representativo de *P. chrysogenum*, las marcas indican las proteínas que cambian de abundancia en función de Pga1.

Tabla 1. Proteínas identificadas que cambian de abundancia al comparar las cepas Wis 54-1255 y $\Delta pga1$

#Spot	Proteína	Cambio de abundancia	ANOVA (valor p)	Proceso biológico
3	Proteína con dominio PH (Pleckstrin domain)	-2.57	0.019	Señalización celular
101	Proteína de choque térmico HSP90	2.44	0.00042	Plegamiento de proteínas, respuesta a estrés
129	Chaperona Ssb2	-3.42	0.0016	Plegamiento de proteínas, respuesta a estrés
149	Sulfato-adeniltransferasa	-1.7	0.033	Biosíntesis de Cisteína y Metionina
174	Piruvato cinasa	-1.6	0.045	Glucólisis
175	Inosina monofosfato-deshidrogenasa	-1.89	0.0012	Biosíntesis de nucleótidos de guanina
198	Proteína con dominio Ankyrin	-3.42	0.00041	Interacción proteína-proteína
468	Urato oxidasa	2.84	1.4x10 ⁻⁶	Metabolismo de purinas
556	Levodiona reductasa (deshidrogenas de cadena corta)	1.53	0.047	Procesos de oxidoreducción
557	Anhidrasa carbónica	2.2	0.0037	Utilización de Carbono
562	Ran	2.39	0.00073	Transporte intracelular de proteínas
709	Ribotido 5-aminoimidazol-4-carboxamida transformilasa	1.87	8.8x10 ⁻⁷	Biosíntesis de nucleótidos de purina
773	Trancetolasa	-1.94	0.0097	Ruta de las pentosas fosfato
781	Proteína ribosomal S3	3.49	2.8x10 ⁻⁶	Traducción
782	Alcohol deshidrogenasa	-2.76	0.017	Procesos de oxidoreducción



Fig. 2. Imágenes 3D de dos proteínas de interés. A) Punto 3 (dominio Pleckstrin). B) Punto 198 (repetidos de Ankyrin)

Conclusiones. La comparación de los proteomas muestra cambios de proteínas de metabolismo general, estrés y señalización celular debido a la delección del gen *pga1*. Dos proteínas de interés serán sujetas a silenciamiento por ARNi (puntos 3 y 198) para identificar nuevos efectores de la vía de proteínas G

Agradecimientos. Al CONACyT por la beca otorgada

Bibliografía. (1). Ramón G, Fierro F, Martín J. Biochem Cell Biol. 86, 57-69. (2). Mohammad J, Barreiro C, García C, Martín J. Mol Cell Proteomics. 9, 1182-1198. (3). Vera S, Bronwyn B, Pantoja O. J Proteomics. 111, 113-127.