

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**TESIS DOCTORAL**

Tráfico a través del aparato de Golgi y extensión apical en *Aspergillus nidulans*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Hernández González

Director

Miguel Ángel Peñalva Soto

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**Tráfico a través del aparato de Golgi y  
extensión apical en *Aspergillus nidulans***

Memoria presentada por Miguel Hernández González para optar al grado de doctor.

Director:

Miguel Ángel Peñalva Soto

Profesor de Investigación del CSIC

Centro de Investigaciones Biológicas

Tutor: Jesús Pla Alonso, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid,  
Facultad de Farmacia.

**TESIS DOCTORAL**

**MIGUEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

Centro de Investigaciones Biológicas

CSIC

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Peñalva Soto, Profesor de Investigación del CSIC y coordinador de la Unidad de Genética Molecular de *Aspergillus nidulans*.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado con fondos públicos del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, a través de los proyectos BIO2012-30965 y BIO2015-65090-R y un contrato predoctoral asignado al proyecto BIO2012-30965.



## Abreviaturas

3'UTR: Región 3' no traducida.

5'UTR: Región 5' no traducida.

*alcA<sup>P</sup>*: promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa (*alcA*).

ARF: *ADP rybosilation factor*.

BSA: albúmina de suero bovina.

cDNA: DNA complementario.

CMAC: 7-amino-4-clorometil cumarina.

COG: *Conserved Oligomeric Golgi*.

COPI: *Coat protein complex I*.

COPII: *Coat protein complex II*.

CORVET: *Class C core vacuole/endosome tethering*.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético.

FM4-64: dibromuro de N-(3-trietilamoniopropil)-4-(*p*-dietilaminofenilhexatrienil) piridinio

GAP: proteína estimuladora de la actividad GTPásica.

GDP: guanosín difosfato.

GEF: factor intercambiador de nucleótido de guanina.

GFP: proteína verde fluorescente.

*gpdA<sup>mini</sup>*: fragmento del promotor del gen de la gliceraldehído 3-P deshidrogenasa.

GTP: guanosín trifosfato.

HA: residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana.

HOPS: *Homotypic fusion and protein sorting*.

LB: medio de Luria-Bertani.

MCA: medio completo de *Aspergillus nidulans*.

mCherry: proteína monomérica rojo-cereza fluorescente (*monomeric cherry fluorescent protein*).

MMA: medio mínimo de *Aspergillus nidulans*.

mRFP: proteína monomérica roja fluorescente.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

*niIA<sup>P</sup>*: promotor del gen de la nitrito reductasa.

ORF: marco abierto de lectura.

p/v: peso / volumen.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

PAGE-SDS: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (con SDS).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

pH: potencial hidrógeno.

PtdIns3P: Fosfatidilinositol 3 fosfato.

PtdIns4P: Fosfatidilinositol 4 fosfato.

*pyrG<sup>fum</sup>*: gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*.

RE: retículo endoplasmático.

*riboB<sup>fum</sup>*: gen *riboB* de *A. fumigatus*.

rpm: revoluciones por minuto.

Sar: *Secretion-Associated, Ras-related*.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*.

TGN: Golgi tardío o trans-Golgi.

TRAPP II: *Transport Protein Particle II*.

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano.

v/v: volumen / volumen.

VPS: *Vacuolar Protein Sorting*.

wt: cepa silvestre.

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC.

Las tablas y figuras contenidas en este trabajo se citan anteceditas de una letra, que hace referencia a la sección en que aparecen: I: Introducción; M: Materiales y Métodos; R: Resultados; D: Discusión.

# ÍNDICE



|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b>  | <b>1</b>  |
| <b>SUMMARY</b>  | <b>12</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.1. La interfaz retículo endoplasmático/aparato de Golgi.....</b>   | <b>28</b> |
| 1.1.1. Tráfico anterógrado: la cubierta COPII.....  | 28        |
| 1.1.2. Tráfico retrógrado: la cubierta COPI.....  | 31        |
| <b>1.2. El tráfico en el aparato de Golgi: modelos .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>1.3. La implicación de los lípidos en el tráfico de membranas .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>1.4. El proceso de N-glicosilación en la ruta secretora .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>1.5. Control molecular de la ruta secretora: GTPasas de la familia Arf/Sar en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y sus proteínas reguladoras ...</b> | <b>38</b> |
| 1.5.1. Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) de la familia Arf/Sar ....   | 40        |
| 1.5.2. Proteínas estimuladoras de la actividad GTPásica (GAP) de la familia Arf/Sar.....  | 41        |
| <b>1.6. La salida de proteínas en la red del <i>trans</i>-Golgi (TGN) y las diferentes rutas de secreción .....</b>   | <b>41</b> |
| 1.6.1. Tráfico a los endosomas.....   | 42        |
| 1.6.2. Tráfico “directo” desde el TGN a la membrana plasmática.....   | 43        |
| 1.6.3. Tráfico “directo” de las proteínas ancladas a GPI.....   | 44        |
| <b>1.7. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo para el estudio del tráfico intracelular..</b>  | <b>45</b> |
| 1.7.1. Endocitosis en <i>A. nidulans</i> .....  | 49        |
| 1.7.2. Caracterización de la ruta secretora.....  | 50        |
| 1.7.3. Compartimentación del Golgi en <i>A. nidulans</i> .....  | 51        |
| 1.7.4. La salida de proteínas del TGN en <i>A. nidulans</i> .....   | 52        |
| 1.7.5. La función de RabC en la conexión TGN/endosomas .....  | 53        |
| 1.7.6. El retículo endoplasmático en <i>A. nidulans</i> .....   | 53        |
| <b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>  | <b>54</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>60</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.1. Medios de cultivo para <i>Aspergillus nidulans</i></b>                                   |           |
| 3.1.1. Medio Completo (MCA) y Medio Completo de Regeneración (MCR).....                          | 62        |
| 3.1.2. Medio Mínimo (MMA), Medio de Microscopía (WMM) y Medio Mínimo de Regeneración (MMR) ..... | 62        |
| 3.1.3. Solución de sales y suplementos .....   | 62        |
| <b>3. 2. Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas .....</b>                               | <b>63</b> |
| <b>3.3. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....</b>   | <b>69</b> |
| 3.3.1. Plásmidos .....   | 69        |
| 3.3.2. Oligonucleótidos .....  | 71        |
| <b>3.4. Manejo de <i>Escherichia coli</i> .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>3.5. Manejo de <i>Aspergillus nidulans</i> .....</b>  | <b>77</b> |
| 3.5.1. Cultivo y mantenimiento de cepas .....  | 77        |
| 3.5.2. Transformación .....  | 77        |
| 3.5.2.1. Generación de protoplastos .....  | 77        |
| 3.5.2.2. Transformación .....  | 78        |
| 3.5.3. Extracción de DNA genómico .....  | 78        |
| 3.5.3.1. Método rápido, para PCR.....  | 78        |
| 3.5.3.2. Método elaborado, para Southern Blot.....   | 78        |
| 3.5.4. Extracción de proteína total.....   | 79        |
| 3.5.5. Cruces entre estirpes de <i>A. nidulans</i> por reproducción sexual .....                 | 79        |
| 3.5.6. Precipitación de proteínas de medio de cultivo.....                                       | 80        |
| 3.5.7. Genotipado de cepas transformantes.....   | 80        |
| 3.5.8. Inducción de la expresión a partir de genes integrados en el locus <i>inuA</i> .....      | 80        |
| 3.5.8.1. Cultivo en matraz .....   | 80        |
| 3.5.8.2. Cultivo para microscopía.....   | 81        |
| <b>3.6. Técnicas de biología molecular, biología celular y bioquímica .....</b>                  | <b>81</b> |
| 3.6.1. Obtención de casetes de transformación mediante PCR de fusión .....                       | 81        |
| 3.6.2. Southern- <i>blot</i> .....   | 83        |
| 3.6.3. Electroforesis e inmunodetección de proteínas por <i>western-blot</i> .....               | 83        |
| 3.6.4. Generación de mutantes <i>sarA</i> .....  | 84        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.6.4.1. Obtención y clonaje del casete de reemplazamiento génico de <i>sarA</i> .....   | 84        |
| 3.6.4.2. Generación de una mutateca de <i>sarA</i> .....   | 84        |
| 3.6.4.3. Transformación de <i>A. nidulans</i> .....  | 85        |
| 3.6.5. Expresión de SarA en <i>Escherichia coli</i> , purificación y obtención de anticuerpos .....  | 85        |
| 3.6.6. Desglicosilación con PNGasa F .....   | 85        |
| <b>3.7. Microscopía de fluorescencia <i>in vivo</i> .....</b>  | <b>86</b> |
| 3.7.1. Especificaciones técnicas .....   | 86        |
| 3.7.2. Condiciones de cultivo e incremento de temperatura en mutantes termosensibles .....   | 86        |
| 3.7.3. Utilización de colorantes fluorescentes .....   | 87        |
| 3.7.4. Utilización de las drogas Latrunculina B y Brefeldina A .....   | 87        |
| 3.7.5. Inducción del promotor <i>niiA</i> .....  | 87        |
| 3.7.6. Análisis de colocalización: Li y Pearson .....  | 87        |
| 3.7.7. Cuantificaciones con imágenes de microscopía de fluorescencia .....   | 88        |
| 3.7.7.1. Intensidad de fluorescencia de CopA en <i>sarA6</i> .....   | 88        |
| 3.7.7.2. Cuantificación del área ocupada por cisternas y de la fluorescencia<br>citosólica de células <i>sarA6</i> mRFP-PH <sup>OSBP</sup> ..... | 88        |
| 3.7.7.3. Gradiente ChsB/TGN .....  | 89        |
| 3.7.7.4. Localización relativa ChsB y AbpA .....   | 89        |
| 3.7.7.5. Vida media de las cisternas del TGN con ChsB .....  | 89        |
| 3.7.7.6. Relocalización de ChsB en los mutantes <i>nudA2</i> y <i>nudA5</i> .....  | 89        |
| <b>3.8. Herramientas informáticas .....</b>  | <b>89</b> |
| <b>3.9 Reactivos, enzimas y kits comerciales de biología molecular utilizados .....</b>  | <b>90</b> |
| 3.9.1. Kits .....  | 90        |
| 3.9.2. Reactivos y enzimas de biología molecular .....   | 90        |

## **RESULTADOS** \_\_\_\_\_ **92**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.1. Capítulo I. Bloqueo condicional del tráfico COPII .....</b>                      | <b>94</b> |
| 4.1.1. Localización del homólogo de <i>sar1</i> en el genoma de <i>A. nidulans</i> ..... | 95        |
| 4.1.2. <i>sarA</i> es un gen esencial .....  | 95        |
| 4.1.3. Diseño del método de generación de mutantes termosensibles .....                  | 96        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.1.4. Construcción de la mutateca de <i>sarA</i> en <i>Escherichia coli</i> .....   | 97         |
| 4.1.5. Selección y caracterización de 8 alelos termosensibles de <i>sarA</i> .....   | 99         |
| 4.1.6. La termosensibilidad de los transformantes estaba genéticamente ligada a <i>sarA</i> .....  | 99         |
| 4.1.7. Los niveles de SarA no están alterados en la estirpe control <i>sarA0</i> .....   | 101        |
| 4.1.8. Los niveles de SarA de los mutantes <i>sarA</i> -ts disminuyen con el aumento de la temperatura.....  | 101        |
| 4.1.9. Análisis de las sustituciones resultantes de las mutaciones de <i>sarA1-sarA8</i> en el contexto de la estructura de la proteína .....                        | 102        |
| 4.1.10. Selección de los alelos termosensible idóneos para estudios por microscopía .....  | 104        |
| 4.1.11. La inactivación condicional de SarA detiene la secreción al nivel del retículo endoplasmático.....   | 104        |
| 4.1.11.1. Deslocalización de Sec23 de los sitios de salida del retículo endoplasmático.....  | 104        |
| 4.1.11.2. Deslocalización de la GTPasa exocítica RabE y de la v-SNARE SynA..   | 105        |
| 4.1.11.3. RerA, que continuamente cicla entre el retículo endoplasmático y el Golgi, se encuentra desplazada hacia el retículo en el mutante <i>sarA6</i> .....      | 106        |
| 4.1.12. Desorganización del Golgi por inactivación de SarA .....   | 108        |
| 4.1.12.1. El Golgi temprano pierde su identidad y sus membranas se relocalizan al retículo endoplasmático.....   | 108        |
| 4.1.12.2. Las cisternas del trans-Golgi (TGN) se desorganizan y disipan.....   | 109        |
| 4.1.13. La inactivación de SarA tiene consecuencias morfogénicas: formación de globos apicales.....  | 112        |
| 4.1.13.1. Los globos formados por <i>sarA6</i> tienen una pared celular engrosada, una gran vacuola, gran cantidad de retículo endoplasmático y múltiples núcleos .. | 114        |
| 4.1.13.2. Reorganización del Golgi y restablecimiento del crecimiento morfológicamente normal .....  | 117        |
| 4.1.14. Búsqueda de mutantes revertientes de la termosensibilidad de <i>sarA6</i> y <i>sarA8</i> .....   | 117        |
| 4.1.14.1. Mutaciones intragénicas supresoras de la termosensibilidad de <i>sarA6</i> ....  | 118        |
| 4.1.14.2. Mutaciones intragénicas supresoras de la termosensibilidad de <i>sarA8</i> ....  | 119        |
| <b>4.2. Capítulo II. Análisis sistemático de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras GEFs y GAPs .....</b>   | <b>121</b> |

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.1. Identificación bioinformática de las proteínas de la familia Arf/Sar, de sus GEFs y de sus GAPs .....    | 122        |
| 4.2.1.1. Identificación de las GTPasas de la familia Arf/Sar .....  | 122        |
| 4.2.1.2. Identificación de las GEFs de las GTPasas de la familia Arf/Sar .....                                  | 126        |
| 4.2.1.2.1. GEF de SarA: Sec12.....  | 126        |
| 4.2.1.2.1. GEFs de las GTPasas Arf .....  | 128        |
| 4.2.1.3. Identificación de las GAPs de las GTPasas de la familia Arf/Sar.....                                   | 132        |
| 4.2.2. Deleción sistemática de los genes de la familia ARF, de sus GEFs y de sus GAPs ..                        | 136        |
| 4.2.2.1. Las GTPasas SarA, ArfA y Arl2 son esenciales .....   | 136        |
| 4.2.2.2. Sec12, HypB y GeaA son GEFs de Arf/Sar esenciales .....  | 137        |
| 4.2.2.3. Age1a es la única GAP de Arf esencial en <i>Aspergillus nidulans</i> .....                             | 137        |
| 4.2.2.4. Estudio preliminar de <i>gcs1Δ</i> .....   | 137        |
| <b>4.3. Capítulo III. Supresión de la letalidad de <i>hypBΔ</i> (<i>SEC7Δ</i>).....</b>                         | <b>143</b> |
| 4.3.1. Caracterización de <i>geaA1</i> , un supresor extragénico de <i>hypBΔ</i> ( <i>sec7</i> ).....           | 144        |
| 4.3.2. La sustitución Tyr1022Cys altera la localización subcelular de GeaA.....                                 | 147        |
| 4.3.3. La mutación <i>geaA1</i> no altera el reclutamiento de CopA.....   | 150        |
| 4.3.4. Implicación de <i>arl1</i> y <i>arl3</i> en la supresión de <i>hypB5</i> por <i>geaA1</i> .....          | 151        |
| <b>4.4. Capítulo IV. Localización subcelular y caracterización de CopA, una subunidad esencial de COPI.....</b> | <b>153</b> |
| 4.4.1. La construcción <i>copA-gfp</i> es funcional .....   | 154        |
| 4.4.2. CopA-GFP se localiza en estructuras citosólicas dinámicas polarizadas hacia el ápice .....               | 154        |
| 4.4.3. CopA-GFP se localiza mayoritariamente en el Golgi temprano, donde colocaliza con SedV .....              | 155        |
| 4.4.4. CopA-GFP no colocaliza con mRFP-PH <sup>OSBP</sup> (TGN).....  | 156        |
| 4.4.5. CopA-GFP se acumula en los agregados de Golgi temprano tras el tratamiento con Brefeldina A .....        | 158        |
| 4.4.6. CopA se deslocaliza al inactivar reguladores del Golgi temprano, pero no del Golgi tardío .....          | 159        |
| <b>4.5. Capítulo V. Implicación del reciclaje endocítico en el mantenimiento de la polaridad de ChsB .....</b>  | <b>161</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 4.5.1. La enzima ChsB es esencial .....  | 162        |
| 4.5.2. Localización subcelular de ChsB: membrana apical, vesículas de secreción, estructuras citosólicas y septos.....                                 | 162        |
| 4.5.3. La localización polarizada de ChsB en la membrana plasmática se mantiene por endocitosis.....   | 166        |
| 4.5.4. La ChsB intracelular se localiza en las cisternas más apicales del <i>trans</i> -Golgi .....  | 168        |
| 4.5.5. El transporte basípeto de ChsB requiere la función de la dineína.....   | 170        |
| 4.5.6. ChsB reside en el TGN de manera transitoria.....  | 172        |
| 4.5.7. La función de TRAPP II es necesaria para el tráfico de ChsB.....  | 173        |
| 4.5.8. ChsB se acumula en el TGN por inactivación de Sec7 .....  | 174        |
| 4.5.9. La mutación <i>gea1</i> restaura la localización silvestre de ChsB en el mutante <i>hypB5</i> .....   | 176        |
| 4.5.10. RabO (RAB1) se requiere para el tráfico de ChsB .....  | 177        |
| 4.5.11. La ausencia de la subunidad Chs5 del exómero no altera el tráfico de ChsB .....  | 179        |
| 4.5.12. Implicación de la actividad flipasa en el tráfico de ChsB .....  | 180        |
| 4.5.13. La sinaptofrevina SynA no se requiere para el tráfico de ChsB .....  | 180        |
| 4.5.14. ChsB recicla al TGN desde un compartimento endosomal localizado aguas arriba del dominio RabB (RAB5) .....                                     | 180        |
| 4.5.15. El reciclaje de ChsB depende críticamente de RabC y GARP.....  | 182        |
| 4.5.16. En hifas silvestres, la síntesis <i>de novo</i> de ChsB no parece contribuir en gran medida a mantener sus niveles estacionarios .....         | 184        |
| <b>4.6. Capítulo VI. Estudio de la ruta de secreción de una enzima soluble: InuA</b>   | <b>186</b> |
| 4.6.1. InuA es una inulinasa esencial para el crecimiento en inulina.....  | 187        |
| 4.6.2. Detección de las formas intracelulares y extracelulares de InuA mediante su etiquetado con HA <sub>3</sub> .....                                | 189        |
| 4.6.3. Regulación de la expresión de InuA mediante el uso de sacarosa .....  | 191        |
| 4.6.4. Las especies moleculares GB y GA son intracelulares .....   | 193        |
| 4.6.5. La diversidad de especies moleculares de InuA se produce por N-glicosilación.....   | 193        |
| 4.6.6. Análisis de la glicosilación basal en el retículo endoplasmático.....   | 195        |
| 4.6.7. El bloqueo de la salida del retículo con <i>sarA8</i> impide la secreción de InuA y la formación de las especies GA .....                       | 197        |
| 4.6.8. La alteración de la interfaz retículo-Golgi por inactivación de RabO o SedV bloquea la secreción de InuA y la síntesis de las especies GA ..... | 199        |

|  |     |
|--|-----|
| 4.6.9. Implicación del aparato de Golgi temprano en la glicosilación de InuA .....             | 200 |
| 4.6.10. Papel esencial del TGN en la secreción de InuA: HypB/Sec7 y HypA/Trs120.....           | 202 |
| 4.6.11. La integridad de los endosomas tempranos es un requisito para la exocitosis de InuA203 |     |

#### **4.7. Capítulo VII: Análisis de la ruta de secreción de una proteína anclada a GPI: EglC .....**

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.7.1. Análisis bioinformático de las proteínas ancladas a GPI en <i>Aspergillus nidulans</i>.....</b>  | <b>208</b> |
| 4.7.2. Etiquetado fluorescente de EglC y GeIE.....   | 211        |
| 4.7.3. Las quimeras fluorescentes de EglC y GeIE se localizan en la periferia celular.....   | 213        |
| 4.7.4. La expresión de EglC-GFP-GPI bajo el promotor <i>gpdA<sup>mini</sup></i> mejora su señal fluorescente .....                               | 214        |
| 4.7.5. Expresión regulable de EglC-GFP-GPI mediante integración del gen quimérico en el locus <i>inuA</i> .....                                  | 215        |
| 4.7.6. Análisis del patrón electroforético de EglC-GFP-GPI.....  | 216        |
| 4.7.7. Estudio de la ruta de exocitosis de EglC.....   | 217        |
| 4.7.7.1. Visualización de EglC-GFP-GPI acumulado en el retículo endoplasmático por efecto de <i>sarA6</i> .....                                  | 217        |
| 4.7.7.2. Bloqueo de EglC en estructuras intracelulares por inactivación de SedV (Sed5) .....   | 220        |
| 4.7.7.3. TRAPP <sup>II</sup> es necesario para el tráfico de EglC, mientras que RabD (Sec4) regula su distribución en la superficie celular..... | 221        |
| 4.7.7.4. EglC no necesita endosomas tempranos funcionales para su exocitosis ....  | 223        |

## **5. DISCUSIÓN \_\_\_\_\_ 226**

|  |     |
|--|-----|
| 5.1. Bloqueo condicional del tráfico de COPII y localización de COPI .....                 | 228 |
| 5.2. Potencial morfogenético de la regulación de la salida del RE .....                    | 229 |
| 5.3. Modelo de maduración de cisternas .....   | 229 |
| 5.4. Caracterización general de la familia Arf/Sar y de sus reguladores.....               | 231 |
| 5.5. GeaA1 mantiene el crecimiento en ausencia de HypB.....                                | 232 |
| 5.6. Cartografiado del tráfico de tres cargos de la ruta secretora: ChsB, InuA y EglC..... | 234 |

|   |            |
|---|------------|
| 5.6.1. La ruta de reciclaje endocítico de ChsB .....                                  | 235        |
| 5.6.1.1. El requerimiento de dineína.....   | 236        |
| 5.6.1.2. El transporte de ChsB desde los endosomas al TGN mediado por RabC/GARP ..... | 238        |
| 5.6.2. El tráfico y las modificaciones postraduccionales de InuA y EglC .....         | 238        |
| 5.6.2.1. La N-glicosilación de InuA .....   | 239        |
| 5.6.2.2. Las modificaciones postraduccionales de EglC .....                           | 240        |
| 5.6.2.3. La parte común de las rutas de exocitosis de InuA y EglC .....               | 241        |
| 5.6.2.4. La rama específica de InuA en la ruta secretora.....                         | 241        |
| 5.6.2.5. La ruta directa de secreción de EglC: ¿secreción “basolateral”?.....         | 245        |
| 5.7. Discusión general y perspectivas de futuro .....                                 | 246        |
| <br>  |            |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>248</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>252</b> |

# **RESUMEN**



### INTRODUCCIÓN

La ruta secretora es un proceso celular por el que determinadas proteínas maduran postraduccionalmente y son enviadas a los endosomas, al exterior celular o distribuidas en la membrana plasmática. Esta ruta comienza con la entrada de las proteínas recién sintetizadas al retículo endoplasmático (RE), donde se pliegan y sufren modificaciones postraduccionales, como la N-glicosilación [1] o el anclaje a glicosil fosfatidilinositol (GPI) [2]. A continuación las proteínas (*cargos*) viajan desde el RE al aparato de Golgi en vesículas recubiertas por el complejo proteico COPII (*coat protein complex-II*) [3]. Los llamados factores de anclaje o *tethering* las acercan a las cisternas en formación y la fusión de las vesículas con las cisternas ocurre gracias a la función de proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). En el Golgi las cadenas de N-oligosacáridos se modifican y extienden [4, 5]. El aparato de Golgi es un conjunto de cisternas que organizan el tráfico intracelular, cuya identidad y funciones subyacentes están controladas por GTPasas pequeñas de la familia Rab [6] y de la familia Arf / Sar [7, 8]. Estas enzimas se reclutan a la monocapa citosólica de las membranas del Golgi al cargarse con GTP y se inactivan y liberan de dicha monocapa al hidrolizar el GTP. Estos dos eventos de carga e hidrólisis están regulados por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) y por las proteínas estimuladoras de la actividad GTPásica (GAP), respectivamente. Cada GTPasa recluta un conjunto de proteínas efectoras (factores de *tethering*, proteínas SNARE, proteínas de cubierta y proteínas GEFs y GAPs, entre otros) a través de los cuales se ejecutan diversas funciones. Después de pasar por las cisternas del Golgi temprano o *cis*-Golgi, el *cargo* llega al Golgi tardío o *trans*-Golgi (TGN). Desde el TGN, el *cargo*, posiblemente concentrado en subdominios especializados [9], es reconocido y enviado a su destino final (los endosomas o la membrana plasmática) [10] en túbulos o en vesículas. Las vesículas secretoras pueden dirigirse a una región concreta de la membrana plasmática, como por ejemplo en los casos de las rutas de exocitosis apical o basolateral en células epiteliales [11] o en la secreción apical en hongos [12]. También se ha demostrado que existen proteínas específicas que llegan a la membrana plasmática o al exterior celular tras su paso por endosomas [13]. En resumen, las proteínas sintetizadas y modificadas en el RE viajan al aparato de Golgi, donde maduran y son clasificadas para su envío a su destino final, que puede ser, principalmente, el exterior celular, la membrana plasmática o el sistema endosomal.

Por último, el citoesqueleto juega un papel importante en la ruta secretora. En mamíferos y hongos filamentosos los microtúbulos y los cables de actina cooperan en el tráfico intracelular. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, la exocitosis requiere únicamente cables de actina [14]. Las vesículas secretoras se adaptan mediante Rabs, directamente o a través de sus

## Resumen

---

efectores, a los motores (dineína y kinesina-1 para microtúbulos, miosina-5 para actina) que les permiten desplazarse a lo largo de los filamentos del citoesqueleto [14, 15].

*Aspergillus nidulans* es un organismo modelo del estudio de la ruta secretora [16, 17]. Se trata de un hongo filamentoso que crece exclusivamente por extensión apical gracias a la fusión con el ápice de sus hifas de vesículas de secreción, lo que aporta las membranas requeridas para el crecimiento celular y las enzimas necesarias para la síntesis de pared. El modo de crecimiento polarizado de las hifas y su dependencia de la exocitosis representan una ventaja experimental, ya que las mutaciones que perturban la exocitosis alteran el establecimiento de la polaridad de crecimiento o lo imposibilitan, lo que provoca una alteración morfológica en la región apical de las hifas [18].

### OBJETIVOS

Los principales objetivos de esta tesis fueron:

1. Desarrollar herramientas genéticas para bloquear el tráfico de las vesículas COPII desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y determinar la influencia de este tráfico en la organización del aparato de Golgi y la secreción.
2. Estudiar la relación funcional existente entre el Golgi temprano y el *trans*-Golgi a través de los reguladores (GeaA/Gea1 y HypB/Sec7) y los efectores (el complejo proteico COPI) de Arf1.
3. Realizar una caracterización básica de las GTPasas de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras.
5. Determinar la ruta de exocitosis y los mecanismos por los cuales ciertas proteínas integrales de membrana presentan una localización polarizada en el casquete apical de las hifas.
6. Determinar las diferentes etapas de las rutas de exocitosis de una proteína soluble y de una proteína anclada a glicosil fosfatidilinositol.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Bloqueo condicional del tráfico COPII

Seleccionamos mediante mutagénesis al azar un total de 8 alelos termosensibles del gen esencial *sarA*, que codifica la GTPasa que controla la formación de vesículas COPII, con el objetivo de detener condicionalmente el tráfico de vesículas COPII desde el RE al aparato de Golgi. Estas mutaciones (que denominamos *sarA1-sarA8*) causan una disminución de los niveles de SarA con el incremento de temperatura, lo que sugiere que las cepas termosensibles obtenidas expresan variantes mutantes de SarA que, a temperatura restrictiva, pierden su conformación nativa y son degradadas por los sistemas de control de calidad. Nuestro propósito era bloquear la formación de las vesículas COPII y visualizar, mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*, el efecto causado en los diferentes compartimentos exocíticos utilizando proteínas fluorescentes. Dado que nuestro microscopio admite una temperatura máxima en la pletina de 37-39°C, debíamos seleccionar mutaciones termosensibles adecuadas a esta limitación. Los mutantes *sarA6* y *sarA7* tienen un gran defecto en el crecimiento a 37°C, mientras que el resto de mutantes crecen bien a esta temperatura (*sarA1*, *sarA2*, *sarA3* y *sarA8*) o tienen un crecimiento deficiente a temperaturas incluso menores (*sarA4* y *sarA5*). De entre *sarA6* y *sarA7* elegimos *sarA6* porque presenta una única mutación de cambio de sentido, a diferencia de *sarA7*, y por tanto conocemos la sustitución concreta que causa la termosensibilidad.

Primero, estudiamos el reclutamiento de COPII a los sitios de salida del retículo (ERES) y comprobamos que en el mutante *sarA6* a 37°C los ERES se desorganizan formando grandes agregados, como se ha determinado en otros mutantes que impiden la formación de vesículas COPII [19, 20]. Una vez comprobado que la formación de vesículas COPII estaba alterada, comprobamos que la exocitosis estaba bloqueada, al determinar la deslocalización de la membrana plasmática de la SNARE SynA. Por otro lado determinamos que RerA, una proteína que cicla continuamente entre el RE y el Golgi, se encontraba totalmente desplazada hacia el RE en el mutante *sarA6* a 37°C, lo que indica que el tráfico desde el RE al Golgi estaba bloqueado. Una vez establecido que *sarA6* impide la adecuada salida de proteínas del RE, estudiamos su efecto en el aparato de Golgi. Mediante microscopía de fluorescencia determinamos que el aparato de Golgi se desorganiza en tan sólo 10-30 minutos después de la inactivación de SarA. Esta desorganización la hemos visualizado por microscopía de fluorescencia *in vivo*, al observar proteínas tanto periféricas (CopA, subunidad esencial de COPI, y PH<sup>OSBP</sup>, que reconoce Arf1 y PI4P) como integrales de membrana (las t-SNARE del Golgi SedV y TlgB). Hemos demostrado que el aporte continuo de membranas desde el RE al Golgi es una condición indispensable para

la organización y el mantenimiento de este último. Estos resultados son difíciles de reconciliar con el modelo de cisternas estables y apoyan, en cambio, el modelo de maduración de cisternas [21]. Además, la desorganización del Golgi tiene consecuencias diferentes sobre las membranas del Golgi temprano y del TGN, ya que el primero se reabsorbe por el RE, mientras que el TGN se disipa en el citosol. Este resultado es consistente con el hecho de que el Golgi temprano y el Golgi tardío o TGN presentan diferencias composicionales y funcionales [22, 23]. Finalmente, determinamos que la inhibición crónica de la salida del RE tiene consecuencias morfogénicas, ya que provoca la formación de un gran globo de ~10  $\mu\text{m}$  de diámetro con una gruesa pared de quitina en la región apical de las hifas.

## 2. Análisis sistemático de la familia Arf Sar y de sus proteínas reguladoras GEF y GAP

Mediante el análisis sistemático de las GTPasas de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras GEFs y GAPs identificamos, clasificamos y delecionamos, en *A. nidulans*, los integrantes de dichas familias. Las características que estas GTPasas comparten con sus homólogas en *S. cerevisiae* y humanos ponen de manifiesto el alto grado de conservación de estos interruptores moleculares. La deleción de los genes que las codifican mostró una alta proporción de genes esenciales, la mayoría de los cuales también son esenciales en *S. cerevisiae*, lo que indica la conservación de sus funciones en eucariotas.

## 3. Supresión de la letalidad de *hypB* $\Delta$ (*SEC7* $\Delta$ )

HypB es una proteína GEF de Arf1 que se localiza en el TGN y es ortóloga de Sec7p y BIG1/BIG2 en *S. cerevisiae* y mamíferos, respectivamente [24]. Es decir, HypB activa a Arf1 en el TGN. *hypB5* es un alelo termosensible de *hypB* que impide el crecimiento a 42°C [25]. Mediante mutagénesis con ultravioleta de una cepa *hypB5* seleccionamos un revertiente extragénico capaz de crecer a 42°C. Por mapeo genético determinamos que el fenotipo de supresión se encontraba ligado al gen AN0112, que denominamos *geaA*, el cual codifica la putativa GEF de Arf1 en el Golgi temprano, (Gea1p en *S. cerevisiae*, GBF en mamíferos). Secuenciamos *geaA* en la cepa revertiente y descubrimos una mutación que provoca la sustitución Tyr1022Cys en GeaA (alelo *geaA1*, proteína mutante GeaA1). Posteriormente demostramos que *geaA1* es efectivamente causante de la supresión y que, de hecho, también suprime la letalidad que causa *hypB* $\Delta$ . Tyr1022 está localizada en un motivo conservado Ser- $\Omega$ - $\phi$ , presente en la subfamilia Gea/GBF (donde  $\Omega$  es un aminoácido aromático y  $\phi$  un residuo hidrofóbico) y provoca que GeaA1 se redistribuya, en parte, a la región apical de membrana

plasmática. El hecho de que una sustitución en GeaA permita el crecimiento fúngico en ausencia de HypB es de gran importancia, ya que GeaA y HypB son las dos únicas GEF del aparato de Golgi esenciales para el crecimiento. En cualquier caso, en el futuro será necesario investigar en profundidad tanto el mecanismo molecular por el que Tyr1022Cys relocaliza GeaA1 como el mecanismo de supresión subyacente.

#### **4. Localización subcelular y caracterización de CopA, una subunidad esencial de COPI**

CopA es la subunidad  $\alpha$  del complejo COPI de *A. nidulans* [26]. Para expresar una versión fluorescente de CopA a niveles fisiológicos reemplazamos el gen *copA* residente por una variante que codifica la proteína de fusión CopA-GFP, que representa la única fuente de CopA en la cepa manipulada. CopA-GFP se localiza en estructuras polarizadas. Mediante estudios de colocalización con mCherry-SedV (marcador del Golgi temprano) y mRFP-PH<sup>OSBP</sup> (marcador del TGN), demostramos que dichas estructuras correspondían a cisternas del Golgi temprano. Esta localización mayoritaria de CopA en el Golgi temprano subraya las diferencias entre ambas partes del Golgi y es consistente con una mayor implicación de COPI en el Golgi temprano, como previamente se había sugerido [27].

#### **5. Cartografiado del tráfico de tres cargos de la ruta secretora: ChsB, InuA y EglC**

En la última parte de esta tesis investigamos el tráfico de tres proteínas diferentes. Primeramente, estudiamos la quitina sintasa integral de membrana ChsB, una proteína esencial encargada de la síntesis de quitina en los sitios de extensión apical de las hifas [28]. En segundo lugar, investigamos la exoglucanasa EglC, que es una proteína anclada a GPI (PA-GPI). En tercer lugar, estudiamos la ruta de secreción de la inulinasa InuA, proteína soluble cuya expresión se induce con sacarosa o inulina. En *S. cerevisiae* se habían descrito diferencias en las rutas de exocitosis para enzimas solubles, PA-GPI y proteínas transmembrana [29-33]. Además, existía evidencia adicional en mamíferos de que las rutas de exocitosis de distintos tipos proteicos divergen [34, 35]. En resumen, tratamos de responder a la siguiente pregunta: ¿existen diferentes rutas de exocitosis para proteínas con diferente estructura y función fisiológica? Al final de este resumen, se trata de dar una respuesta razonada a la pregunta, a la luz de los resultados de esta tesis.

## 5.1. La ruta de reciclaje endocítico de ChsB

Para visualizar ChsB reemplazamos el gen *chsB* silvestre con transgenes que expresasen GFP-ChsB o mCherry-ChsB y comprobamos que el etiquetado no afectó a la función esencial de ChsB. Mediante esta estrategia visualizamos ChsB en la región apico-proximal de la membrana plasmática, formando un casquete semiesférico en la punta de cada hifa, donde colocalizó con la SNARE SynA. A través de múltiples abordajes confirmamos que la polaridad de ChsB en la membrana plasmática requiere de su endocitosis en un anillo subapical. Por otro lado, ChsB también se localizó en el Spitzenkörper y en estructuras intracelulares. Comprobamos, mediante colocalización con los marcadores fluorescentes pertinentes, que estas estructuras intracelulares corresponden a las cisternas más apicales del TGN y no coinciden con las cisternas del Golgi temprano. La presencia de ChsB en el TGN era transitoria ya que, como cuantificamos, el tiempo medio de residencia de ChsB en el TGN fue de  $58 \pm 4$  segundos ( $\pm$  desviación estándar).

Hipotetizamos que ChsB viaja por endocitosis desde la membrana plasmática a las cisternas del TGN en un proceso de reciclaje endocítico. Para comprobar si ChsB se requería un transporte activo sobre microtúbulos para llegar al TGN utilizamos *nudA2* y *nudA5*, dos mutantes termosensibles de *nudA*, que codifica la cadena pesada de la dineína [15]. En ambos mutantes el reciclaje de ChsB se detuvo al incrementar la temperatura del cultivo y ChsB se acumuló en un compartimento subapical intracelular que presentaba identidad endosomal, puesto que se marcó con el trazador endocítico FM4-64. En su conjunto, los resultados indican que ChsB es endocitada en el anillo subapical de endocitosis y que viaja desde compartimentos endosomales al TGN en un proceso de reciclaje endocítico en el que participa la dineína.

¿Qué ruta sigue ChsB para volver desde el TGN a la membrana plasmática? En *Aspergillus nidulans*, las cisternas del TGN, maduran a *carriers* exocíticos al adquirir la GTPasa RabE [36]. Hipotetizamos que ChsB utilizaría esta ruta. Dada la dificultad técnica de co-visualizar RabE y ChsB nos centramos en un abordaje genético. *hypA1* es un alelo termosensible de *hypA*, gen esencial que codifica Trs120, una de las subunidades específicas de TRAPP II necesaria para la activación de RabE [37]. Tras 25 minutos del cambio de la temperatura del cultivo a 37°C ChsB desapareció de la membrana plasmática en la cepa *hypA1* y se acumuló en estructuras intracelulares, lo que indica que RabE se requiere para el tráfico de ChsB a la membrana plasmática. A continuación, demostramos que la inactivación de HypB (GEF de Arf1 en el TGN) provoca que ChsB se acumule en estructuras internas con identidad de TGN. Estos resultados demuestran que ChsB viaja por una ruta de reciclaje indirecto, a través del TGN. Finalmente, para investigar la maquinaria molecular encargada de transportar ChsB desde el compartimento endosomal hasta el TGN, nos centramos en la GTPasa RabC/RAB6/Ypt6 [38] y en el complejo de *tethering* GARP (el ortólogo de RabC en mamíferos

y levaduras recluta a GARP a las membranas del Golgi para mediar el transporte desde los endosomas al Golgi [39]). Tanto *rabCΔ* como la delección de *vps52* (*Vps52* es una subunidad de GARP) provocaron la deslocalización de ChsB del casquete polar y desviaron su tráfico a las vacuolas, lo que es indicativo de fallo en el reciclaje desde los endosomas al TGN.

En conclusión, hemos demostrado que la localización de ChsB en la membrana apical de las hifas se mantiene por un reciclaje endocítico que requiere la endocitosis de ChsB en la región subapical de la membrana, su reciclaje desde endosomas al TGN (mediado por la dineína, RabC y GARP) y su vuelta a la membrana plasmática desde el TGN (lo que requiere HypB y Trs120). Por tanto, la ruta de reciclaje de ChsB es similar a la seguida por Snc1 en *S. cerevisiae*, la cual requiere Ypt6 (RabC en *A. nidulans*) y GARP [40]. Es importante subrayar que el tráfico de ChsB a la membrana plasmática es independiente del exómero.

### 5.2. Estudio de la ruta de secreción de InuA

La inulinasa InuA es una enzima soluble que se secreta al exterior celular, donde degrada el polisacárido inulina. Esta enzima sufre N-glicosilaciones en su viaje al exterior celular que en este trabajo hemos aprovechado para determinar si InuA se encontraba bloqueada en el RE o había sido modificada por las enzimas de glicosilación del aparato de Golgi. Los resultados de esta tesis demuestran que InuA viaja desde el RE al Golgi en vesículas COPII, donde se fusionan en un proceso que requiere la SNARE SedV y la GTPasa RabO, como demuestra la inhibición de la secreción de InuA en los mutantes termosensibles de SarA, SedV y RabO. Los resultados indican que InuA llega desde el Golgi temprano al TGN, dado que no se exocita si se inactiva HypB (la GEF de Arf1 en el TGN). Sin embargo, el resultado más destacable fue que RabB, el regulador maestro de los endosomas tempranos, y uno de sus efectores (CORVET/Vps33) son esenciales para la secreción de InuA. Por el contrario, la integridad de los endosomas tardíos y las vacuolas no es necesaria para su exocitosis. En *S. cerevisiae* se ha descrito una ruta de secreción dependiente de endosomas [29, 30, 33]. Aunque presenta características diferentes, consideramos plausible que InuA se secrete por una ruta similar a la descrita en levadura y diferente a la ruta que toman EglC y ChsB desde el TGN (EglC y ChsB se exocitan eficientemente en ausencia de RabB). Podría existir una secreción directa de InuA desde los endosomas a la membrana plasmática, ya que es un proceso que se ha descrito previamente en el reciclaje endocítico [41] y en la secreción apical [13] y basolateral [34, 35, 42] de mamíferos.

### 5.3. Análisis de la ruta de secreción de EglC, una proteína anclada a GPI

Marcamos EglC con GFP en un punto “interno” de su secuencia proteica para no alterar el péptido señal ni la señal de anclaje del GPI. EglC-GFP-GPI se localiza en la superficie celular de manera “antipolarizada”, es decir práctica o totalmente excluida de las regiones apicales de las hifas (salvo del Spitzenkörper). EglC-GFP-GPI, al igual que InuA, sufre modificaciones postraduccionales que nos permitieron diferenciar las especies moleculares atrapadas en el RE de aquéllas que habían transitado por el Golgi, además de que pudimos visualizar dichas acumulaciones por microscopía de fluorescencia. A diferencia de InuA, EglC parece seguir una ruta más directa de secreción que no implica a los endosomas. Además de requerir el tráfico en vesículas COPII y la llegada al Golgi, como demuestra la acumulación de EglC en el RE en el mutante *sarA6*, nuestros resultados sugieren que desde el TGN EglC llega a la superficie celular en vesículas secretoras RabE, ya que EglC-GFP-GPI se acumula en estructuras intracelulares al inactivar Trs120, subunidad de TRAPP II necesaria para la activación de RabE [36, 37]. En una cepa silvestre EglC-GFP-GPI, además de localizarse en la superficie celular, también se encuentra en el Spitzenkörper. Proponemos un modelo altamente hipotético de tráfico por el cual EglC se enviaría en vesículas RabE al Spitzenkörper y, desde éste (que actuaría como centro organizador del tráfico), las vesículas RabE cargadas con EglC viajarían hacia regiones apico-distales, donde EglC se exocitaría, dando cuenta de su localización “antipolarizada”. Esta hipotética ruta de secreción sería semejante a la secreción basolateral que ocurre en células epiteliales de mamífero [35] y explicaría el hecho de que el ~24% de las vesículas RabE que llegan al Spitzenkörper se desplazan después en sentido basípeto, propulsadas por dineína sobre los microtúbulos [15, 36].

## 6. Discusión general y perspectivas de futuro

En esta tesis hemos establecido que el aparato de Golgi es un orgánulo dinámico y transitorio que se encuentra relacionado íntimamente con el RE, lo que refuerza los resultados de investigaciones con levaduras [43, 44] y células de mamífero [45, 46]. Los resultados obtenidos también subrayan las diferencias entre el Golgi temprano y el TGN; sin embargo las proteínas GEF esenciales del Golgi temprano (GeaA) y del TGN (HypB) son, hasta cierto punto, intercambiables, puesto que una sustitución en GeaA permite el crecimiento de *A. nidulans* en ausencia de HypB. Por otro lado, la caracterización básica de las GTPasas de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras demuestra el alto grado de conservación de estos interruptores moleculares.

Los resultados obtenidos a partir de la investigación del tráfico de ChsB, InuA y EglC muestran las diferencias en la ruta que cada uno de estos *cargos* sigue para localizarse adecuadamente. La localización de ChsB en la membrana apical se mantiene por un reciclaje

endocítico indirecto que implica su transporte desde un compartimento endosomal independiente de RabB al TGN en un proceso mediado por dineína, RabC y GARP. EglC, por su parte, realiza una ruta que depende del transporte al aparato de Golgi de dicha enzima recién sintetizada en el RE y de su exocitosis, hipotéticamente basolateral, en vesículas RabE. Por último, InuA realiza una ruta de secreción “indirecta” que está supeditada a la integridad de los endosomas tempranos, lo que sugiere que transita por éstos antes de secretarse. Estos resultados sugieren que en *A. nidulans* podrían existir diferentes rutas de tráfico intracelular que permitiesen la coordinación entre la obtención de nutrientes del medio extracelular, el crecimiento por extensión apical y la síntesis de pared celular.

### CONCLUSIONES

1. La  $\alpha$ -hélice C-terminal de SarA es clave para su función/estabilidad.
2. La inactivación de SarA desorganiza los sitios de salida del retículo (ERES) y provoca la agregación de Sec23.
3. El bloqueo de la formación de las vesículas COPII provoca la desorganización del aparato de Golgi y la parada de la extensión apical. Este efecto es sólo compatible con el modelo de maduración de cisternas.
4. La desorganización del aparato de Golgi causada por el bloqueo del tráfico de salida del retículo endoplasmático (RE) causa la reabsorción de las membranas del Golgi temprano en el RE y la disipación de las membranas del *trans*-Golgi (TGN).
5. El bloqueo del tráfico COPII tiene consecuencias morfogénicas en la región apical de las hifas de *Aspergillus nidulans*, que se traducen en la formación de globos apicales de ~10  $\mu$ m de diámetro.
6. Las proteínas de la familia Arf/Sar y sus reguladores realizan funciones esenciales y se encuentran altamente conservadas en *A. nidulans* con las de levaduras y humanos.
7. COPI y GeaA se localizan predominantemente en el Golgi temprano, siendo apenas detectables en el TGN.
8. Las proteínas de la familia GBF/Gea contienen un motivo serina-residuo aromático-residuo hidrofóbico ( $S\Omega\phi$ ) universalmente conservado en eucariotas. La sustitución Tyr1022Cys en el motivo  $S\Omega\phi$  de GeaA provoca la relocalización parcial al TGN y a la región apical de la membrana plasmática.
9. La sustitución Tyr1022Cys en el motivo conservado  $S\Omega\phi$  de GeaA permite la exocitosis y el crecimiento en ausencia de HypB.

## Resumen

---

10. La quitina sintasa ChsB se mantiene polarizada en el casquete apical de la membrana plasmática mediante una ruta indirecta de reciclaje endocítico que comporta su endocitosis en un anillo subapical de parches de actina, su viaje desde un compartimento endocítico al TGN mediado por dineína, RabC y el complejo GARP, y su salida del TGN en vesículas secretoras, de manera dependiente de HypB y Trs120.

11. La GTPasa RabO, que colocaliza con ChsB en el Spitzenkörper, es crítica para que ChsB se localice en la membrana plasmática.

12. La ruta de reciclaje endocítico de ChsB es independiente de RabB<sup>RAB5</sup> y del exómero.

13. InuA es una inulinasa que se secreta al exterior celular por una ruta que requiere la formación de las vesículas COPII, su llegada al aparato de Golgi, su paso por el TGN y la funcionalidad de los endosomas tempranos, pero no de los endosomas tardíos.

14. Las proteínas ancladas a glicosil fosfatidilinositol (GPI) EglC y GelE presentan una distribución “antipolarizada” en la superficie de las hifas.

15. La proteína anclada a GPI EglC probablemente se exocita por una ruta que implica la salida del RE en vesículas COPII, su paso por el Golgi temprano y el TGN y su exocitosis directa desde el TGN a la membrana plasmática de manera dependiente de Trs120.

16. En ausencia de RabD<sup>Sec4</sup> EglC se polariza al casquete apical.

# **SUMMARY**



# SUMMARY

## INTRODUCTION

The secretory pathway is a cellular process that is used to package certain protein molecules that are synthesized inside of the cell and are shipped out of the cell, to the plasma membrane (PM) or to the endosomes. Initially, newly synthesized proteins enter the endoplasmic reticulum (ER) by a process known as translocation. In the ER, cargo proteins are properly folded and some of them undergo N-glycosylation [1] or acquire a covalently attached glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor [2]. Next, cargoes exit the ER in COPII (*coat protein complex-II*) vesicles bound for the Golgi apparatus [3]. The initial interaction of this vesicle with a nascent cisterna of the Golgi is mediated by tethering factors and membrane fusion is facilitated by SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteins. Once in the Golgi the N-glycans bound to proteins are modified and extended [4, 5]. The Golgi complex consists of a network of compartments or cisternae that organize intracellular traffic. The identity and functions of these cisternae are determined by small GTPases; mainly members of the Rab [6] family or the Arf/Sar family [7, 8]. These enzymes are recruited to the cytosolic face of the Golgi membrane and thus activated upon GTP binding, and become soluble and inactive by hydrolysis of the GTP. GTP hydrolysis is stimulated by interaction with a GTPase-activating protein (GAP) whereas GDP to GTP exchange is stimulated by GTPase exchange factors (GEFs). Each GTPase recruits specific effectors to the Golgi apparatus, such as tethering factors, SNARE proteins, coat complexes and GEF or GAP proteins, each of them performing diverse functions. Cargo molecules traverse the Golgi eventually reaching the late Golgi (also known as *trans*-Golgi, TGN) where proteins and lipids are sorted into distinct transport carriers (such as tubules or vesicles) that are targeted to various destinations, such as the endosomes or the PM. Secretory vesicles can be delivered to specific regions of the PM, as it happens in polar secretion in fungi [12] or in the apical or basolateral exocytosis that takes place in epithelial cells [11]. It is also known that at least one branch of the yeast secretory pathway transits through endosomes before reaching the cell surface [13]. In summary, newly synthesized proteins are modified in the ER before reaching the Golgi apparatus, where they acquire more posttranslational modifications and are sorted to their final destinations: extracellular space, PM and endosomes.

Cytoskeleton plays an important role in the secretory pathway. In mammals and filamentous fungi microtubules and actin cables cooperate to facilitate intracellular movement of transport carriers. However, yeast cells do not seem to use microtubules for trafficking functions, as they only require actin cables for efficient exocytosis [14]. Secretory vesicles are

attached to cellular motors (dynein and kinesin-1 for microtubule interactions and myosin-5 to interact with actin) by Rabs, directly or through their effectors, [14, 15].

The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is a well-suited model organism to study the secretory pathway [16, 17]. Hyphal growth is driven exclusively by apical extension. Cell-wall synthesizing enzymes and the membrane required for cell expansion are delivered to the apex by exocytosis. This mode of growth and its heavy dependence on exocytosis represent an important experimental advantage, because mutations impairing exocytosis delay or preclude polarity establishment or result in a tip swelling [18].

### OBJECTIVES

These were the main objectives of this thesis:

1. To develop genetic tools in order to block COPII traffic from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus and to determine the effect of this traffic on secretion and Golgi organization.
2. To investigate the functional relationship between early Golgi and *trans*-Golgi by studying the Arf1 regulators (GeaA/Gea1 and HypB/Sec7) and effectors (COPI complex).
3. To perform a basic characterization of Arf/Sar GTPases and their regulators.
5. To determine the exocytic route and the underlying mechanisms by which certain transmembrane proteins are polarized in the apical dome of hyphae.
6. To determine the different stages of the exocytic route followed by a soluble cargo and a glycosylphosphatidylinositol anchored protein.

### RESULTS AND DISCUSSION

#### 1. Conditional blocking of the COPII traffic

Following mutagenic PCR we selected 8 thermosensitive alleles of *sarA* encoding SarA<sup>SAR1</sup>, a conserved GTPase required for COPII vesicles biogenesis, in order to conditionally impair COPII vesicles trafficking from the ER towards the Golgi apparatus. These mutations caused a marked reduction in SarA levels at semi-restrictive temperatures, which indicates that these SarA substituted proteins lost its conformation at high temperature and are degraded by quality control systems. Our purpose was to block the formation of COPII vesicles to assess the effects on the organization of the exocytic pathway. To that end, we studied the behaviour of fluorescent protein markers of exocytic compartments. Because setting the microscope above 37-39°C would damage it we had to choose the appropriate mutants. *sarA6* and *sarA7* strains impair growth substantially at 37°C, while *sarA1*, *sarA2*, *sarA3* y *sarA8* did not and *sarA4* y

*sarA5* mutants are affected even at 30°C. We chose *sarA6* because it resulted in just one substitution in SarA.

We first studied whether *sarA6* interferes with recruitment of COPII to endoplasmic reticulum exit sites (ERES) and showed that ERES become disorganized by forming aggregates, which has been described in other mutants that impair COPII vesicles formation [19, 20]. After determining acute inactivation of ER exit we showed that SynA becomes cytosolic after the temperature shift, which confirmed that exocytosis was arrested. Moreover RerA, which continuously cycles between the ER and the Golgi, is displaced towards the ER by *sarA6*, consistent with *sarA6* preventing its exit from the ER. Once established that *sarA* inactivation block ER exit, we studied its effects on the Golgi using integral (Golgi t-SNAREs SedV and TlgB) and peripheral protein markers (CopA, a COPI subunit, and PH<sup>OSBP</sup>, that is recruited to the late Golgi through coincidence detection of Arf1 and PtdIns4P). A rapid disorganization of the Golgi apparatus was seen within 10-30 minutes after shifting *sarA6* cells to 37°C. We have demonstrated that continuous transport of membranes from the ER to the Golgi is an indispensable condition for Golgi biogenesis and organization. This results are incompatible with the stable cisternae model, supporting instead cisternal maturation [21]. Moreover, Golgi disorganization has different effects on early Golgi and TGN membranes, with early Golgi membranes being reabsorbed by the ER and the TGN ones apparently dissipating. This results underscore the asymmetry of Golgi organization [22, 23]. Finally, we determined the morphogenetic potential of abrogating COPII traffic. Downregulation of ER exit causes the formation of large balloons at hyphal tips, ~10 µm in diameter, delimited by a very conspicuous layer of chitin.

## **2. Systematic analysis of the Arf/Sar family proteins and their regulators (GEFs and GAPs)**

To systematically analyze the Arf/Sar GTPases family and their regulatory proteins, GEFs and GAPs, we identified, classified and deleted every member of these families in *A. nidulans*. The shared characteristics of these proteins and their putative orthologs in *S. cerevisiae* and humans revealed a high degree of conservation of these molecular switches. Moreover, the deletion of their corresponding genes showed that a high proportion of them were essential genes, as they were in *S. cerevisiae*, which indicated functional conservation in eukaryotes.

## **3. Sustainment of fungal growth in absence of hypB (SEC7)**

HypB is an Arf1-GEF that localizes the TGN (Sec7p and BIG1/BIG2 in *S. cerevisiae* and mammals, respectively) [24]. *hypB5* is a thermosensitive mutation that impairs growth at 42°C [25]. After UV mutagenesis 40 revertant strains were selected for growth at 42°C. In all but one case, reversion occurred within *hypB*. Genetic mapping verified that this suppressor

mutation was linked to AN0112, encoding GeaA, an Arf1-GEF putatively located in the early Golgi (called Gea1p in yeast, GBF in mammals). Sequencing of this gene revealed the presence of a missense mutation causing Tyr1022Cys substitution in GeaA (we named this mutant allele *geaA1*, and GeaA1 to the mutant protein). We further demonstrated that *geaA1* suppresses *hypB5* thermosensitivity and, indeed, *geaA1* also suppressed lethality caused by *hypBΔ*. Tyr1022 lies in a previously unidentified Gea/GBF specific motif Ser-Ω-ϕ (where Ω indicated an aromatic and ϕ an hydrophobic residue), causing GeaA1 redistribution towards the apex. The fact that GeaA with a single substitution sustains growth in the absence of HypB is of great importance, because GeaA and HypB are the only essential Arf1-GEF proteins. In any case, future research addressing how the GeaA1 substitution has such an impact on its localization will be needed to unveil the underlying suppression mechanism.

#### **4. Subcellular localization and characterization of CopA, an essential subunit of COPI**

CopA corresponds to the  $\alpha$  subunit of COPI in *A. nidulans* [26]. In order to express a fluorescently tagged version of CopA at physiological levels we replaced the endogenous *copA* gene with a *copA* version that encodes CopA-GFP, representing the only source of CopA in the transformant strain. CopA-GFP localizes to polarized structures that correspond to early Golgi cisternae, as determined by using mCherry-SedV as an early Golgi marker and mRFP-PH<sup>OSBP</sup> as a TGN marker. This predominant location of CopA in early Golgi structures underlines de Golgi apparatus asymmetry and is consistent with a main involvement of COPI in early Golgi, as previously suggested [27].

#### **5. Study of the exocytic pathway followed by three different cargoes: ChsB, InuA and EglC**

In the last part of this thesis we investigated the traffic of three different cargoes. Firstly, we studied ChsB, an essential chitin synthase that is polarized to the apical dome, where polarized growth takes place [28]. Secondly, we studied EglC, a GPI anchored exoglucanase. Lastly, we tracked the secretory pathway of InuA a soluble extracellular inulinase.

In *S. cerevisiae* differences in the exocytosis of soluble enzymes, GPI-anchored proteins and transmembrane proteins had been described [29-33]. Moreover, additional data described different branches in the exocytic route for different cargoes [34, 35]. In summary, we tried to address the following question: ¿are there different exocytic pathways for proteins with different structure or physiological functions?

##### **5.1. Endocytic recycling of ChsB**

To track ChsB we tagged *chsB* endogenously to express N-terminal tagged fusion proteins. *gfp-chsB* and *mCherry-chsB* strains grew like a wt one, indicating that this N-terminal fusion proteins fulfil the physiological role of ChsB. ChsB can be seen at the Spitzenkörper (SPK) and the PM, forming a conspicuous crescent at the tip, colocalizing with SynA, a SNARE protein. We took several approaches to demonstrate that polarization of ChsB requires its endocytosis in an endocytic collar located in a subapical region. In addition, ChsB localizes to internal puncta, resembling Golgi cisternae. We studied the Golgi localization of ChsB with the early Golgi SedV SNARE and with the TGN reporter PH<sup>OSBP</sup>. ChsB and PH<sup>OSBP</sup> showed almost complete colocalization, whereas ChsB did not colocalize with SedV. Thus ChsB localizes to the TGN. Moreover, most of ChsB localize to the most apical TGN cisternae and resides at the TGN only transiently,  $58 \pm 4$  sec S.D. The greater abundance of ChsB in the most apical TGN cisternae suggested that retrograde transport connects the endosomal compartments receiving traffic from the subapical collar with the TGN, and that such transport might involve dynein. We investigated this possibility with two thermosensitive mutations, *nudA2* and *nudA5*, affecting the dynein heavy chain [15]. When *nudA2* and *nudA5* cells were shifted to 37°C ChsB delocalized to an intracellular aggregate at the tip region, at the expense of the PM pool. This compartment in which ChsB stalls is readily accessible to the endocytic tracer FM4-64. Thus the above results strongly indicate that traffic between endosome compartments to which endocytosed ChsB arrives and the TGN involves dynein.

What pathway does ChsB recycling from the TGN to the PM follow to return to the PM? In *A. nidulans* TGN membranes giving rise to secretory vesicles transit from Golgi to post-Golgi identity following the recruitment of RabE mediated by its GEF, TRAPP<sup>II</sup> [36, 37]. The observation that the acute inactivation of Trs120, a key component of TRAPP<sup>II</sup>, relocalizes ChsB from the apical crescent to internal structures strongly suggests that ChsB follows this RabE- dependent pathway. Next, we demonstrated that ChsB accumulates in membranes with TGN identity after imposing a HypB/Sec7 block. Taken together all the above data strongly indicated that the ChsB steady state localization at the tip crescent is maintained by endocytic recycling through the HypB/Sec7-containing TGN.

The Golgi-associated retrograde protein (GARP) complex is a key effector of Rab6/RabC; mediating and tethering fusion between endosome-derived retrograde transport carriers and the TGN [39]. Like *rabCΔ*, *vps52Δ* diminished the amount of ChsB localizing to the apical crescent at 28°C, and did so to a similar extent than *rabCΔ*. We shifted wt and *vps52Δ* cells to 37°C and examined the fate of ChsB, using CMAC staining to detect late endosomes and vacuoles. In *rabCΔ* and *vps52Δ* cells the internal ChsB pool was progressively displaced to the abundant vacuoles that characterize these mutants, whereas localization to the apical crescent was virtually abolished.

In conclusion, we demonstrated that ChsB polarization is maintained by an indirect endocytic recycling pathway that requires ChsB endocytosis in the subapical collar of actin patches, its transport from a sorting endosome to the TGN (mediated by dynein, RabC and GARP) and its way back to the PM from the TGN, which requires HypB/Sec7 and Trs120. Thus the cycling route followed by ChsB (and SynA) would be akin to that followed by Snc1 in *S. cerevisiae*, which is Ypt6 (RabC)-dependent [40]. Finally it is important to highlight that ChsB traffic is an exomer-independent process.

### 5.2. Study of the InuA secretory pathway

Inulinase InuA is a soluble enzyme that is secreted outside of the cell, where it degrades the polymer inuline. This enzyme suffers N-glycosylation *en route* to be exocytosed. We have taken advantage of this fact to determine if InuA was blocked in the ER or had yet entered the Golgi. These thesis results demonstrate that InuA journeys from the ER to the Golgi apparatus in COPII vesicles where they fuse in a SedV- and RabO-dependent manner, as shown by the absence of secretion in SarA, SedV and RabO thermosensitive mutants. The results of this work also show that TGN is another stop in the InuA secretory pathway because when HypB/Sec7 is inactivated InuA is not secreted. However, the most outstanding finding is that RabB/RAB5, the major Rab acting in the early endosomes, and one of its effectors (CORVET/Vps33) are essential for InuA secretion. On the contrary, late endosomes and vacuole integrity is not a requirement for InuA exocytosis. It is known that in *S. cerevisiae* one branch of the secretory pathway is endosome dependent [29, 30, 33]. We consider that the route followed by InuA is similar to that one described in yeast and different from the pathway taken by EglC and ChsB from the TGN (EglC and ChsB exocytosis do not require RabB). A direct exocytosis of InuA from endosomes is a plausible explanation for this requirement as the secretion directly from endosomes is a previously described process in endocytic recycling [41] and in apical [13] and basolateral [34, 35, 42] secretion of mammals.

### 5.3. Tracking the secretory pathway of EglC, a GPI anchored protein

We tagged EglC with GFP in an internal position of the protein to avoid affecting the N-terminal signal peptide and the C-terminal GPI anchor signal.

EglC-GFP-GPI localized to the cell surface in an “antipolarized” fashion, it is almost totally excluded from the most apical regions of hyphae (except for its localization to the SPK).

EglC-GFP-GPI, as InuA, is posttranslationally modified, what allowed us to differentiate ER-trapped species from those that reached the Golgi. As EglC was fluorescently tagged we could also visualize those internal accumulations by fluorescence microscopy.

Unlike InuA, EglC seems to follow a more direct exocytic route that does not involve early endosomes function. Apart from requiring COPII traffic and Golgi arrival, as shown by EglC-GFP-GPI being accumulated in the ER in *sarA6* cells, our results suggest that EglC exits the TGN in RabE secretory vesicles because EglC-GFP-GPI accumulates in internal structures after Trs120 inactivation, a TRAPP2 subunit needed for RabE activation [36, 37].

The above results and the presence of EglC-GFP-GPI at the SPK led us to propose a highly hypothetical model for EglC traffic. EglC would be carried in RabE secretory vesicles to the SPK. Once in the SPK (that would be a secretion organizing centre) EglC/RabE vesicles would travel basipetally where EglC would be exocytosed. This model would explain the “basolateral” localization of EglC-GFP-GPI in the cell surface and the basipetal movement of ~24% RabE vesicles [15, 36]. This hypothetical route would be similar to the basolateral secretion that takes place in mammalian epithelial cells [35].

### **6. General discussion and future perspectives**

In this thesis we have established that the Golgi apparatus is a dynamic and transitory organelle highly dependent on ER, supporting previous finding in yeast [43, 44] and mammals [45, 46]. Remarkable differences between early Golgi and TGN are also described in this thesis; however, the essential early Golgi and TGN Arf-GEFs (GeaA and HypB, respectively) are, to some extent, interchangeable because a substitution in GeaA bypass the essential requirement of HypB. Additionally, the basic characterization of Arf/Sar GTPases and their regulators showed a high degree of conservation of these molecular switches.

Finally we investigated the exocytic routes followed by three different cargoes ChsB, InuA and EglC. The results obtained from this study show the differences in the traffic pathway used by these cargoes. ChsB is polarized to the apical dome by indirect endocytic recycling, such that the enzyme that diffuses away from the apex is internalized by the subapical collar of actin patches, re-routed from endosomes to TGN cisternae in a dynein-, GARP- and RabC-dependent manner and subsequently re-delivered to the apex.

EglC travels through a pathway that involves ER exit, early Golgi and TGN function. Hypothetically EglC is finally exocytosed far away from the apex in RabE secretory vesicles.

Finally, InuA seems to follow a different branch of the secretory pathway that requires early endosomes function, which suggests that travels through endosomes before secretion.

These results suggest that different exocytic pathways coexist in *A. nidulans* that would be essential for coordinating three key processes in the hyphal mode of life: nutrient uptake, polar growth and cell wall synthesis.

### CONCLUSIONS

1. The C-terminal  $\alpha$ -helix of SarA is key for its function/stability.
2. SarA inactivation disorganizes the endoplasmic reticulum exit sites (ERES) and cause aggregation of Sec23.
3. The impairment of COPII vesicles formation disorganizes the Golgi apparatus and arrests apical extension. This effect is only compatible with cisternal maturation.
4. Golgi apparatus disorganization caused by blocking COPII traffic leads to the reabsorption of Golgi membranes by ER and to *trans*-Golgi (TGN) membranes dissipation.
5. COPII traffic impairment has morphogenetic consequences on the apical region of hyphae, by forming apical balloons, *circa* ~10  $\mu\text{m}$  in diameter.
6. The Arf/Sar family of proteins and their regulators perform essential functions and are highly conserved in *A. nidulans* with respect to their yeast and human homologues.
7. COPI  $\alpha$  subunit and GeaA mainly localizes to the early Golgi, being almost undetectable in the TGN.
8. GBF/Gea family of proteins contain a universally conserved motif among eukaryotes, serine-aromatic residue-hydrophobic residue ( $\text{S}\Omega\phi$ ). Tyr1022Cys substitution in this motif shifts GeaA localization towards the TGN and the apical plasma membrane.
9. Tyr1022Cys substitution in the conserved motif  $\text{S}\Omega\phi$  of GeaA allows exocytosis and growth in the absence of HypB.
10. ChsB is polarized to the apical dome by indirect endocytic recycling, such that the enzyme that diffuses away from the apex is internalized by the subapical collar of actin patches, re-routed from endosomes to TGN cisternae in a dynein-, GARP- and RabC-dependent manner and subsequently re-delivered to the apex in a process that requires HypB and Trs120.
11. RabO GTPase colocalizes with ChsB in the Spitzenkörper and is critical for ChsB traffic to the plasma membrane.
12. Endocytic recycling of ChsB is RabB<sup>RAB5</sup>- and exomer- independent.
13. InuA is an inulinase that is secreted outside of the cell by a route that requires COPII vesicle traffic, transit through Golgi apparatus, TGN and early endosomes. Late endosomes are not required for InuA secretion.
- 14- Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins EglC and GeIE have an “antipolarized” distribution in the cell surface.
15. GPI-anchored protein EglC is probably exocytosed by a route that involves its exit from the ER in COPII vesicles, its traffic through the early Golgi and the TGN. Finally it is exocytosed directly from the TGN to the plasma membrane in a Trs120-dependent manner.
16. In the absence of RabD<sup>Sec4</sup> EglC is polarized towards the apical dome.





# **INTRODUCCIÓN**

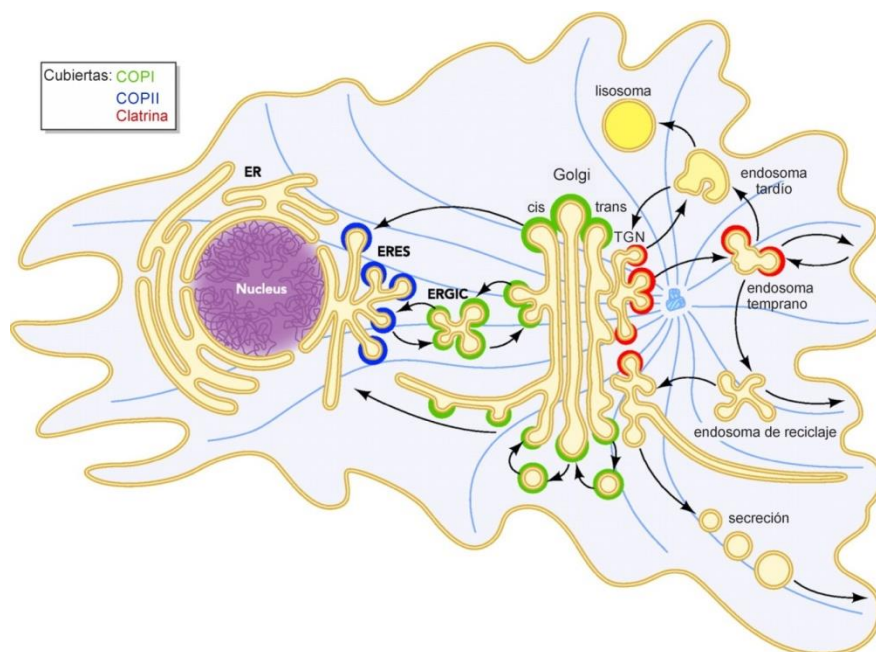


La ruta secretora es un proceso celular por el que determinadas proteínas maduran postraduccionalmente y son enviadas al exterior de la célula o distribuidas en la membrana plasmática. Por tramos intermedios de esta ruta también viajan las proteínas de la membrana o del lumen del retículo endoplasmático (RE), del aparato de Golgi y del sistema endovacuolar. El RE es la vía de entrada a la ruta secretora de las proteínas sintetizadas por los ribosomas adheridos a este orgánulo (Figura I.1). Muchas de estas proteínas, entre ellas las proteínas solubles, contienen, en su extremo N-terminal, un péptido señal que permite su entrada al RE: este péptido señal es reconocido por un complejo multiproteico denominado translocón, que forma un poro en la membrana del RE que permite la entrada de las proteínas, lo que ocurre simultáneamente al corte por una proteasa del péptido señal antes citado [47]. Una vez en el lumen del RE, las proteínas adquieren su conformación nativa con ayuda de chaperonas [48] y sufren modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones son, principalmente, la N y O-glicosilación de algunos residuos de Asn o Ser/Thr, respectivamente; el corte de la señal C-terminal de anclaje de glicosil fosfatidilinositol (GPI) y la subsiguiente unión covalente del GPI en el sitio de corte; y, finalmente, la formación de puentes disulfuro. A continuación, las proteínas que viajan en la ruta secretora (i.e. *cargos*) se incorporan en vesículas COPII, que geman del RE y viajan al Golgi para fusionarse con sus cisternas (Figura I.1). Estas vesículas están recubiertas por el complejo proteico COPII (coat protein complex-II), que recluta el *cargo* y deforma físicamente la membrana del RE, promoviendo la formación de una vesícula que contiene las proteínas que viajan al Golgi [49]. Las vesículas COPII se fusionan entre ellas o con las cisternas del aparato de Golgi, una vez que los llamados factores de anclaje o de *tethering* las acercan a la cisterna en formación. Las proteínas SNAREs median finalmente la fusión de las membranas [50]. Existe un debate sobre si las cisternas del Golgi se forman *de novo* por fusión de vesículas COPII o si las vesículas COPII se fusionan con cisternas preexistentes. Este debate se concreta en dos modelos: de maduración de cisternas y de cisternas estables (ver más adelante). En el aparato de Golgi, las cadenas de N-oligosacáridos se modifican y extienden por enzimas residentes del Golgi y se producen O-glicosilaciones [4, 5, 51].

En mamíferos, el aparato de Golgi es un conjunto de cisternas apiladas y conectadas por túbulos [52, 53], rodeado de vesículas próximas a las cisternas [54]. La identidad de las cisternas del aparato de Golgi y sus funciones subyacentes están controladas por GTPasas pequeñas de la familia Rab [6] y de la familia ARF (*ADP ribosylation factor*) / SAR (*Secretion-associated Ras-related protein*) [7, 8]. Estas enzimas se activan y se reclutan a la monocapa citosólica de las membranas del Golgi cuando se cargan con GTP, y se inactivan y liberan de la monocapa al hidrolizar el GTP. Estos dos eventos están regulados por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y por las proteínas estimuladoras de la

## Introducción

actividad GTPásica (GAPs) correspondientes, respectivamente. Cada GTPasa recluta un conjunto de proteínas efectoras (factores de anclaje o *tethering*, proteínas SNAREs, proteínas de cubierta y proteínas GEFs y GAPs, entre otros), a través de los cuales se ejecutan diversas funciones, como por ejemplo el reclutamiento del complejo de cubierta COPI, que media tráfico *intra-Golgi* y retrógrado al RE [55]. Desde el Golgi, el *cargo*, posiblemente concentrado en subdominios especializados [9], es reconocido y enviado en túbulos o en vesículas a su destino final (los endosomas o a la membrana plasmática [10] (Figura I.1). En la salida de las proteínas del Golgi también están implicados complejos de cubierta, como la clatrina o, hipotéticamente, el exómero [56]. Además, el tráfico puede dirigirse a una región concreta de la membrana plasmática, como por ejemplo en los casos de las rutas de exocitosis apical o basolateral en células epiteliales [11] o en la secreción apical en hongos [12]. También se ha demostrado que existen proteínas específicas que llegan a la membrana plasmática o al exterior celular tras su paso por los endosomas [13]. En resumen, las proteínas sintetizadas y modificadas en el RE viajan al aparato de Golgi, donde maduran y son clasificadas para su envío a sus destinos finales, que son, principalmente, el exterior celular, la membrana plasmática y los endosomas.



**Figura I.1. Rutas de tráfico intracelular en metazoos superiores.** Se muestran la ruta secretora y el tráfico a los endosomas. Las proteínas carga son sintetizadas en el RE y, después de concentrarse en los ERES, viajan en vesículas COPII al aparato de Golgi. En el Golgi las proteínas se glicosilan y son enviadas, desde el TGN, a la membrana plasmática o a los endosomas. COPI dirige el tráfico retrógrado entre el Golgi y el RE y dentro del Golgi. Adaptado de Szul *et al.* [53].

Por último, el citoesqueleto juega un papel importante en la ruta secretora. En mamíferos y hongos filamentosos los microtúbulos y los cables de actina cooperan en el tráfico intracelular. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, la exocitosis requiere únicamente cables de actina [14]. Las

vesículas secretoras se adaptan mediante Rabs, directamente o a través de sus efectores, a los motores (dineína y kinesina-1 para microtúbulos, miosina-5 para actina) que les permiten desplazarse a lo largo de los filamentos del citoesqueleto [14, 15].

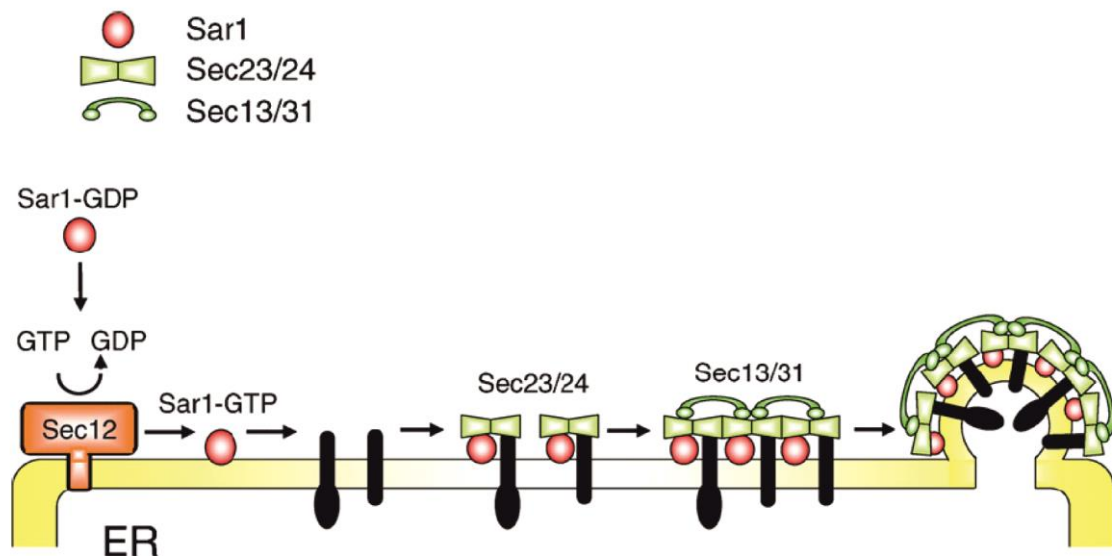
### 1.1. La interfaz retículo endoplasmático/aparato de Golgi

El tráfico en la interfaz RE/Golgi está controlado por los complejos de cubierta COPII y COPI [57]. Pese a que la organización de esta interfaz RE/Golgi varía enormemente en diferentes especies, las funciones celulares de COPI y COPII están, en general, conservadas en eucariotas [57].

#### 1.1.1. Tráfico anterógrado: la cubierta COPII

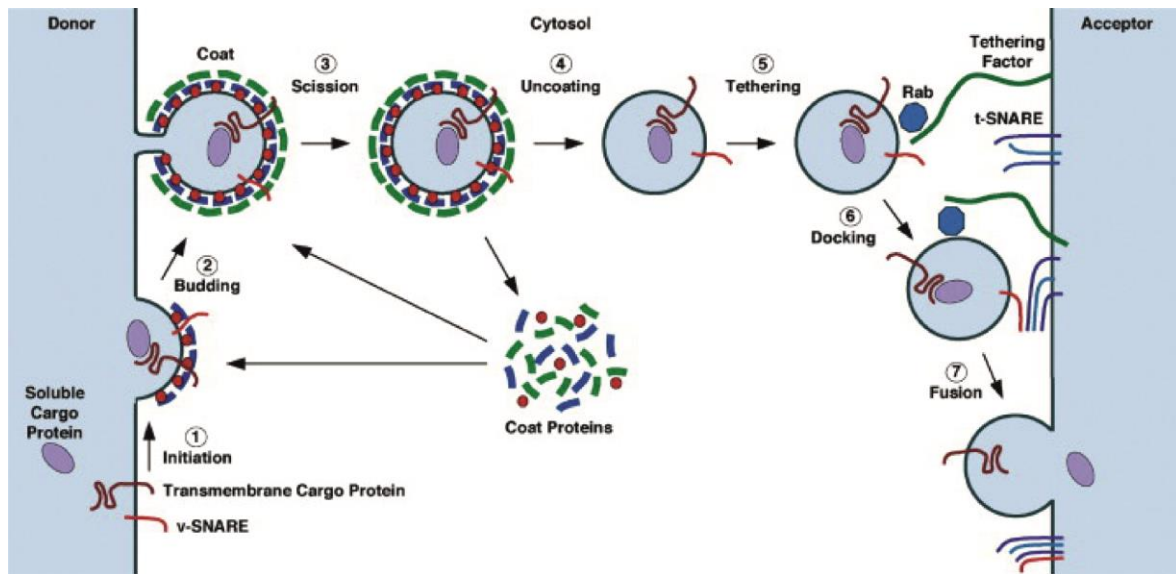
Para salir del RE, las proteínas, adecuadamente plegadas y ensambladas, se concentran en subdominios de la membrana del RE, denominados sitios de salida del retículo endoplasmático o ERES (*endoplasmic reticulum exit sites*, Figura I.1). Los ERES son ricos en COPII y se visualizan por microscopía de fluorescencia con componentes de COPII marcados con proteínas fluorescentes [58]. Además, la proteína Sec16, que también se localiza en estos subdominios, ayuda a su organización y mantenimiento [59]. Los *cargos*, concentrados en los ERES por interacción con COPII se incorporan a las vesículas nacientes y viajan al Golgi.

COPII es un complejo formado por tres componentes funcionales: Sar1 es la GTPasa monomérica que activa el proceso [60], reclutando el resto de componentes; el heterodímero Sec23/24 selecciona el *cargo* que se transporta y regula la hidrólisis de GTP por parte de Sar1; y el heterotetrámero Sec13/31 deforma la membrana para la formación de la vesícula (ver Figura I.2 y pie de figura) [49, 61]. Sar1 es citosólica e inactiva en su forma unida a GDP, pero cuando se carga con GTP cambia de conformación y expone una  $\alpha$ -hélice N-terminal anfipática que se inserta en la membrana del RE, contribuyendo probablemente a su deformación [62]. La actividad de Sar1 está restringida al RE porque Sec12 [63, 64], la GEF que activa a Sar1, es una proteína transmembrana específica de dicho orgánulo [65]. Una vez reclutado Sec23-Sec24, Sec24 es responsable de la interacción con el *cargo*. Existen señales específicas de exportación en el dominio citosólico de muchas proteínas transmembrana. Entre ellas están motivos aromáticos, hidrofóbicos en C-terminal, di-hidrofóbicos y di-ácidos [66], que pueden interactuar directamente con Sec24 [67]. Por otro lado, algunas proteínas interactúan con COPII de manera indirecta, a través de proteínas adaptadoras [68]. Se forman, por tanto, complejos Sec23/24-Sar1-*cargo*. Seguidamente, se recluta el heterotetrámero Sec13-Sec31, el cual concentra dichos complejos y completa la deformación de la membrana, formándose la vesícula.



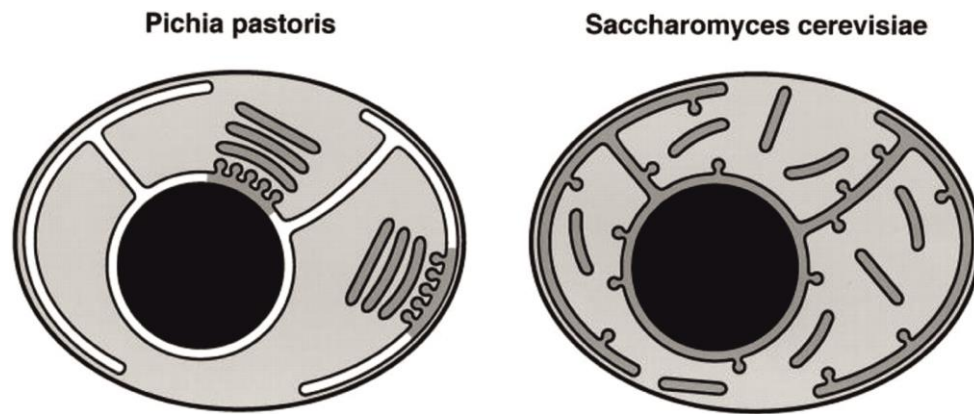
**Figura I.2. Formación de vesículas COPII.** Este proceso se inicia por la activación, mediada por Sec12, de la GTPasa Sar1, que se carga con GTP y se inserta en la membrana del RE (ER en la figura). En dicha membrana, Sar1-GTP recluta a Sec23/24, que difunde en el plano de la membrana y reconoce proteínas específicas para su transporte al Golgi. Sec13/31, reconoce y agrupa los complejos Sec23/24-Sar1 y deforma la membrana, hasta la formación de una vesícula independiente que se dirige al Golgi. Adaptado de Sato *et al.* 2007 [61].

En algunos casos COPII debe adaptar su forma para permitir el transporte de *cargo* de gran tamaño, como por ejemplo ocurre con las fibras de procolágeno en mamíferos [69]. Pese a que COPII es relativamente flexible, en esta adaptación intervienen una serie de proteínas moduladoras [3, 69]. Una vez formada la vesícula, se produce la hidrólisis del GTP y, presumiblemente, como consecuencia el complejo COPII se desensambla [70]. Las vesículas COPII se envían al Golgi gracias a la acción coordinada de RAB1 (Ypt1p en *Saccharomyces cerevisiae* [71], RabO en *Aspergillus nidulans* [18]) [72] y de complejos de anclaje, como p115/Usolp y TRAPPI (*transport particle I*) (este último actúa como GEF de RAB1 / Ypt1p / RabO [37, 73, 74]). La fusión está mediada por complejos SNAREs (Figura I.3). En *S. cerevisiae* y *A. nidulans* la SNARE del tipo sintaxina que se encuentra en el Golgi y “recibe” el tráfico del RE se denominan Sed5p [75] y SedV [18], respectivamente.



**Figura I.3. Formación y fusión de una vesícula de transporte.** Los componentes de la cubierta son reclutados por una GTPasa (en rojo), que interaccionan con la proteína carga y deforman la membrana (1), para finalmente formarse una vesícula (2) que contiene v-SNAREs. El complejo de cubierta se desensambla, junto con la hidrólisis del GTP por parte de la GTPasa (3). La vesícula viaja a la membrana aceptora e interacciona con un factor de anclaje a través de una proteína Rab (5). La aproximación de la vesícula permite la interacción entre la v-SNARE con las t-SNAREs, formando un complejo trans-SNARE (6), lo que promueve la fusión de la vesícula con la membrana aceptora. Esto provoca la liberación del cargo en el compartimento aceptora. Existen mecanismos de transporte retrógrado para reciclar las SNAREs. Adaptado de Bonifacino *et al.* 2004 [50].

Es posible que el tráfico de las vesículas COPII al Golgi determine la formación de la cisternas de dicho orgánulo, como propone el modelo de maduración de cisternas (ver más abajo) [21]. De hecho, basándose en un estudio comparado de *Pichia pastoris* y *S. cerevisiae*, Glick y colaboradores han propuesto que la disposición y abundancia de los ERES determina la estructura del Golgi [58]. *P. pastoris*, al igual que las células de mamífero, contiene un número relativamente bajo de ERES, lo que hipotéticamente sería la causa de la formación de un Golgi apilado, como consecuencia de la fusión continua de las vesículas COPII en una misma localización intracelular. En *S. cerevisiae*, al igual que en *A. nidulans* [24], los ERES son numerosos y dispersos, lo que tendría como consecuencia que cada cisterna del Golgi se formase en una localización diferente, dando lugar a un Golgi no apilado (Figura I.4). Por tanto, este estudio comparado plantea que los sitios de formación de las vesículas COPII en el RE determinan la distribución espacial del principal componente de la ruta secretora, que es el aparato de Golgi.



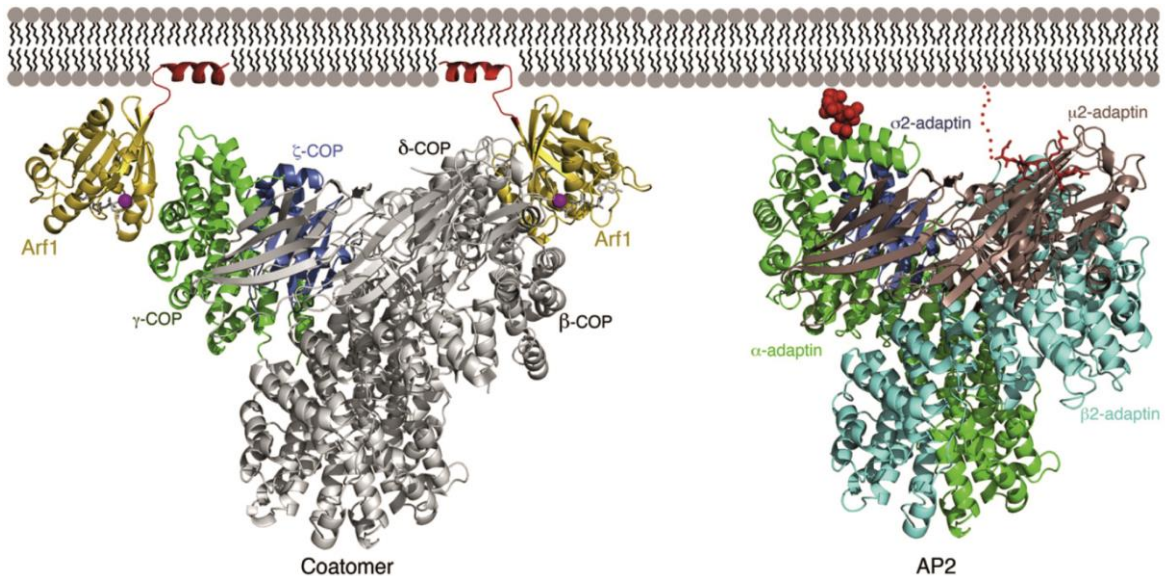
**Figura I.4. Distribución de los ERES en *P. pastoris* y *S. cerevisiae*.** Las regiones sombreadas del RE son las que pueden funcionar como ERES. Adaptado de Rossanese *et al.* 1999 [58].

## 1.1.2. Tráfico retrógrado: la cubierta COPI

Para mantener la identidad del RE y del aparato de Golgi es necesario que las proteínas residentes de cada orgánulo permanezcan en su localización apropiada. De hecho, la incorporación del *cargo* en vesículas COPII es altamente selectiva. Sin embargo, una proporción de proteínas residentes del RE acaban incorporándose en dichas vesículas y viajan al Golgi ya sea porque, aun no teniendo una señal de exportación, son arrastrados por el *cargo* (transporte pasivo o *bulk flow*), o porque dichas proteínas forman parte de la maquinaria requerida para el transporte y la fusión, como las SNAREs y las denominadas proteínas adaptadoras de los *cargos* solubles [76]. Uno de los mecanismos para mantener la asimetría composicional entre RE y Golgi es el transporte retrógrado al RE de proteínas que deben permanecer en éste. En otras palabras, para que el sistema funcione, además de existir un tráfico anterógrado que transporta el *cargo*, existe un transporte retrógrado de vuelta al RE para todas aquellas proteínas que se escapan o que intervienen en el transporte dependiente de COPII. Dicho transporte retrógrado es esencial para el funcionamiento de la ruta secretora [77].

El tráfico retrógrado Golgi→RE está mediado por el complejo de cubierta COPI. El complejo COPI, también denominado coatómero, está formado por siete subunidades ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta'$ ,  $\epsilon$ ). Se localiza principalmente en el aparato de Golgi, en el compartimento intermedio RE-Golgi que existe en mamíferos (ERGIC, *endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment*, un complejo túbulo-vesicular entre el RE y el Golgi, que se puede ver como una cisterna del Golgi con gran actividad de transporte retrógrado) y en vesículas de transporte [78]. Las subunidades del coatómero forman dos subcomplejos: el tetrámero  $\beta/\delta/\gamma/\zeta$ -COP, que es estructuralmente similar a los adaptadores de clatrina (las subunidades  $\gamma$ -COP y  $\zeta$ -COP son similares a  $\beta$ AP-2 y a  $\sigma$ AP-2 [79, 80]); y el trímero  $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP, que es similar a las subunidades de clatrina, y conforma la capa externa, de un modo semejante a Sec13/Sec31 en COPII [81]. (Véase la Figura I.5 para comparar las estructuras del tetrámero  $\beta/\delta/\gamma/\zeta$ -COP y de AP2). Tanto

en el tráfico dependiente de clatrina como de COPII el reconocimiento del *cargo* tiene lugar en la capa interna (AP o Sec23/Sec24), lo que también es cierto para COPI. Sin embargo en COPI también existen señales de exportación que se reconocen en la capa externa.



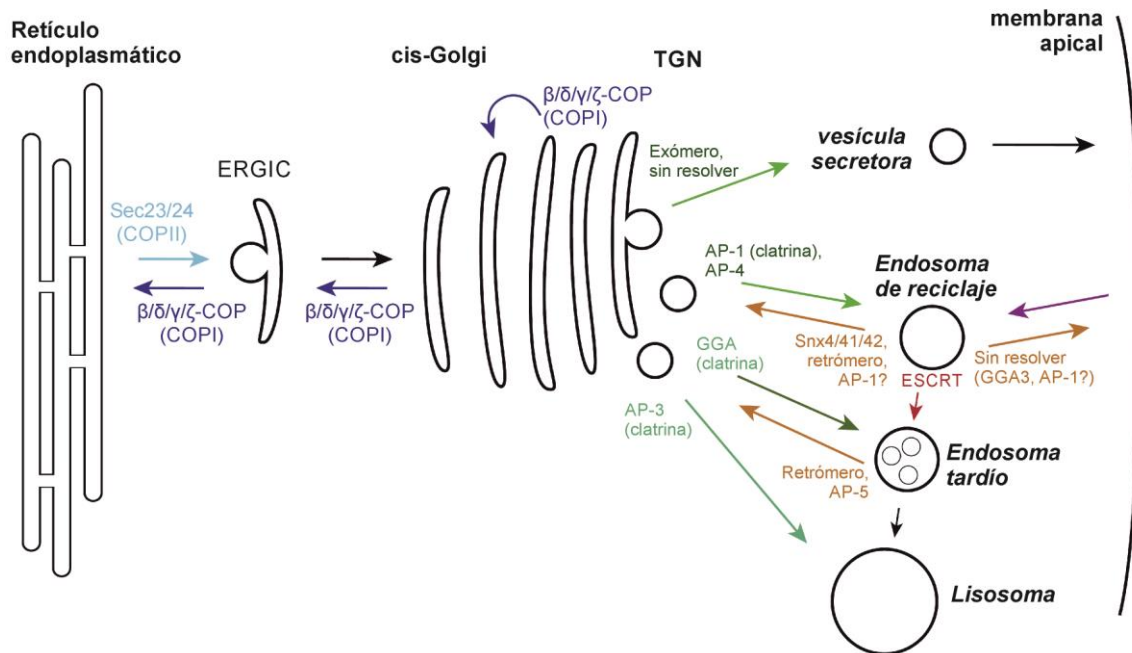
**Figura I.5. Comparación estructural entre la capa interna de COPI y AP2.** A la izquierda, el subcomplejo  $\beta/\delta/\gamma/\zeta$ -COP unido a membrana por interacción con dos moléculas de Arf1-GTP. Las subunidades  $\gamma/\zeta$ -COP y Arf1 están cristalizadas. El resto (en gris) es un modelo. A la derecha se muestra la estructura de la forma abierta de AP2. Nótese el gran parecido estructural de ambos complejos proteicos. Adaptado de Yu *et al.* 2012 [83].

COPI se recluta a las membranas del Golgi por Arf1 [82, 83] y, además de mediar tráfico retrógrado hacia el RE, realiza el transporte de proteínas entra las cisternas del Golgi (Figura I.6). Sin embargo, a pesar del gran conocimiento bioquímico que existe tanto del complejo COPI como de su funcionamiento en el transporte retrógrado al RE, no se ha claramente establecido qué tipo de tráfico media dentro del aparato de Golgi, si anterógrado, retrógrado o ambos (ver más adelante).

Mecánicamente, COPI actúa de manera similar a COPII. Como su pariente Sar1, la GTPasa Arf1, al cargarse con GTP, extiende una  $\alpha$ -hélice anfipática, que se encuentra en posición N-terminal. Esta hélice se inserta en la monocapa citosólica de la membrana del Golgi [84]. A diferencia de Sar1, Arf1 tiene un grupo miristoilo unido covalentemente a dicha  $\alpha$ -hélice, que colabora en estabilizar la inserción en la membrana [85]. Una vez anclada en la membrana, Arf1 recluta el tetrámero correspondiente a la “capa interna” de COPI ( $\beta/\delta/\gamma/\zeta$ -COP) que, a su vez, reconoce el *cargo* [55]. Este subcomplejo puede, además, estimular la actividad GAP de la proteína ArfGAP que invierta [55]. Se forman, entonces, complejos COP-Arf1-*cargo*. Seguidamente, se recluta a estos complejos el trímero  $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP, que conforma la capa

# Introducción

externa; varios de estos trímeros polimerizan, concentran el *cargo*, deforman la membrana y generan una vesícula repleta de proteínas para su transporte [55, 86].

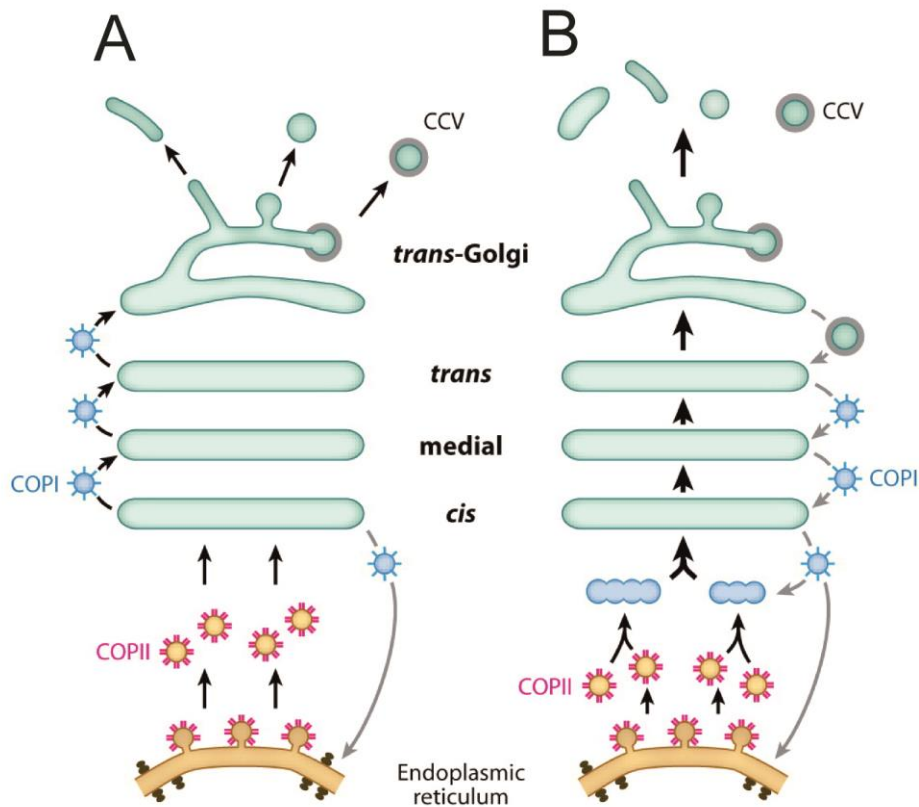


**Figura I.6. Localización de las proteínas adaptadoras del cargo.** Representación esquemática de las rutas secretora y endocítica, mostrando las rutas controladas por los adaptadores de carga. Se cree que el tráfico a la membrana basolateral, que no se muestra, está controlado por adaptadores similares a los del sistema endosomal [34]. Nótese que el exómero existe en levaduras y no tiene un homólogo en mamíferos. ERGIC: *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*. Adaptada de Paczkowski *et al.* [86].

## 1.2. El tráfico en el aparato de Golgi: modelos

Pese a que la descripción por Camillo Golgi de este orgánulo data de 1898, hasta la introducción del microscopio electrónico en los años 1960 la existencia del aparato de Golgi no fue aceptada ampliamente por la comunidad científica [87]. Los primeros estudios por microscopía electrónica determinaron que el aparato de Golgi estaba formado por una serie de cisternas apiladas, rodeadas de vesículas. Estas imágenes estáticas, junto a estudios inmunohistoquímicos y bioquímicos de aislamiento de fracciones del Golgi en los que se descubrió que las diferentes cisternas tenían una composición diferente en cuanto a su contenido en enzimas de glicosilación, llevaron a la elaboración de un modelo funcional del aparato de Golgi. Este modelo concebía las cisternas como compartimentos estables con distintas enzimas residentes [87]. Las proteínas *cargo* avanzarían en la ruta secretora, viajando de una cisterna a la siguiente en las vesículas que por microscopía electrónica se ven rodeando al Golgi (vesículas COPI). En su camino adquirirían las glicosilaciones que se realizarían en cada cisterna, en un proceso similar a una cadena de montaje (Figura I.7). Este modelo se denomina **modelo de cisternas**

estables [88]. Según una versión actualizada del modelo de cisternas estables, el complejo de cubierta COPI es el encargado del tráfico anterógrado del *cargo* [89]



**Figura I.7.** Representación esquemática de los modelos de (A) cisternas estables y de (B) maduración de cisternas. CCV: vesículas cubiertas de clatrina. Adaptada de Glick *et al.* [21].

Posteriormente se trataron de resolver una serie de inconsistencias del modelo de cisternas estables. Entre ellas estaba el hecho de que el procolágeno, que, se sabía, se preensambla en el RE, excede en tamaño a las vesículas de secreción visualizadas por microscopía electrónica. Se determinó que el procolágeno avanza en la ruta secretora sin abandonar la cisterna del Golgi donde se encuentra [69], abriéndose la puerta a un modelo en el cual las cisternas del Golgi no son estables, si no que avanzan en la ruta con el *cargo*. Además mediante microscopía *in vivo* en *S. cerevisiae* se confirmó que las cisternas del Golgi temprano, a lo largo del tiempo, adquieren identidad de cisternas de Golgi tardío [43, 44]. Estos y otros datos sugerían que las cisternas son las que, cambiando con el tiempo su composición de enzimas residentes del Golgi, “avanzan” en la ruta a medida que el *cargo* se va modificando. Las cisternas se formarían *de novo* por fusión de numerosas vesículas COPII y adquirirían las enzimas de una cisterna temprana por transporte retrógrado. Cada cisterna iría avanzando en la ruta por adquisición de nuevas enzimas y envío —por transporte retrógrado— de las enzimas ya utilizadas a cisternas más tempranas para, finalmente, en la cara *trans* del Golgi, perder por transporte retrógrado (en vesículas COPI) todas las enzimas propias del Golgi. En este punto, la

## Introducción

---

cisterna se fragmentaría en vesículas de transporte, que viajarían a su destino final, ya sea la membrana plasmática o los endosomas (Figura I.7). De este modo, emergía una concepción del aparato de Golgi como un orgánulo dinámico y transitorio en el que el tráfico entre cisternas se da en dirección retrógrada transportando enzimas del Golgi desde una cisterna más tardía hacia una más temprana [88]. Este modelo se conoce como **modelo de maduración de cisternas**. Nótese que, tanto en el modelo de cisternas estables como en el modelo de maduración de cisternas, el transporte mediante COPI es crucial ya sea para transportar el *cargo* (cisternas estables) o para enviar en sentido retrógrado proteínas residentes del Golgi.

Posteriormente, se ha propuesto una variación del **modelo de maduración que incluye el transporte tubular** entre cisternas heterotípicas y que explicaría las conexiones tubulares visualizadas por microscopía electrónica [90] y la cinética exponencial de salida del Golgi de proteínas *cargo* pequeñas. Muy recientemente se han propuesto otros dos modelos. Según el **modelo de partición rápida en un Golgi mezclado** [91], el Golgi funciona como un compartimento único con un dominio de maduración de las proteínas y un dominio de exportación. Las proteínas serían exportadas desde cualquier nivel del Golgi. Aunque este modelo explica la cinética exponencial de salida del Golgi para cualquier *cargo*, no revela el papel que desempeñaría COPI, pese a que está bien establecido que éste es un complejo esencial para la función del Golgi. En segundo lugar, el **modelo de cisternas progenitoras** [92] propone que un dominio en una determinada cisterna maduraría por cambio de Rab (*Rab conversion*) y dicho dominio se fusionaría “homotípicamente” con una cisterna más madura, avanzando así el *cargo* en el Golgi.

Además de lo anteriormente discutido, todos estos modelos deben tener en cuenta la maquinaria molecular que se ha demostrado que regula el transporte en el Golgi y que son, principalmente, las GTPasas Arf y Rab y sus efectores. Gradualmente, a medida que se van conociendo los procesos concretos que median dichas GTPasas, los modelos se van haciendo más complejos.

### 1.3. La implicación de los lípidos en el tráfico de membranas

En las células eucariotas se pueden diferenciar dos territorios lipídicos principales, uno de ellos formado por la ruta secretora temprana — el RE y el aparato de Golgi temprano (*cis*-Golgi en mamíferos) —; y el otro constituido por la ruta secretora tardía, es decir la membrana plasmática, el *trans*-Golgi (TGN) y los endosomas [22, 93]. Las membranas de la ruta secretora temprana tienen poca carga aniónica y son bastante fluidas [93, 94]. Por el contrario, la ruta secretora tardía presenta membranas enriquecidas en fosfolípidos aniónicos y con altos niveles de esteroides y esfingolípidos, por lo que su fluidez está relativamente restringida [94]. De hecho,

el espesor de las membranas difiere entre ambos dominios, hasta tal punto que existe una dicotomía en la longitud de los dominios transmembrana de las proteínas que residen en ellas [23, 95]. Este hecho tiene implicaciones en la regulación de la actividad de las proteínas y en la clasificación del *cargo* y las membranas en la ruta secretora.

Además de las diferencias lipídicas de los diferentes componentes del tráfico de membranas, los cambios en la composición y la organización lipídica de micro-dominios de dichas membranas también contribuyen al transporte de lípidos y proteínas en la ruta secretora, principalmente, de tres formas: (1) mediante la generación de deformaciones locales de la membrana [96]; (2) a través de la organización de dominios de membrana, que promueven el reclutamiento y la incorporación de proteínas específicas en las vesículas en formación [97]; y (3) gracias a la iniciación de cascadas de señalización [98]. Por ejemplo, se ha propuesto que el equilibrio dinámico que existe entre la producción y el consumo de diacil glicerol (DAG) está implicado en la curvatura de membrana que inicia la formación de vesículas, dado que la forma cónica del DAG afectaría a la curvatura local de las membranas del Golgi próximas a dominios ricos en DAG [96, 99, 100]. Además, la deformación estructural de la membrana en dichos sitios podría promover el reclutamiento de proteínas citosólicas implicadas en la formación o escisión vesicular, como Gcs1, una GAP de Arf con capacidad para detectar curvatura de membrana (ver más adelante). Por el contrario, la forma cilíndrica de la fosfatidil colina impondría resistencia al proceso de deformación de la membrana. En general, existe un gran número de enzimas que al controlar el incremento o la disminución de los niveles de los distintos lípidos en las membranas regulan la ruta secretora [99]. Además de los cambios regulados en el metabolismo lipídico, la propia asimetría de la membrana también influye en la curvatura de dicha bicapa lipídica. Cuando la fosfatidil serina llega al aparato de Golgi, la ATPasa Drs2p (DnfB en *A. nidulans*) mediante su actividad flipasa restringe su localización a la monocapa citosólica [101] e hipotéticamente induce curvatura localizada [102]. La inducción de curvatura por parte de Drs2p justificaría su implicación en la ruta secretora [103].

Como se indicó antes, la ruta secretora tardía es rica en esfingolípidos y esteroides (el ergosterol es el equivalente fúngico del colesterol). Es más, las vesículas secretoras están enriquecidas en ambos tipos de lípidos [104], en comparación con las membranas del Golgi de donde dichas vesículas proceden. La generación de microdominios de esteroides y esfingolípidos en la membrana del Golgi promueve la exocitosis de numerosos transportadores de la membrana plasmática [105]. De hecho, se ha propuesto que las proteínas ancladas a GPI (PA-GPI) segregan del resto de *cargo* gracias a su reclutamiento a dominios de membrana ricos en esfingolípidos [2].

Finalmente, el fosfatidil inositol 4-fosfato (PtdIns4P) es quizás el lípido más importante en el proceso de exocitosis, y es importante en la biogénesis de las vesículas exocíticas [99] y en

el reclutamiento de proteínas reguladoras del tráfico, como la miosina tipo 5 [106], necesaria para el transporte a la membrana plasmática de dichas vesículas. La actividad PtdIns4P fosfatasa de Pik1p y la PtdIns4-kinasa Stt4p controlan la exocitosis en levaduras mediante la regulación de los niveles de PtdIns4P.

### 1.4. El proceso de N-glicosilación en la ruta secretora

La N-glicosilación es el proceso de unión de oligosacáridos al grupo amino de una asparagina que forma parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr de una proteína. Dicho proceso se inicia en el RE, cuando se cataliza la transferencia de un bloque de azúcares a estas asparaginas N-glicosilables. La oligosacaryltransferasa (OST), encargada de esta transferencia, es un complejo enzimático que actúa en el lumen del RE [107] de manera cotraduccional y reconoce una conformación específica que adquiere transitoriamente la secuencia Asn-X-Ser/Thr nada más salir del translocón [108, 109]. Los glicanos añadidos son posteriormente modificados en el RE antes de viajar al aparato de Golgi. En el aparato de Golgi, adquieren estructuras más complejas por procesamiento y adición de más monosacáridos. Las primeras investigaciones sugerían que la glicosilación no se requería para el transporte a lo largo de la ruta secretora temprana [3]. Sin embargo, actualmente se sabe que los glicanos tienen un papel importante en el plegamiento proteico [110, 111]. Aunque la unión de un N-glicano no induce una estructura secundaria permanente, altera las preferencias conformacionales cerca del sitio de glicosilación, provocando una conformación más compacta [111]. De hecho, cuando la glicosilación se inhibe, el efecto más frecuentemente observado es la generación de agregados de proteínas mal plegadas que, por ende, no son funcionales [112]. Sin embargo, la importancia de la adición de glicanos varía entre proteínas; algunas proteínas dependen completamente de la glicosilación, como por ejemplo la proteína G del virus de la estomatitis (VSVG) [113], mientras muchas otras no muestran dependencia alguna. Además, el procesamiento secuencial de los N-glicanos en el RE está coordinado con el adecuado plegamiento y la salida de las glicoproteínas de dicho compartimento, mediante el llamado ciclo calnexina-calreticulina [114, 115].

Por otro lado, existe evidencia de que ciertas proteínas requieren N-glicosilación para tomar una ruta de secreción apical [13] y, por ejemplo, la adición de sitios de glicosilación en la hormona del crecimiento de *Rattus norvegicus* provoca su secreción polarizada [14]. Una posibilidad, que explicaría la implicación de la glicosilación en el tráfico, es que existan proteínas capaces de reconocer azúcares (lectinas) implicadas en la clasificación en el TGN, como ocurre en el caso del epítipo manosa-6-fosfato presente en las enzimas destinadas al sistema endosomal. Sin embargo, otra posibilidad es que los glicanos puedan cambiar las propiedades generales de las proteínas y, por ejemplo, inducir co-agregación, como se ha

propuesto en la incorporación de *cargo* en las vesículas implicadas en la secreción regulada [116].

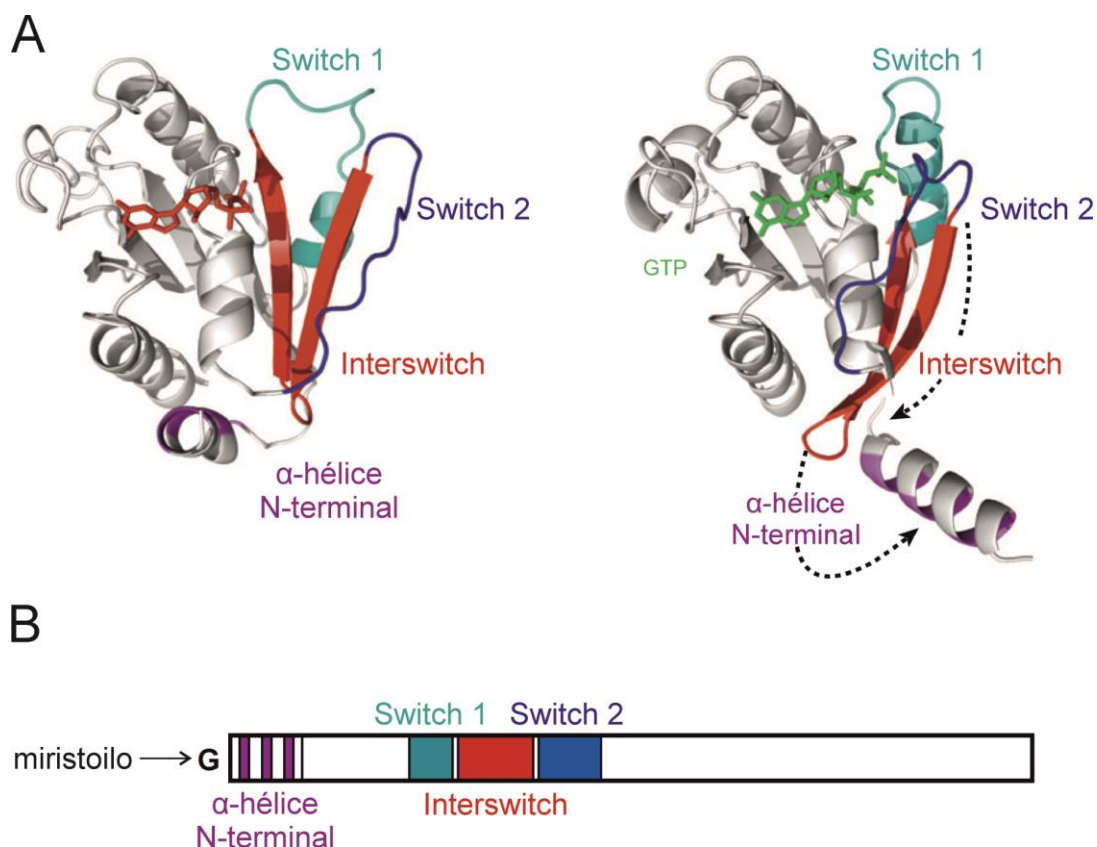
Mientras que en mamíferos los N-glicanos pueden contener una gran variedad de azúcares, como fucosas, ácido siálico y galactosa, los cuales son añadidos en el Golgi, los N-glicanos de *S. cerevisiae* sólo se modifican mediante adición de manosas. Sin embargo, en hongos filamentosos, además de la unión de manosas, se produce la adición de galactosas en el extremo no reductor de los N-glicanos, formándose un galactomanano [4]. Se ha propuesto que estos residuos de galactosas actúan como una señal que detiene la adición de más manosas [117, 118]. Además, se ha descrito el anclaje de galactomananos a la membrana plasmática de hongos filamentosos mediante un ancla de GPI [119]. Estos datos sugieren que los galactomananos presentes en los N-glicanos de las glicoproteínas podrían servir para que estas proteínas permanezcan unidas a la membrana por un anclaje de GPI.

### **1.5. Control molecular de la ruta secretora: GTPasas de la familia Arf/Sar en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y sus proteínas reguladoras**

Posiblemente, las principales proteínas reguladoras que dirigen el tráfico en el RE y el aparato de Golgi son las proteínas G pequeñas de la familia Arf/Sar, que se describen a continuación. Las proteínas Arf/Sar conforman una familia dentro de la superfamilia Ras [120]. Esta familia incluye proteínas Arf, Sar y Arl (*Arf like protein*). Se trata de una familia de proteínas G pequeñas, conservada en eucariotas [7], cuyos miembros presentan dos características estructurales únicas. La primera es la presencia de una  $\alpha$ -hélice N-terminal anfipática, que frecuentemente tiene unido un grupo miristoilo. La segunda es que el intercambio de GDP por GTP no sólo desplaza las regiones *switch*, que interaccionan con los efectores, sino que también cambia la posición relativa de dos  $\beta$ -láminas que se encuentran entre las dos regiones del *switch*, denominadas el *interswitch* (Figura I.8). Este desplazamiento de la posición del *interswitch* libera de un bolsillo hidrofóbico la  $\alpha$ -hélice N-terminal anfipática, lo que promueve la inserción de esta hélice en una membrana. Las proteínas Arf/Arl, junto a las GTPasas de la familia Rab, median procesos de tráfico a todos los niveles del sistema de membranas intracelulares [7]. Una característica importante de las Arf/Sar es que, cuando están activas, sus dominios globulares se encuentran muy próximos a las membranas (1-2 nm), al contrario que las Rabs, las cuales reclutan a sus efectores a mayor distancia de la membrana (7-8 nm) [7]. La única GTPasa que actúa en el RE es Sar1p y su única función es la formación de COPII [62]. Por otro lado, las que realizan su función en el aparato de Golgi son, en *S. cerevisiae*, Arf1p (duplicado como Arf2p), Ar1p, Arl3p y Cin4p. Todas tienen su ortólogo

## Introducción

correspondiente en mamíferos, donde normalmente existen varios parálogos de cada una de ellas [7]. Arf1p se considera el regulador clave del aparato de Golgi. Controla su organización y su identidad dirigiendo procesos como la formación de las cubiertas COPI y clatrina [86]. Arl3p (ARFRP1 en mamíferos) y Arl1p forman parte de una cascada de activación. Arl3p no tiene diana de miristoilación y se localiza en las membranas del TGN gracias a una acetilación N-terminal y a la interacción con una proteína transmembrana denominada Sys1p [121]. Arl3p, desde su localización en el TGN, recluta quizá indirectamente a través de la GEF Syt1 [122] a Arl1p[121]. Arl1p, una vez activa en el TGN, recluta factores de *tethering* con dominio GRIP (*golgin-97*, *RanBP2alpha*, *Imh1p* and *p230/golgin-245*), como Imh1p en *S. cerevisiae* [123]. Finalmente, Imh1p media tráfico entre los endosomas y el aparato de Golgi. Además, Arl1p mediante la interacción con la flipasa Drs2p y con la GEF Gea2p y Drs2p tiene la capacidad de alterar la curvatura de la membrana del TGN, lo que facilitaría el inicio de la formación de una vesícula [124]. Cin4p, que en mamíferos se corresponde al par de parálogos ARL2 y ARL3, se ha relacionado con el ensamblaje de microtúbulos [125]. También en mamíferos participa en el transporte de proteínas en las células fotorreceptoras [126]. De hecho, mutaciones en *ARL3* provocan retinitis pigmentosa en humanos [127].



**Figura I.8. Características estructurales de la familia Arf/Sar.** A. Estructura de Arf1 unida a GDP o GTP. Tras la unión de GTP, la región del *interswitch* (en rojo) se aleja de las regiones del *switch* y desplaza la  $\alpha$ -hélice N-terminal, que ocupaba un bolsillo de la proteína en la conformación GDP. Esta hélice se insertaría en una membrana. B. Representación esquemática de la secuencia de una Arf/Sar. Adaptada de Gillingham *et al.* [7].

### 1.5.1. Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) de la familia Arf/Sar

Las GTPasas adquieren el GTP por acción de sus GEFs, que desplazan el GDP unido ávidamente al centro activo permitiendo la entrada del GTP desde el citosol. Esto provoca el cambio conformacional de las regiones *switch* e *interswitch*, que a su vez trae consigo la unión de la Arf/Sar a una membrana, por inserción de la  $\alpha$ -hélice N-terminal. Por lo tanto, las GEFs determinan la actividad y la localización de estas proteínas G pequeñas. La actividad GEF de estas proteínas reside en el llamado dominio Sec7, consistente en un módulo de ~200 aminoácidos [128, 129]. Sec12, la GEF de Sar1, es una excepción, ya que no tiene dicho dominio Sec7 y es la única proteína de esta clase que es transmembrana.

Las GEFs de Arf/Sar, además del dominio Sec7, tienen dominios adicionales, que facilitan su reclutamiento a las membranas del Golgi de una manera regulada, otorgándoles especificidad espacio-temporal [130]. En hongos, las GEFs con dominio Sec7 se clasifican en dos subfamilias: GBG (de GBF/BIG GEFs) y Syt1/Syt2 [130]. La clasificación varía ligeramente entre autores [7, 130]. La subfamilia GBG consta de una serie de dominios específicos [130] y se subdivide en los clados BIG/Sec7 y GBF/Gea. Respecto al grupo BIG/Sec7, tanto BIG1 y BIG2 en mamíferos, como Sec7 en *S. cerevisiae* y HypB en *A. nidulans* se localizan en el TGN [24] y, mediante la activación de Arf1, promueven el reclutamiento de cubiertas de clatrina (con adaptadores GGA o AP-1) [7]. El segundo grupo dentro de la subfamilia GBG (GBF/Gea) promueve la activación de Arf1 en el Golgi temprano, para el reclutamiento de COPI [129, 131]. De hecho, Gea1p y Gea2p son esenciales para el transporte retrógrado al RE [77]. En *S. cerevisiae*, en este transporte retrógrado no intervienen ni Sec7p ni Syt1p, las otras GEFs del Golgi [77]. En resumen, BIG/Sec7 funcionaría en el TGN y GBF/Gea en el Golgi temprano, ambos controlando la función de Arf1.

La familia Syt1/Syt2 es exclusiva de hongos y, en *S. cerevisiae*, está formada por Syt1p y Yel1p. Otros autores [7] agrupan a estas proteínas en la familia PSD (PH and Sec7 domain), dado que contienen un dominio PH (Plekstrin homology) de interacción con fosfoinosítidos. De estas dos, Syt1p es la única que se localiza en el Golgi y, se cree, promueve la activación de Arl1p [122].

La ruta secretora, lejos de estar formada por un conjunto de reacciones aisladas, está compuesta por rutas bioquímicas interconectadas por bucles de retroalimentación y cascadas de reacción. Una prueba clara de esto son las cascadas de activación de GTPasas, que ocurrirían tanto en Rabs como en proteínas Arf o Arl [132]. De hecho, algunas Arf median el reclutamiento de GEFs que, a su vez, reclutan y activan otras Arf distintas, como es el caso descrito más arriba de Arl1p y Arl3p. Además, las GEFs pueden reclutarse por sus productos (Arfs unidas a GTP), formando bucles de retroalimentación positiva. También se propone que

## Introducción

---

existe comunicación cruzada entre las proteínas Arf y las GTPasas tipo Rab, así como con las GEF correspondientes, estas últimas tendrían un rol en el tráfico más allá de la mera activación de las GTPasas [133].

### 1.5.2. Proteínas estimuladoras de la actividad GTPásica (GAP) de la familia Arf/Sar

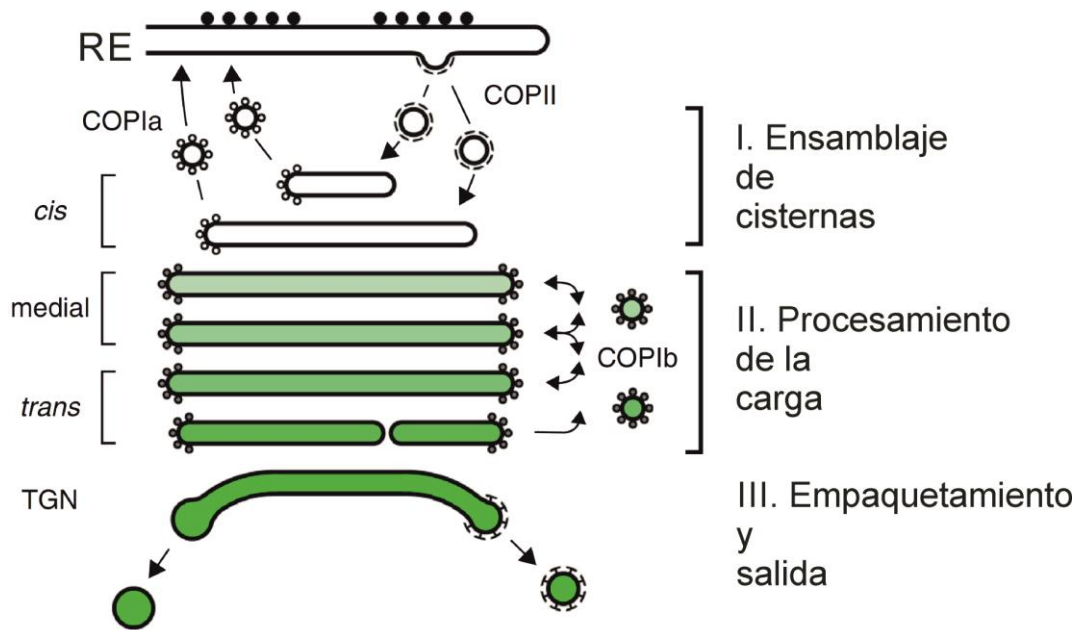
Como muchas otras proteínas G pequeñas, las proteínas Arf/Sar hidrolizan GTP ineficientemente. Por ello, necesitan una proteína GAP que facilite dicha hidrólisis. La GAP de Sar1, Sec23, es diferente al resto. Por el contrario, todas las GAPs de Arfs y Arls contienen el dominio Arf-GAP. Se trata de un dominio de ~140 residuos con cuatro cisteínas que forman un dedo de zinc. Por otro lado, una arginina expuesta al exterior se insertaría en el sitio activo de la Arf, para catalizar la hidrólisis del GTP [134]. Esto provocaría la liberación de la GTPasa de la membrana y la inactivación de su capacidad para reclutar efectores. Aunque en mamíferos, estas GAPs se han agrupado en diez familias distintas, en hongos no parece haber representantes de todas ellas. Las proteínas de la familia ArfGAP1 contienen un motivo denominado ALPS (*ArfGAP1 lipid packing sensor*) [98], que permite el reconocimiento de membranas lipídicas con curvatura. Se propone que la habilidad de estos motivos ALPS para actuar como sensores de la curvatura de membranas permitirían que la GAP sólo se activase en vesículas cercanas a sufrir la fisión, asegurando que la inactivación de la Arf se retrasase lo suficiente como para permitir la generación de la vesícula. Los representantes de esta familia en *S. cerevisiae* son Gcs1p y Gts1p. La familia ArfGAP3 contiene, además del dominio ArfGAP, un motivo ISxxFG duplicado, donde x es cualquier aminoácido. Tanto las proteínas humanas como de levadura de esta familia interactúan directamente con la subunidad  $\gamma$ -COP de COPI.

Del resto de familias, solamente la familia SMAP tiene representante en *S. cerevisiae* (Age2p). Cabe destacar que muchas familias de GAPs en mamíferos tienen dominios PH (*plekstrin homology*) o BAR (*Bin/Amphiphysin/Rv*), de interacción con membranas [7].

## 1.6. La salida de proteínas en la red del *trans*-Golgi (TGN) y las diferentes rutas de secreción

El TGN es el principal sitio de salida del *cargo* que atraviesa el Golgi hacia su destino final. Se trata de una región del aparato de Golgi especializada en la clasificación del *cargo* y su empaquetamiento en vesículas. A este respecto, Glick ha propuesto un modelo según el cual el Golgi está organizado en tres fases funcionales: la primera, de ensamblaje de las cisternas; la segunda, de procesamiento postraduccional del *cargo*; y, la tercera, de concentración de dicho

*cargo* en vesículas de transporte [135] (Figura I.9). A esta última fase correspondería la función del TGN. Desde el TGN las vesículas viajan a la membrana plasmática o a los endosomas (Figura I.1).



**Figura I.9. Representación esquemática del modelo del Golgi con tres fases funcionales.** En la fase I, las cisternas se ensamblarían. En la segunda fase ocurrirían las modificaciones postraduccionales de la carga, principalmente glicosilaciones. Finalmente en la fase III, la carga se concentraría en túbulos o vesículas y se dirigiría a su destino final. Adaptada de Papanikou *et al.* [135].

### 1.6.1. Tráfico a los endosomas

En el TGN, las GTPasas Arf y Arl inician el reclutamiento a la membrana de una amplia variedad de adaptadores de *cargos*, en un proceso en el que también están implicadas proteínas de la familia Rab. Por ejemplo, Arf1 interacciona directamente con el adaptador AP-1 [136] para el reconocimiento del *cargo*. De hecho, la interacción con este último induce la oligomerización de AP-1, lo que contribuye al ensamblaje de la cubierta de clatrina [137]. También se requiere un incremento en los niveles de PtdIns4P para el reclutamiento de AP-1. De esta manera, el efecto conjunto de Arf1, el *cargo* y los fosfolípidos en el reclutamiento de AP-1 permite el ensamblaje de la cubierta de clatrina de una manera regulada. Estas vesículas cubiertas de clatrina viajan para fusionarse con los endosomas (Figura I.6).

En *S. cerevisiae*, algunas proteínas, como la invertasa, utilizan una ruta para viajar a la membrana plasmática que requiere que el transporte desde el TGN a los endosomas funcione [29, 30, 33]. De hecho, estas proteínas, todas ellas enzimas solubles, se exocitan en vesículas de secreción más densas que otros *cargos* que no requieren la función de los endosomas para su secreción. Por ello, se ha propuesto que existen, al menos, dos rutas de secreción en *S. cerevisiae*, una de ellas mediada por endosomas y otra, directa, que no requiere la función de

## Introducción

---

éstos. Además, la secreción basolateral en células epiteliales de mamífero parece ocurrir a través de los endosomas [34].

Además de las proteínas AP, los adaptadores GGA (*Golgi-localizing, Gamma-adaptin ear homology, ARF-binding proteins*) forman otra clase de adaptadores de *cargo* asociados a clatrina, que regulan el reconocimiento del *cargo* para el transporte del TGN a los endosomas. Al igual que AP-1, los adaptadores GGA se reclutan a las membranas por unión a PtdIns4P y a Arf1. La tercera clase de adaptadores de *cargo* asociados a clatrina son las proteínas relacionadas con epsina, que pueden participar junto con AP-1 y GGAs [138].

### 1.6.2. Tráfico “directo” desde el TGN a la membrana plasmática

Mientras que para el tráfico mediado por los complejos de COPI, COPII y clatrina se conocen un gran número de los componentes involucrados en el mecanismo de formación de las vesículas de transporte, en el caso del tráfico desde el TGN a la membrana plasmática el conocimiento es muy limitado. En clara diferencia con el transporte a los endosomas, el tráfico del TGN a la membrana plasmática parece no estar mediado por vesículas “convencionales”. Por ejemplo, por microscopía *in vivo* se han visualizado túbulos formándose a partir del TGN [139] y separándose de éste (Figura I.1). Estos túbulos, que transportan el *cargo*, se fusionan directamente con la membrana plasmática, sin pasar por ningún otro compartimento. Su fisión de la cisterna donadora depende de la presencia de determinados lípidos, como el diacil glicerol [140]. Dichos túbulos miden del orden de micras, mientras que el diámetro de una vesícula típica es de 50-100 nm. Se sabe que se requieren señales de reconocimiento del *cargo* para su transporte a la membrana plasmática, al menos en células epiteliales [35]; sin embargo, no se conocen los receptores que interactúan con dichas señales. Tampoco se sabe el mecanismo por el cual el *cargo* es clasificado para su transporte en los túbulos (el tráfico particular de las PA-GPI se discute más adelante). De hecho, VSV-G (*vesicular stomatitis virus G protein*), un *cargo* que viaja en esos túbulos no colocaliza con GGA en dichas estructuras, lo que indica que los túbulos no contienen GGA [141]. El conocimiento de las proteínas que regularían la formación de estos túbulos post-Golgi es escaso. En *A. nidulans*, se ha visualizado la maduración de cisternas del TGN en vesículas secretoras y se ha demostrado que este tráfico es dependiente de RabE (RAB11 en mamíferos, Ypt31p en levadura) y su transporte requiere miosina-5, kinesina-1 y dineína [15, 36].

Se conoce únicamente un hipotético complejo adaptador para el tráfico de *cargo* desde el TGN a la membrana plasmática. Se denomina exómero, sólo se ha encontrado en hongos y está formado por cinco subunidades [56]. El exómero es un efector de Arf1 [142] y regula el tráfico de Chs3p y de Fus1p de *S. cerevisiae*. Se ha demostrado, *in vitro*, que el exómero puede interactuar con liposomas sin deformar las membranas. Dado el papel limitado del exómero y

la ausencia de equivalentes en metazoos, se ha considerado plausible que gran parte de las proteínas que viajan a la membrana plasmática desde el TGN no requieran un complejo de cubierta ni una señal de reconocimiento [140]. El Golgi es un orgánulo con un flujo continuo de membranas y, de hecho, la retención de enzimas del Golgi requiere una señal específica. Por lo tanto, las proteínas sin señal de retención podrían ser secretadas directamente sin otro requerimiento. Sin embargo, esta condición no se daría en todos los casos ya que en determinados *cargos* se conocen señales de secreción apical, principalmente en células epiteliales de mamífero [11]. Para la secreción basolateral, que implicaría el transporte previo a los endosomas, también se conocen señales específicas [140].

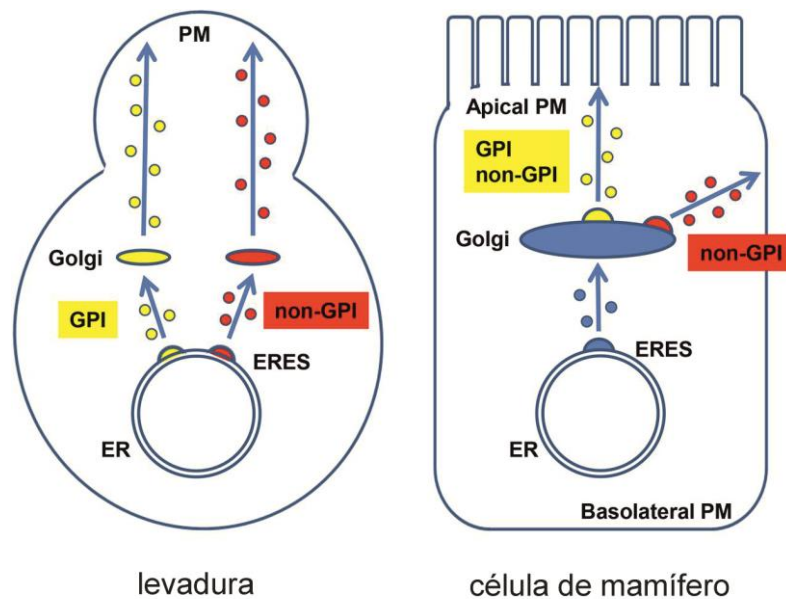
### 1.6.3. Tráfico “directo” de las proteínas ancladas a GPI

El tráfico de las PA-GPI es distinto al del resto de proteínas, probablemente por la identidad lipídica que el GPI otorga. Aunque esta afirmación parece ser cierta para todos los eucariotas, las PA-GPI toman un camino propio en la ruta secretora antes en levaduras que en mamíferos (Figura I.10) [2]. En *S. cerevisiae*, donde la remodelación lipídica del GPI ocurre en el RE, la concentración de las PA-GPI en los ERES ocurre de manera independiente a COPII [143] y, de hecho, las PA-GPI viajan en vesículas COPII diferentes del resto de *cargo* [31]. Esta remodelación implica el reemplazamiento del ácido graso insaturado que el GPI inicialmente contiene por un ácido graso saturado largo. En levaduras, normalmente, una molécula de diacilglicerol se sustituye por una ceramida (ácido graso saturado con 26 carbonos) [2]. Se cree que, gracias a las propiedades físicas de la ceramida las PA-GPI se reclutan a dominios de membrana ricos en ceramida [2]. Estos dominios se concentrarían en ERES. De hecho, la síntesis de ceramida es necesaria para el transporte de las PA-GPI [144]. Además, en *S. cerevisiae*, las PA-GPI se concentran en ERES específicos, distintos de los ERES en que se concentran otras proteínas *cargo* [143]. Una vez en los ERES, el complejo p24, que actúa como una lectina, reconoce específicamente el GPI remodelado. La interacción de p24 con las PA-GPI promueve la interacción con una isoforma de Sec24 (Lst1p), que es una subunidad de la cubierta COPII. De este modo, como se mencionó, las PA-GPI viajan en vesículas COPII especializadas hacia el aparato de Golgi, después de un proceso de reconocimiento que parece implicar, únicamente, la presencia de un GPI remodelado.

En mamíferos la remodelación del lípido del GPI ocurre en el aparato de Golgi [145] y, al contrario que en *S. cerevisiae*, la segregación de las PA-GPI del resto de *cargo* no ocurre en el RE [146], sino en el aparato de Golgi [147]. La salida del RE también depende de p24 y de COPII; sin embargo, las PA-GPI viajan en las mismas vesículas que el resto de *cargo* y el proceso de reconocimiento no parece ser dependiente de esfingolípidos. A su llegada al aparato de Golgi, el GPI se remodela, convirtiéndose en un GPI con dos ácidos grasos saturados. Se

## Introducción

creo que el reconocimiento en el TGN estaría mediado por la segregación de las PA-GPI en dominios ricos en esfingolípidos y colesterol [97]. Se postula que también son importantes la oligomerización de las PA-GPI [148] y la N-glicosilación [149]. De este modo, en células polarizadas de mamífero, la mayoría de PA-GPI son seleccionadas para secreción apical, mientras que gran parte del resto de *cargos* se secreta basolateralmente (Figura I.10) [11]. La secreción apical de las PA-GPI correlaciona con el hecho de que la membrana apical sea rica en glicosfingolípidos [150].

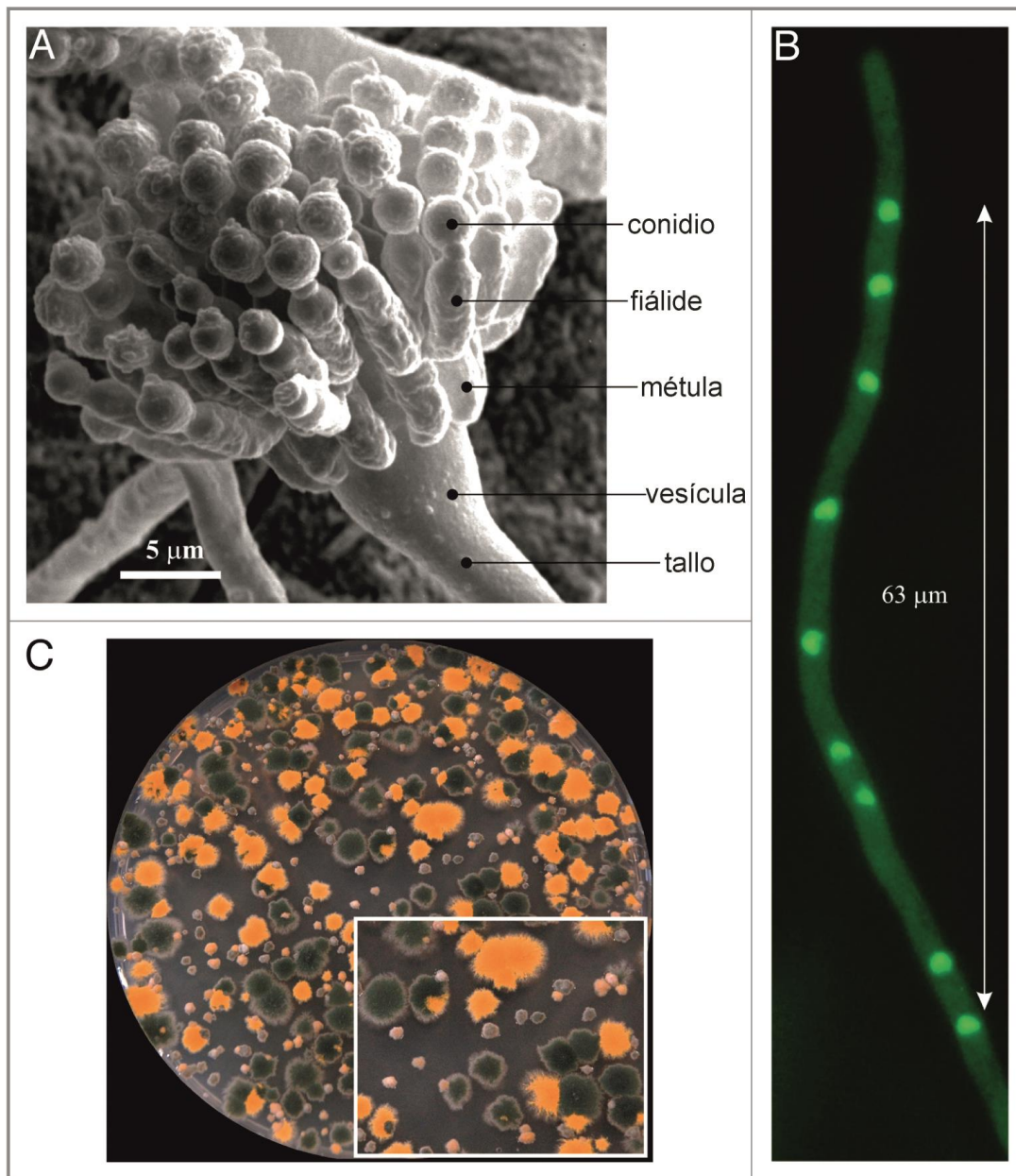


**Figura I.10. Segregación de las PA-GPI en la ruta secretora.** En levaduras, la separación ocurre en la salida del RE (ER en la imagen), donde las PA-GPI son reclutadas a ERES diferentes del resto de proteínas carga. Desde los ERES viajan al Golgi en vesículas COPII diferentes. Es posible que, incluso, viajen en cisternas diferentes dentro del Golgi. En el caso de mamíferos, las PA-GPI se concentran en transportadores diferentes en el TGN, desde donde viajan a la membrana apical, en células polarizadas. PM: membrana plasmática. Adaptada de Muñiz *et al.* [2].

### 1.7. *Aspergillus nidulans* como modelo para el estudio del tráfico intracelular

*A. nidulans* es un hongo filamentoso que presenta células tubulares y multinucleadas, llamadas hifas. Durante su fase vegetativa, *A. nidulans* se propaga mediante esporas asexuales (conidiosporas) que se forman en estructuras especializadas, denominadas conidióforos [151] (Figura I.11). Las conidiosporas de *A. nidulans* son verdes y cubren la superficie de la colonia (Figura I.11), aunque también se utilizan en el laboratorio mutantes de pigmentación cuyas esporas son amarillas o blancas [152]. Estas esporas son uninucleadas y haploides, lo que facilita su análisis genético. Durante la germinación, crecen isotrópicamente, hasta alcanzar cierto tamaño, para después establecer un eje de polaridad (Figura I.12). En este punto, la

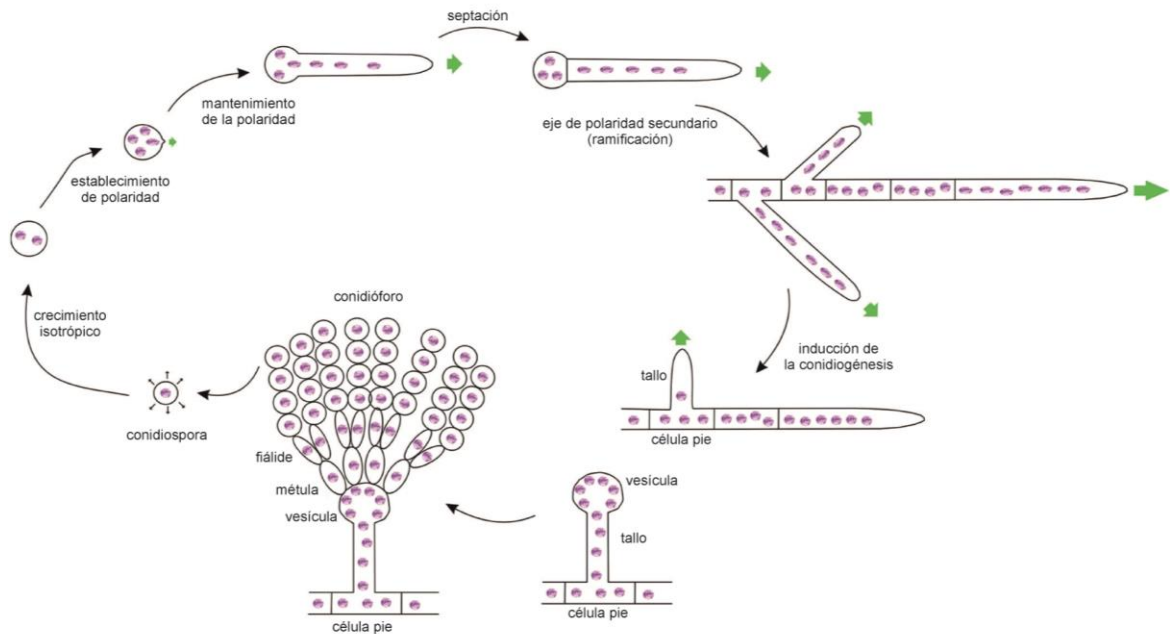
maquinaria exocítica se polariza hacia el tubo de germinación y, desde su aparición, el crecimiento celular ocurre exclusivamente por extensión apical [12]. Las largas cadenas de células, denominadas hifas, pueden ramificarse o iniciar un proceso de desarrollo que culmina en la formación de un conidióforo para la reproducción asexual (Figura I.12). Por otro lado, *A. nidulans* también presenta reproducción sexual [153].



**Figura I.11. *Aspergillus nidulans*.** A. Micrografía de barrido de un conidióforo, con la nomenclatura de los diferentes tipos celulares. B. Una célula apical. Los núcleos están marcados con una versión fluorescente del factor de transcripción PacC. C. Descendencia de un cruce entre una cepa *rabC<sup>wt</sup>* con la mutación *yA2*, de esporas amarillas, y una cepa *rabCΔ* con conidiosporas wt (verdes). Las colonias pequeñas son *rabCΔ*, cuya secreción está afectada. El rectángulo muestra una parte de la placa con una magnificación del doble. Adaptado de Peñalva *et al.* [16].

## Introducción

Como en otros hongos, la morfología de sus células tubulares viene dada por su rígida pared celular [154], que es más débil en el ápice, lo que permite la extensión apical. La remodelación y síntesis de la pared celular, que está coordinada con el crecimiento celular, requiere un aporte apropiado mediante secreción apical de las enzimas y los precursores necesarios. Esto sugiere que el crecimiento celular de los hongos filamentosos es muy dependiente de la ruta secretora [17].



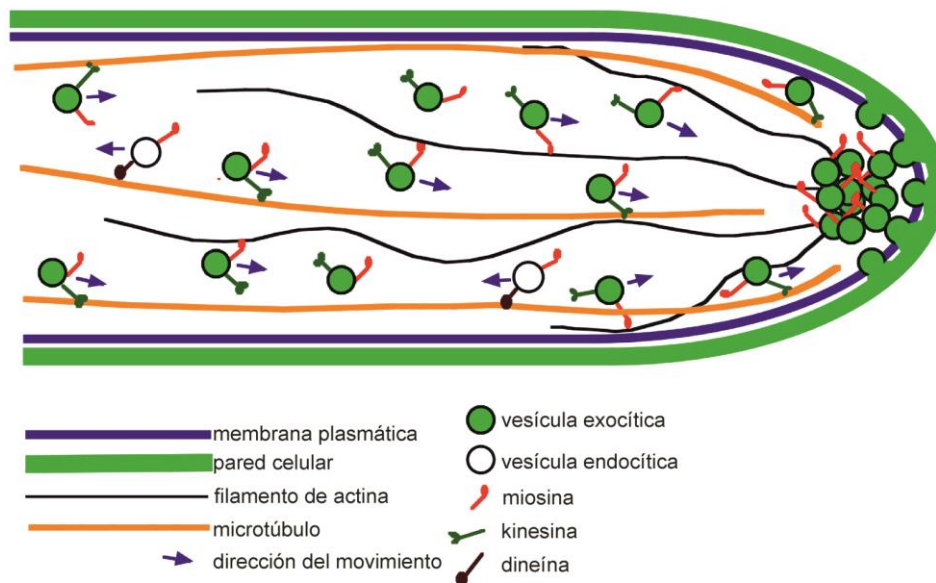
**Figura I.12. Crecimiento vegetativo de *A. nidulans*.** Cuando una conidiospora germina, crece isotrópicamente durante un tiempo, después del cual se establece un eje de polaridad. Se forma un tubo germinativo, donde varios núcleos migran antes de que el primer septo se forme. El eje de polaridad se puede mantener indefinidamente, a medida que se van formando nuevos septos. Las células subapicales pueden establecer nuevos ejes de polaridad, formando ramificaciones y dando lugar a nuevas células apicales. Por ciertos estímulos el crecimiento vegetativo puede detenerse e iniciarse la formación de un conidióforo, formándose tipos celulares especializados. Las flechas verdes muestran la dirección del crecimiento polarizado. Adaptado de Peñalva *et al.* [16].

Una estructura específica de los hongos filamentosos, denominada Spitzenkörper (SPK) (Figura I.13), parece ser crucial para la eficiencia de la extensión apical y para el establecimiento del eje de polaridad [155]. Se trata de una acumulación de vesículas secretoras subyacente a la membrana plasmática del ápice de las hifas. La syntaxina SynA se localiza en el SPK y en la membrana apical, donde se ha propuesto que se polariza mediante un mecanismo de reciclaje endocítico [12, 156-158]. De hecho, se cree que el reciclaje endocítico facilita la localización polarizada de proteínas transmembrana en la membrana apical [17, 159]. Las vesículas del SPK provienen, al menos en parte, del TGN a través de la ruta mediada por RabE [15, 36]. Recientemente se ha determinado una correlación entre la tasa de secreción y la acumulación de vesículas en el SPK [160], lo que apoya la idea de se trata de un estadio previo a la exocitosis.

Además, en el SPK parece haber dos tipos de vesículas [161], lo que sugiere que es un centro de organización de la secreción con diferentes regiones especializadas [161].

*A. nidulans* es un organismo modelo apropiado para el estudio de la ruta secretora [16], dado que su utilización presenta ventajas específicas. El gran tamaño de la célula apical (~125 µm) y el hecho de que la maquinaria de secreción esté orientada hacia el ápice facilitan los estudios de microscopía [24]. Además, una consecuencia práctica de su rápido crecimiento por extensión apical es que las mutaciones que afectan a la eficiencia de secreción causan un fenotipo detectable en placa, haciendo al hongo ideal para estudios genéticos del tráfico intracelular [16]. A nivel celular, la interrupción, genética o por drogas, de la secreción es fácilmente observable debido al engrosamiento del ápice de la hifa de un modo característico [18]. Esto permite determinar de forma precisa, por ejemplo, el efecto en la secreción de un mutante termosensible, mediante un cambio a la temperatura restrictiva de la propia cámara de cultivo, acoplada al microscopio. Además, estas cámaras de cultivo permiten el intercambio del medio, facilitando los estudios con colorantes fluorescentes, inhibidores y otras drogas [162]. Por otra parte, las ventajas específicas de *A. nidulans* en comparación con *S. cerevisiae* son las siguientes:

- 1) *A. nidulans* no tiene redundancia genética, ya que no ha sufrido una duplicación genómica;
- 2) crece exclusivamente por extensión apical, y no experimenta cambios en su eje de polaridad;
- 3) es apropiado para microscopía *in vivo* porque: a) presenta una adhesión natural a la superficie de la cámara de incubación y b) el gran tamaño de sus células permite obtener una buena resolución de las estructuras citoplasmáticas.



**Figura I.13. Spitzenkörper.** Modelo simplificado que muestra la recepción de vesículas exocíticas por parte del Spitzenkörper (SPK), en camino a la membrana plasmática. Las vesículas, cargadas con enzimas y componentes necesarios para construir la pared celular, viajan hacia el SPK en microtúbulos y filamentos de actina gracias a los motores kinesina-1 y miosina-5, respectivamente. Desde el SPK se fusionan con la membrana plasmática, aumentando la superficie de éste y liberando el contenido necesario para la construcción de la pared celular. De este modo, la extensión apical y la síntesis de pared celular ocurren de manera coordinada. Adaptado de Taheri-Talesh *et al.* [155].

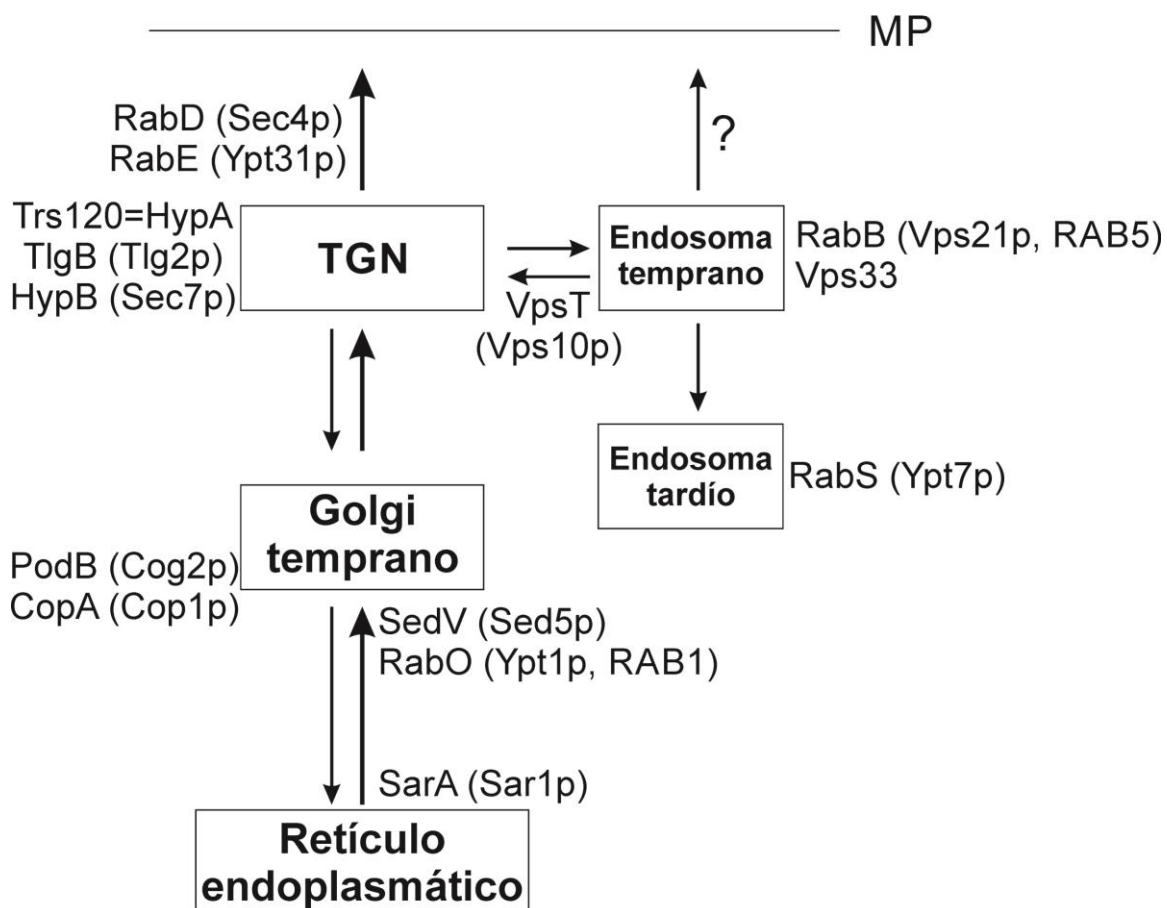
## 1.7.1. Endocitosis en *A. nidulans*

Inicialmente, en el campo del tráfico de membranas, *A. nidulans* sirvió como organismo modelo en el estudio del proceso de endocitosis [163]. La endocitosis en *A. nidulans* predomina en la región subapical de las hifas y parece estar acoplada al crecimiento por extensión apical, ya que mutaciones que impiden parcialmente la endocitosis provocan defectos en el establecimiento de la polaridad [163]. Los endosomas tempranos se desplazan sobre microtúbulos a grandes distancias, gracias a la acción de los motores moleculares dineína y kinesina. Las GTPasas RabA y RabB (homólogos de RAB5 en mamíferos) se localizan en los endosomas tempranos [156, 164], donde RabB media el reclutamiento de la fosfatidil inositol (PtdIns)-3-kinasa, lo que cataliza la síntesis de PtdIns3P. El incremento de los niveles de este lípido inicia la biogénesis de los cuerpos multivesiculares. Además, RabB coopera con PtdIns3P para reclutar a Vps19 y Vps45 [164], lo que permite la recepción de tráfico del Golgi, proceso necesario para la maduración de los endosomas. RabA es incapaz de reclutar estos efectores eficientemente y RabB es el principal determinante de identidad de los endosomas tempranos. RabB también recluta al complejo CORVET [164], que media la fusión de los endosomas tempranos, para su maduración a endosomas tardíos, estos últimos controlados por la GTPasa RabS (RAB7 en mamíferos).

### 1.7.2. Caracterización de la ruta secretora

Las primeras investigaciones demostraron que los componentes básicos de la ruta, así como las proteínas que la regulan están, como era de esperar, conservados [165, 166]. La proteína ortóloga de Arf1p (la principal GTPasa del Golgi), denominada ArfA, se localiza en cisternas intracelulares y, de hecho, su localización depende de la presencia del sitio de miristoilación, lo que está de acuerdo con que la miristoilación contribuye a la asociación de las Arfs con la membrana. De hecho, tras el tratamiento con la droga Brefeldina A (que afecta a las cisternas del Golgi en mamíferos), ArfA se relocaliza a grandes agregados de cisternas [165]. Al igual que en *S. cerevisiae*, las cisternas del Golgi en *A. nidulans* no se encuentran apiladas [24]. Estas cisternas dispersas predominan en regiones cercanas al ápice de la célula, lo que concuerda con que el Golgi esté implicado en la extensión apical de las hifas [24]. El estudio detallado del Golgi, mediante el uso de reporteros fluorescentes, reveló que el aparato de Golgi en *A. nidulans* tiene las siguientes características [24]: (1) consiste en cisternas pleomórficas con extensiones tubulares; (2) las cisternas están polarizadas hacia el ápice de la hifa; (3) el Golgi no es apilado, si no que las cisternas están dispersas en el citosol, sin embargo con frecuencia se observan cisternas conectadas por túbulos; (4) el conjunto de cisternas es altamente dinámico, ya que las cisternas cambian su forma constantemente, se mueven a corta distancia y aparentemente están sometidas a fuerzas que ejercen tensión sobre ellas.

La arquitectura del Golgi, en *A. nidulans*, correlaciona con la velocidad de crecimiento, ya que las alteraciones en la integridad del Golgi afectan inmediatamente a la extensión apical [24, 38]. La organización dinámica del aparato de Golgi se altera cuando se inactiva la función de la SNARE SedV, encargada de recibir tráfico en el Golgi temprano, lo que provoca la desorganización completa del aparato de Golgi [18]. La GTPasa RabO también es necesaria para el funcionamiento y la organización del Golgi, además de ser esencial para el proceso de autofagia. Consecuentemente, RabO se localiza en el Golgi temprano y en los preautofagosomas, como paso inicial para el proceso de autofagia [18, 167]. En la Figura I.14 se muestra la localización en la ruta secretora de proteínas clave para el tráfico.



**Figura I.14. Representación esquemática de la posición funcional de diferentes proteínas del tráfico intracelular de *A. nidulans*.** Entre paréntesis se muestra su homólogo correspondiente en *S. cerevisiae*. En el caso de RabB y de RabO también se indica, en segundo lugar, el homólogo en mamíferos. MP: membrana plasmática.

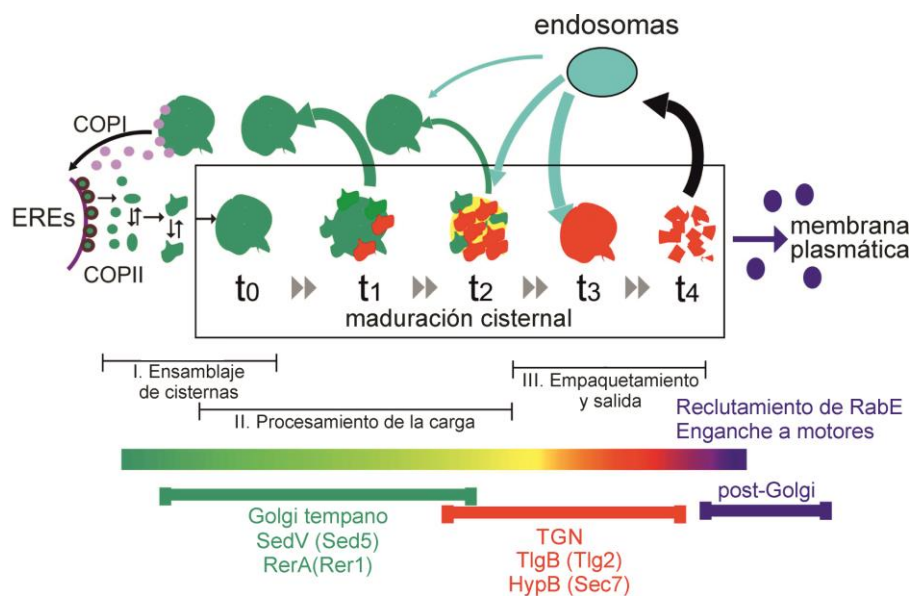
### 1.7.3. Compartimentación del Golgi en *A. nidulans*

De entre las cisternas del Golgi, existen dos clases diferenciadas y resolubles, al no estar apiladas, por microscopía óptica: las correspondientes al Golgi temprano y las del Golgi tardío o *trans*-Golgi (que denominamos TGN, por su equivalencia con el *trans Golgi Network* de mamíferos). Existen proteínas específicas del Golgi temprano, como SedV y RerA (el homólogo de Rer1p de levadura, un receptor responsable de transporte retrógrado) y otras del TGN, como HypB (Sec7p en *S. cerevisiae*), la proteína SNARE TlgB y PH<sup>OSBP</sup> (*plekstrin homology domain of the human oxysterol binding protein*) [18, 24, 38]. PH<sup>OSBP</sup> se recluta a la cara citosólica de las membranas del TGN por detección simultánea de PtdIns4P y la GTPasa Arf1 [168]. El tratamiento con Brefeldina A, que colapsa el Golgi en grandes agregados [38, 165], muestra que los marcadores del Golgi temprano y del TGN se encuentran en agregados diferentes [38], recalcando la diferencia entre ambos compartimentos.

La inactivación condicional de RabO o de SedV provoca la relocalización de los marcadores del Golgi temprano a un patrón citosólico difuso, mientras que los del TGN se redistribuyen a estructuras poco marcadas, posiblemente remanentes de Golgi [18]. Esta rápida desorganización del TGN, como consecuencia de un bloqueo en la organización del Golgi temprano, es consistente con el modelo de maduración de cisternas [21] (ver en la Figura I.15 un modelo sobre la organización y la maduración del Golgi en *A. nidulans*).

#### 1.7.4. La salida de proteínas del TGN en *A. nidulans*

Respecto a la salida de *cargo* del TGN, se ha visualizado por microscopía de fluorescencia *in vivo* la salida de vesículas secretoras desde el TGN, cargadas con la GTPasa RabE. El complejo TRAPP<sup>II</sup> se sitúa también en el TGN, donde activa a RabE —al actuar como su GEF específica. La implicación de TRAPP<sup>II</sup> en la función de RabE se ha demostrado por múltiples abordajes, como el genético y el bioquímico, y mediante observaciones microscópicas [36, 37]. Por tanto, se ha demostrado que TRAPP<sup>II</sup> regula la formación por parte de RabE de vesículas exocíticas en el TGN. El transporte de estas vesículas hacia la membrana plasmática requiere la función de los motores miosina-5 y dineína y kinesina en filamentos de actina y microtúbulos, respectivamente [15].



**Figura I.15. Representación esquemática de la maduración de cisternas en *A. nidulans*.** Se indican las tres fases funcionales propuestas previamente [135]. Las vesículas COPII se forman en los ERES y se fusionan formando una cisterna del Golgi temprano. El tráfico retrógrado de vesículas COPII (violeta) envía al RE proteínas residentes. Las cisternas del Golgi temprano contienen enzimas de glicosilación (t<sub>0</sub>). A medida que el tiempo avanza (flechas dobles) una cisterna del Golgi temprano se enriquece en carga y en componentes del TGN (rojo). Finalmente, los componentes del TGN son predominantes (t<sub>3</sub>) y las cisternas se descomponen en túbulos o vesículas que viajan a la membrana plasmática. La SNARE SedV (Sed5 en *S. cerevisiae*) son los marcadores prototípicos del Golgi temprano en *A. nidulans*. TlgB (Tlg2), HypB (Sec7) y PH<sup>OSBP</sup> marcan, por su parte, el TGN. Modificado de Pantazopoulou *et al.* [166].

### **1.7.5. La función de RabC en la conexión TGN/endosomas**

RabC es el homólogo de RAB6 en mamíferos. Consistentemente con la conservación de su función, RabC se localiza en el Golgi temprano y en el TGN y la delección *rabCΔ* provoca que las cisternas del Golgi sean anormalmente pequeñas [38]. RabC media el tráfico de proteínas entre los endosomas y el Golgi, como demuestra la deslocalización del transportador de hidrolasas VpsT [38].

### **1.7.6. El retículo endoplasmático en *A. nidulans***

El RE de *A. nidulans* se ha estudiado mediante el uso de una versión fluorescente de la subunidad Sec63 del translocón [169]. Las observaciones microscópicas muestran que el RE consiste en una red de endomembranas formada por las envolturas nucleares y RE periférico. Ni el RE ni el aparato de Golgi se desensamblan durante el proceso de mitosis, lo que es consistente con que el hecho de que la extensión apical no se detiene [169]. También se han caracterizado parcialmente los ERES [24], que son numerosos y dispersos, como en *S. cerevisiae*.

**ANTECEDENTES Y  
OBJETIVOS**



Durante los años previos al desarrollo de este trabajo, en el campo de los hongos filamentosos se empezaron a investigar los componentes de la ruta secretora, descubriéndose su alto grado de conservación [24, 26, 165], como se ha explicado en la Introducción. También se describió que las cisternas del Golgi de *A. nidulans* no son apiladas y por tanto se podían resolver mediante microscopía óptica [24]. Este hecho, sumado al gran tamaño de sus células y a la facilidad de manipular genética y microbiológicamente este hongo, abría la puerta a la utilización de microscopía de fluorescencia *in vivo* como método para investigar los procesos de tráfico de membranas en este organismo [16, 17].

En el momento del inicio de esta tesis doctoral, en el laboratorio donde se ha desarrollado se había puesto en marcha la caracterización general de los componentes del tráfico intracelular de *A. nidulans* mediante una combinación de bioquímica, genética clásica y microscopía de fluorescencia *in vivo*, así como la investigación de los principales procesos de tráfico conservados en eucariotas [16]. En concreto, se estaba investigando el proceso de maduración de las cisternas del aparato de Golgi; la formación y la salida de vesículas secretoras desde el TGN a la membrana plasmática, mediado por el complejo TRAPPII y la GTPasa RabE/RAB11/Ypt31 [15, 36, 37]; el proceso de autofagia a partir de las membranas del retículo endoplasmático (RE) en el que es esencial la participación de la GTPasa RabO/RAB1/Ypt1 [167]; los complejos de proteínas SNAREs que median la fusión de membranas [170]; el papel del citoesqueleto de actina y de tubulina en la exocitosis [15, 36]; y la implicación de la SNARE SedV/sintaxina-5/Sed5 y la GTPasa RabO en la organización del aparato de Golgi [18]. Para conseguir estos objetivos se estaban desarrollando marcadores fluorescentes de los principales componentes del tráfico y se habían reunido numerosos mutantes termosensibles de genes implicados en tráfico, ya fuese mediante su construcción por genética reversa [18] o a partir de colecciones de mutantes condicionales obtenidas hacía décadas mediante genética clásica [18, 37, 171, 172].

*A. nidulans* crece por extensión apical y ciertas proteínas integrales de membrana, como SynA/Snc1, la ATPasa DnfA/Dnf1 y varias enzimas encargadas de la síntesis de pared celular, se localizan exclusivamente en el casquete apical de la membrana plasmática [28, 38, 156, 161]; sin embargo, no se conocía el mecanismo por el cual estas proteínas de membrana se mantienen polarizadas en dicha región, aunque se proponía que podría ocurrir por un proceso de reciclaje endocítico [12, 38, 156]. Por otra parte, pese a que se habían estudiado las principales GTPasas de la familia Rab implicadas en tráfico [18, 37, 38, 167, 173, 174], existía un vacío de conocimiento respecto a las GTPasas de la familia Arf/Sar, de gran importancia en el tráfico de membranas [7]. Por último, aunque se estaban investigando los interruptores moleculares del tráfico y los procesos más importantes de intercambio de membranas, no se había iniciado la investigación de los protagonistas principales de la ruta secretora: las proteínas que viajan en

## Antecedentes y Objetivos

---

ella, es decir los *cargos*. De hecho se desconocía si todas las proteínas que iban a secretarse al medio o a la membrana plasmática viajaban o no por la misma ruta o por rutas diferentes y, si fuese así, cuáles eran los requerimientos para cada una de las rutas.

En este contexto se inició la tesis doctoral, cuyos objetivos fueron los siguientes:

- 1. Desarrollar herramientas genéticas para bloquear el tráfico de salida COPII y determinar la influencia de este tráfico en la organización del aparato de Golgi y la secreción.**
- 2. Estudiar la relación funcional existente entre el Golgi temprano y el *trans*-Golgi a través de los reguladores (GeaA/Gea1 y HypB/Sec7) y los efectores (el complejo proteico COPI) de Arf1.**
- 3. Realizar una caracterización básica de las GTPasas de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras.**
- 5. Determinar la ruta de exocitosis y los mecanismos por los cuales ciertas proteínas integrales de membrana presentan una localización polarizada en el casquete apical de las hifas.**
- 6. Determinar las etapas de las rutas de exocitosis de una proteína soluble y de una proteína anclada a glicosil fosfatidilinositol.**





# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. Medios de cultivo para *Aspergillus nidulans*

Los cultivos se realizaron a 37 °C si no se indica lo contrario. Se detalla la composición de los medios utilizados, descritos por Cove [175].

#### 3.1.1. Medio Completo (MCA) y Medio Completo de Regeneración (MCR)

Por litro: 20 ml de solución de sales, 10 ml de solución de casaminoácidos, 10 g de D-glucosa, 2 g de bactopectona, 1 g de extracto de levadura y 10 ml solución de vitaminas. Para el medio sólido, además, agar al 1% (p/v). Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH. El medio completo de regeneración (MCR) es MCA con 1 M sacarosa.

#### 3.1.2. Medio Mínimo (MMA), Medio de Microscopía (WMM) y Medio Mínimo de Regeneración (MMR)

Por litro: 20 ml de solución de sales sin fosfato, 1.52 g de fosfato dihidrógeno de potasio, D-glucosa 1% (p/v), tartrato diamónico 5 mM y los suplementos necesarios. Para el medio sólido, además, agar al 1% (p/v); pH 6.5. Para el test de detección de la mutación *ureB3* en vez de tartrato diamónico se añadió urea a una concentración final de 5 mM. Para microscopía se utilizó una versión del MMA líquido denominada *watch minimal medium* (WMM). Contenía 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 17 mM KCl y 5 mM MgSO<sub>4</sub> además de la solución de sales. El medio mínimo de regeneración (MMR) es MMA con 1 M sacarosa.

#### 3.1.3. Solución de sales y suplementos

**Solución de sales sin fosfato (50X):** por litro: KCl 26 g / L, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 26 g / L, solución de elementos traza sin fosfato 50 ml.

**Solución de casaminoácidos (10X):** hidrolizado de caseína, 150 g / L.

**Solución de elementos traza sin fosfato (1000X):** Por litro: Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O x 10 H<sub>2</sub>O 40 mg, CuCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 400 mg, FeCl<sub>3</sub> 800 mg, ZnCl<sub>2</sub> 8 g, MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 800 mg.

**Solución de vitaminas (100X):** Por litro: Tiamina 50 mg, Biotina 100 mg, Ácido nicotínico 100 mg, D-pantotenato de calcio 200 mg, Piridoxina-HCl 50 mg, Riboflavina 100 mg, Inositol 24 g. Ácido *p*-aminobenzoico 100 mg.

## Suplementos:

Piridoxina-HCl: concentración final 2,5  $\mu$ M.

Ácido p-aminobenzoico: concentración final 5  $\mu$ M.

Uracilo y uridina: concentración final 56  $\mu$ g / ml y 122  $\mu$ g / ml, respectivamente.

## 3. 2. Cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas

Todas las cepas utilizadas en esta tesis doctoral se encuentran detalladas en la siguiente Tabla M.1. Todas ellas son portadoras del alelo mutante *veA1* de pérdida de función que permite la conidiación abundante en ausencia de luz [176]. Los marcadores utilizados han sido descritos previamente en [152] y sus referencias.

| Cepa    | Genotipo  | Fuente            |
|---------|---|-------------------|
| MAD2    | <i>biA1</i>   | Nuestra colección |
| MAD2013 | <i>wA4 inoB2 niiA4 pyroA4 [pyrotrunc::gpdA::mRFP::PH<sup>OSBP</sup>]<br/>nkuAΔ::Bar</i>                         | [24]              |
| MAD2277 | <i>wA4 inoB2 nkuAΔ::bar pyroA4 niiA4 rabSΔ::pyro<sup>fum</sup></i>  | [173]             |
| MAD2384 | <i>pyroA4 5'UTR(slaB)::pyrGfum::niiAp::slaB pyrG89 nkuAΔ::bar</i>   | [177]             |
| MAD2744 | <i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroAt-gpdamini-gfp-tlgB]</i>   | [18]              |
| MAD2808 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdAmini-mcherry-sedV] inoB2 nkuAΔ::bar wA4<br/>niiA4</i>                                      | [18]              |
| MAD3349 | <i>wA4 pyroA4::[pyro gpdamRFP PH<sup>OSBP</sup>] pyrG89 nkuAΔ::bar</i>  | [24]              |
| MAD3434 | <i>hypB5 yA2 pyroA4</i>   | Nuestra colección |
| MAD3448 | <i>pabaA1 pyroA4? rabSΔ::pyro<sup>fum</sup></i>   | [173]             |
| MAD3574 | <i>pantoB100 hypB5</i>  | Nuestra colección |
| MAD3575 | <i>pabaA1 yA2 argB2[argB*-alcAp::mcherry::rabE]</i>   | [36]              |
| MAD3822 | <i>pabaA1 copA<sub>ts</sub> yA2</i>   | Nuestra colección |
| MAD3837 | <i>inoB2 wA4 pyroA4[pyroA*-gpdAmini::mrfp::tlgB] argB2[argB*-<br/>gpdAmini::gfp::sedV]</i>                      | [18]              |
| MAD3949 | <i>yA2 pyroA4 pantoB100 [pantoB*-gpdAsh::gfprerA]</i>   | [18]              |
| MAD3981 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdAsh::mCherry::sedV] (nkuAΔ::bar?)</i>   | [18]              |
| MAD3983 | <i>inoB2 pyroA4 niiA4 pantoB100 [pantoB*-gpdAsh::gfprerA]<br/>(nkuAΔ::bar?)</i>                                 | [18]              |
| MAD3987 | <i>wA4 pyroA4[gpdAsh::mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] (nkuAΔ::bar?)</i>  | [24]              |
| MAD4202 | <i>yA2 rabOA136D::pyrG<sup>fum</sup> pantoB100 pyrG89?</i>  | [18]              |
| MAD4503 | <i>pyroA4 copA::GFP::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo      |
| MAD4504 | <i>pyroA4 copA::GFP::pyrGfum pyrG89 nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4505 | <i>pyroA4 copA::GFP::pyrGfum pyrG89 nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4506 | <i>Diploide pyroA4 copA::GFP::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4507 | <i>Diploide pyroA4 copA::GFP::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4585 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4586 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4587 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4588 | <i>DIPLOIDE pyrG89 pyroA4 sarA::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo      |
| MAD4599 | <i>pantoB100 pyroA4 copA-gfp-pyrG<sup>fum</sup> hypB5 nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>                                   | Este trabajo      |
| MAD4600 | <i>pantoB100 copA-gfp-pyrG<sup>fum</sup> hypB5 nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>  | Este trabajo      |
| MAD4601 | <i>pyroA4 copA-gfp-pyrG<sup>fum</sup> hypB5 nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>   | Este trabajo      |
| MAD4603 | <i>copA::GFP::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 [pyrotrunc: gpdA: mRFP::PH<sup>OSBP</sup>]<br/>ΔnkuAΔ::Bar? pyrG89?</i> | Este trabajo      |

| Cepa    | Genotipo   | Fuente            |
|---------|--|-------------------|
| MAD4605 | <i>pyroA4::[pyroAmut-gpdAsh-mCherry-sedV] inoB2 copA::GFP::pyrGfum ΔnkuA::Bar pyrG89?</i>                                      | Este trabajo      |
| MAD4676 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA1::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4677 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA2::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4678 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA3::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::Bar</i>  | Este trabajo      |
| MAD4679 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA4::pyrGfum nkuAΔ::Bar</i>   | Este trabajo      |
| MAD4680 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA5::pyrGfum nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo      |
| MAD4681 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA6::pyrGfum nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo      |
| MAD4682 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA7::pyrGfum nkuAΔ::Bar</i>   | Este trabajo      |
| MAD4683 | <i>pyrG89 pyroA4 sarA8::pyrGfum nkuAΔ::Bar</i>   | Este trabajo      |
| MAD4835 | <i>pantoB100 hypB5 geaA (c.3636A&gt;G = Y1022C)</i>  | Este trabajo      |
| MAD4836 | <i>pantoB100 hypB5 geaA (c.3636A&gt;G = Y1022C)</i>  | Este trabajo      |
| MAD4837 | <i>pantoB100 hypB5 geaA (c.3636A&gt;G = Y1022C)</i>  | Este trabajo      |
| MAD4838 | <i>pantoB100 hypB5 geaA (c.3636A&gt;G = Y1022C)</i>  | Este trabajo      |
| MAD4909 | <i>sarA[sarA6::pyrGfum] pyroA4 [pyrotrunc: gpdA: mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] inoB2 nkuAΔ::bar pyrG89?</i>                         | Este trabajo      |
| MAD4910 | <i>sarA[sarA6::pyrGfum] pyroA4 [pyrotrunc: gpdA: mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar pyrG89?</i>                               | Este trabajo      |
| MAD4911 | <i>wA4 sarA[sarA6::pyrGfum] pyroA4 [pyrotrunc: gpdA: mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar pyrG89?</i>                           | Este trabajo      |
| MAD4912 | <i>pyroA4 [pyroAtrunc: gpdA: mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar pyrG89?</i>   | [24]              |
| MAD4913 | <i>wA4 sarA[sarA6::pyrGfum] sec23::gfp::pyrGfum pyroA4 [pyrotrunc: gpdA: mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] inoB2 nkuAΔ::bar pyrG89?</i> | Este trabajo      |
| MAD4924 | <i>pyroA4 sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>   | Este trabajo      |
| MAD4927 | <i>yA2 pyroA4[pyroAt gpdAmini::gfp::tlg2] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>   | Este trabajo      |
| MAD4928 | <i>pyroA4[pyroAt gpdAmini::gfp::tlg2] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>   | Este trabajo      |
| MAD4929 | <i>pyroA4[pyroAt gpdAmini::gfp::tlg2] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>   | Este trabajo      |
| MAD4933 | <i>wA4 pyroA4 pantoB100[pantoBt-gpdAmini::gfprerA] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>                                | Este trabajo      |
| MAD4934 | <i>pyroA4 pantoB100[pantoBt-gpdAmini::gfprerA] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>                                    | Este trabajo      |
| MAD4935 | <i>pyroA4 pantoB100[pantoBt-gpdAmini::gfprerA] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>                                    | Este trabajo      |
| MAD4936 | <i>yA2 inoB2 pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>                               | Este trabajo      |
| MAD4937 | <i>yA2 inoB2 pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>                               | Este trabajo      |
| MAD4938 | <i>yA2 inoB2 pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>                               | Este trabajo      |
| MAD4955 | <i>nudA2 pyrG89 wA3 chaA1</i>  | Nuestra colección |
| MAD4957 | <i>nudA5 pyrG89 wA3 chA1</i>   | Nuestra colección |
| MAD4976 | <i>rabE::rabEp::gfprabE::gfprabE-pyrGfum sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>  | Este trabajo      |
| MAD4982 | <i>pyroA4 inoB2 copA::GFP::pyrGfum sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::bar pyrG89?</i>   | Este trabajo      |
| MAD4983 | <i>wA4 pyroA4 pantoB100[pantoBt-gpdAmini::gfprerA] nkuAΔ::bar? pyrG89?</i>   | [18]              |
| MAD5087 | <i>pyroA4 synA::pyrG fum::GFP-synAΔnkuA::Bar sarA[sarA6::pyrGfum] pyrG89?</i>  | Este trabajo      |
| MAD5088 | <i>pyroA4 sec23::gfp::pyrGfum sarA[sarA6::pyrGfum] nkuAΔ::Bar? pyrG89? wA4?</i>  | Este trabajo      |
| MAD5097 | <i>wA4 pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] nkuAΔ::Bar?</i>  | [18]              |

## Materiales y Métodos

| Cepa    | Genotipo  | Fuente       |
|---------|---|--------------|
| MAD5107 | <i>pabaA1 pyrG89 nkuA::bar geaA1</i>  | Este trabajo |
| MAD5170 | <i>pabaA1 pyrG89 wA3 pyroA4 nkuAΔ::bar geaA1</i>  | Este trabajo |
| MAD5171 | <i>pabaA1 pyrG89 wA3 nkuAΔ::bar geaA1</i>   | Este trabajo |
| MAD5192 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar arl3 (AN0634) Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5193 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar arl3 (AN0634) Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5194 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar arl3 (AN0634) Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5228 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar arl1 (an5912) Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5230 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar arfX (AN3934) Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5231 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar arfX (AN3934) Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5232 | <i>yA2 pyrG89? nkuAΔ::bar? [rabE<sup>p</sup>::rabE::rabEp::gfp::rabE::pyrG<sup>fum</sup>] sarA[sarA6::pyrG<sup>fum</sup>]</i>                               | Este trabajo |
| MAD5253 | <i>pyrG89? hypB5 nkuAΔ::bar? geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5254 | <i>pyrG89? inoB2 pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] nkuAΔ::bar geaA::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5255 | <i>pyrG89? inoB2 pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] nkuAΔ::bar geaA::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5256 | <i>pyrG89? pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] nkuAΔ::bar geaA::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup> niiA4</i>  | Este trabajo |
| MAD5257 | <i>pyrG89? inoB2 pyroA4[pyroA*:: gpdA<sup>mini</sup>::mrfp-PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar geaA::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>                            | Este trabajo |
| MAD5258 | <i>pyrG89? pyroA4[pyroA*:: gpdA<sup>mini</sup>::mrfp-PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar geaA::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>                                  | Este trabajo |
| MAD5259 | <i>pyrG89? pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] nkuAΔ::bar geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5260 | <i>pyrG89? pabaA1 pyroA4 [pyroA* gpdAmini::mCherry::sedV] nkuAΔ::bar geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup> niiA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5261 | <i>pyrG89? pyroA4[pyroA*:: gpdA<sup>mini</sup>::mrfp-PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup> niiA4</i>                           | Este trabajo |
| MAD5262 | <i>pyrG89? pyroA4[pyroA*:: gpdA<sup>mini</sup>::mrfp-PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup> niiA4</i>                           | Este trabajo |
| MAD5263 | <i>pyrG89? pabaA1 hypB5 nkuAΔ::bar? geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5266 | <i>pyrG89? pyroA4 [pyroA* gpdAmini mCherry::sedV] ζnkuAΔ::argB ó nkuAΔ::bar ó nkuAwt? sec63::gfp::pyrG<sup>fum</sup></i>                                    | Este trabajo |
| MAD5267 | <i>pyrG89? inoB2 pyroA4 [pyroA* gpdAm mCherry::sedV] ζnkuAΔ::argB ó nkuAΔ::bar ó nkuAwt? sec63::gfp::pyrG<sup>fum</sup> sarA[sarA6::pyrG<sup>fum</sup>]</i> | Este trabajo |
| MAD5278 | <i>pyrG89 wA4 inoB2 pyroA4 nkuAΔ::bar? pacC900? hhoA::mCherry::pyroA sarA6::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5279 | <i>pyrG89 wA4 pyroA4 nkuAΔ::bar? pacC900? hhoA::mCherry::pyroA sarA6::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5315 | <i>geaA1 pantoB100[pantoB*-gpdAsh::gfprerA] nkuAΔ::bar?</i>   | [18]         |
| MAD5316 | <i>geaA1 pantoB100[pantoB*-gpdAsh::gfprerA] pyroA4[pyroA*:: gpdAm::mrfp-PH<sup>OSBP</sup>] nkuAΔ::bar?</i>  | [18]         |
| MAD5323 | <i>arl3Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 pabaA1 geaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5324 | <i>arl3Δ::pyrG<sup>fum</sup> pabaA1 geaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>   | Este trabajo |
| MAD5325 | <i>arl1Δ::pyrG<sup>fum</sup> pabaA1 geaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>   | Este trabajo |
| MAD5326 | <i>pyroA4 pabaA1 geaA1 nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5327 | <i>arl1Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 geaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>   | Este trabajo |
| MAD5369 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> (AN11778)</i>  | Este trabajo |
| MAD5394 | <i>pabaA1 wA3 sarA6::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5395 | <i>pabaA1 sarA6::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5396 | <i>pabaA1 wA3 sarA8::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5397 | <i>pabaA1 sarA8::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |

| Cepa    | Genotipo  | Fuente       |
|---------|---|--------------|
| MAD5433 | <i>AN6120Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5434 | <i>AN6120Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5435 | <i>AN6120Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5458 | <i>AN3438Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5459 | <i>AN3438Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5469 | <i>pyrG89 AN4274Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5470 | <i>pyrG89 AN4274Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5479 | <i>AN6033Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5480 | <i>AN6033Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5481 | <i>arl3Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 geaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5482 | <i>arl3Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5483 | <i>arl3Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5484 | <i>arl3Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 geaA1 pantoB100 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5485 | <i>arl1Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 geaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5486 | <i>arl1Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5487 | <i>arl1Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5488 | <i>arl1Δ::pyrG<sup>fum</sup> hypB5 geaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5545 | <i>pyroA4 pabaA1 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> (AN11778) wA3 sarA8::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>                         | Este trabajo |
| MAD5546 | <i>pyroA4 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> (AN11778) sarA8::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>                                    | Este trabajo |
| MAD5547 | <i>pabaA1 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> (AN11778) wA3 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5548 | <i>wA3 inoB2 sarA60::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5549 | <i>inoB2 sarA60::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5550 | <i>pabaA1 sarA60::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5558 | <i>AN4274Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5559 | <i>pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar chsB-gfp::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5560 | <i>pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::bar chsB-gfp::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5617 | <i>pabaA1 sarA8 v2</i>  | Este trabajo |
| MAD5620 | <i>pyrG89? nkuAΔ::bar pyroA4 inuA-HA-pyrG<sup>fum</sup> hypA1 pantoB100</i>   | Este trabajo |
| MAD5623 | <i>pyrG89 rabBΔ::riboB<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar pyroA4 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> riboB2</i>  | Este trabajo |
| MAD5624 | <i>pyrG89 rabBΔ::riboB<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar pyroA4 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> riboB2</i>  | Este trabajo |
| MAD5625 | <i>pyrG89 rabBΔ::riboB<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar pyroA4 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> riboB2</i>  | Este trabajo |
| MAD5626 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 chsB-mCherry-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5627 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> (gcs1 es AN2222)</i>  | Este trabajo |
| MAD5628 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5629 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 AN1629Δ::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5682 | <i>pyrG89? nkuAΔ::bar? inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 vps33ts</i>  | Este trabajo |
| MAD5683 | <i>pyrG89? hypB5 nkuAΔ::bar? inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD5685 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 [upstream chsB-chsB- gfp-3'utr-term-pyrG<sup>fum</sup>-downstream-plasmid-chsB<sup>p</sup>-chsB]</i>          | Este trabajo |
| MAD5686 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 [upstream chsB-chsB- gfp-3'utr-term-pyrG<sup>fum</sup>-downstream-plasmid-chsB<sup>p</sup>-chsB]</i>          | Este trabajo |
| MAD5687 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 [upstream chsB-chsB- mCherry-3'utr-term-pyrG<sup>fum</sup>-downstream-plasmid-chsB<sup>p</sup>-chsB]</i>      | Este trabajo |
| MAD5688 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 [upstream chsB-chsB-3'utr-term-downstream-plasmid-chsB<sup>p</sup>-chsB-mCherry-3'utr-pyrG<sup>fum</sup>]</i> | Este trabajo |

## Materiales y Métodos

| Cepa    | Genotipo   | Fuente       |
|---------|--|--------------|
| MAD5689 | <i>synA::pyrG<sup>fum</sup>::GFP-synA gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>                        | Este trabajo |
| MAD5690 | <i>synA::pyrG<sup>fum</sup>::GFP-synA gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>                 | Este trabajo |
| MAD5691 | <i>synA::pyrG<sup>fum</sup>::GFP-synA gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> biA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>                   | Este trabajo |
| MAD5692 | <i>rabDΔ::pyrG<sup>fum</sup> gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 pabaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>                   | Este trabajo |
| MAD5700 | <i>synAΔ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ::bar? gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> (gcs1 es AN2222)</i>                | Este trabajo |
| MAD5701 | <i>synAΔ::pyrG<sup>fum</sup> pabaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar? gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> (gcs1 es AN2222)</i>         | Este trabajo |
| MAD5702 | <i>synAΔ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ::bar? pyroA4 gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> (gcs1 es AN2222)</i>         | Este trabajo |
| MAD5703 | <i>pabaA1 pyrG89? nkuAΔ::bar? gcs1Δ::pyrG<sup>fum</sup> (gcs1 es AN2222)</i>                                   | Este trabajo |
| MAD5765 | <i>pyrG89 wAΔ [chsB-gfp::pyrG<sup>fum</sup>] pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5804 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdAmini-sp-GFP-EglC] pantoB100</i>   | Este trabajo |
| MAD5805 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdAmini-sp-GFP-EglC] pantoB100</i>   | Este trabajo |
| MAD5806 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdAmini-sp-HA-inuA] pantoB100</i>  | Este trabajo |
| MAD5807 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdAmini-sp-HA-inuA] pantoB100</i>  | Este trabajo |
| MAD5808 | <i>pyrG89 eglC::pyrG pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5809 | <i>pyrG89 eglC-gfp-GPIsp::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5810 | <i>pyrG89 eglC-gfp-GPIsp::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5816 | <i>AN4274delta::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 wA3</i>  | Este trabajo |
| MAD5817 | <i>An2222delta::pyrG<sup>fum</sup> wA3 pabaA1</i>  | Este trabajo |
| MAD5818 | <i>An2222delta::pyrG<sup>fum</sup> wA3 pabaA1</i>  | Este trabajo |
| MAD5833 | <i>pabaA1 wAΔ [chsB-gfp::pyrG<sup>fum</sup>]</i>   | Este trabajo |
| MAD5834 | <i>pabaA1 wAΔ [chsB-gfp::pyrG<sup>fum</sup>] pyroA4</i>  | Este trabajo |
| MAD5835 | <i>wAΔ [chsB-gfp::pyrG<sup>fum</sup>] sarA6::pyrG<sup>fum</sup></i>  | Este trabajo |
| MAD5851 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-gfp-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD5852 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-gfp-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD5853 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-gfp-chsB DIPLOIDE gfp-chsb / chsbwt</i>               | Este trabajo |
| MAD5854 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD5855 | <i>pyrG89 wAΔ [gfp-chsB::pyrG<sup>fum</sup>] nkuAΔ::bar pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5856 | <i>pyrG89 wAΔ [gfp-chsB::pyrG<sup>fum</sup>] nkuAΔ::bar pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD5882 | <i>pyrG89 gelE-gfp-GPIsp::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5883 | <i>pyrG89 gelE-gfp-GPIsp::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 nkuAΔ::bar</i>   | Este trabajo |
| MAD5884 | <i>pyrG89 pabaA1 nkuAΔ::bar? pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB rabOts</i>   | Este trabajo |
| MAD5885 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar? pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB rabOts</i>   | Este trabajo |
| MAD5886 | <i>pyrG89 pabaA1 nkuAΔ::bar? pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB rabOts</i>                                    | Este trabajo |
| MAD5887 | <i>pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB sarA6 pabaA1 pyrG89?</i>   | Este trabajo |
| MAD5894 | <i>hypB5 pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD5895 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4[gpdA<sup>mini</sup>::mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB</i>     | Este trabajo |
| MAD5896 | <i>pyrG89 wA4 nkuAΔ::bar pyroA4[gpdA<sup>mini</sup>::mRFP::PH<sup>OSBP</sup>] pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB</i> | Este trabajo |
| MAD5897 | <i>hypA1 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom::gfp-chsB nkuA::bar? pyrG89? pabaA1</i>                                  | Este trabajo |
| MAD5898 | <i>pyroA4 pabaA1 wA3 nkuA::bar? pyrG89? hypA1 pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB</i>                                 | Este trabajo |
| MAD5924 | <i>pabaA1 pyrG89 yA2 pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB abpA-mRFP::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar?</i>                | Este trabajo |
| MAD5925 | <i>pyrG89 pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB abpA-mrfp::pyrG<sup>fum</sup> nkuA::bar?</i>                            | Este trabajo |

| Cepa    | Genotipo  | Fuente       |
|---------|---|--------------|
| MAD5927 | <i>inuA-ha-3'utr::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 riboB2 sedVts::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar?</i><br><i>pyrG89?</i>                                   | Este trabajo |
| MAD5928 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom::mCherry-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD5929 | <i>AN4274Δ::pyrG<sup>fum</sup> AN2222Δ::pyrG<sup>fum</sup> wA3 pabaA1</i>   | Este trabajo |
| MAD5954 | <i>rabOts inuA-HA nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo |
| MAD5962 | <i>sarA6::pyrG<sup>fum</sup> eglC-gfp-GPIsp::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ:: bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD5963 | <i>wA3 sarA6::pyrG<sup>fum</sup> eglC-gfp-GPIsp::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ:: bar?</i><br><i>pabaA1 pyroA4</i>                              | Este trabajo |
| MAD5965 | <i>nkuAΔ:: bar pyrG89 rabCΔ::riboB<sup>fum</sup> riboB2</i>   | [38]         |
| MAD5979 | <i>inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> podB1 wA3 riboB2</i>  | Este trabajo |
| MAD5980 | <i>inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> podB1 wA3</i>   | Este trabajo |
| MAD5989 | <i>yA2 pyroA4[pyroA*-gpdAmini::eglC-gfp-GPIsp] pantoB100</i>  | Este trabajo |
| MAD6058 | <i>pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB synA::pyrG<sup>fum</sup>::GFP-synA pyroA4 pyrG89?</i><br><i>nkuAΔ:: bar?</i>                                  | Este trabajo |
| MAD6060 | <i>wA3 sarA6::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4[pyroA*-gpdAmini::eglC-gfp-GPIsp]</i><br><i>pabaA1</i>   | Este trabajo |
| MAD6065 | <i>wA3 sarA6::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4[pyroA*-gpdA<sup>mini</sup>::eglC-gfp-GPIsp]</i><br><i>pabaA1</i>  | Este trabajo |
| MAD6066 | <i>wA3 sarA6::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4[pyroA*-gpdA<sup>mini</sup>::eglC-gfp-GPIsp]</i><br><i>pantoB100</i>                                       | Este trabajo |
| MAD6115 | <i>pyrG89? wA3 inuA-HA-3'utr::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ:: bar? vpsTΔ::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD6116 | <i>pyrG89? nkuAΔ:: bar? pantoB100 vps33ts pyrG<sup>fum</sup>::gfp-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD6117 | <i>yA2 pabaA1 riboB2 inuA-HA-3'utr::pyrG<sup>fum</sup> sodVI (copA-ts)</i>  | Este trabajo |
| MAD6124 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdA<sup>mini</sup>::eglC-gfp-GPIsp] hypA1 wA3 pyrG89?</i><br><i>nkuAΔ:: bar? pantoB100</i>                                      | Este trabajo |
| MAD6125 | <i>pyroA4[pyroA*-gpdA<sup>mini</sup>::eglC-gfp-GPIsp] hypA1 wA3 pyrG89?</i><br><i>nkuAΔ:: bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD6145 | <i>pyrG89? nkuAΔ::bar? pyroA4[pyroA*-rabOp-gfp-rabO] pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB pantoB100</i>   | Este trabajo |
| MAD6152 | <i>pyrG89 pabaA1 nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB</i><br><i>geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>                            | Este trabajo |
| MAD6153 | <i>pyrG89 nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB</i><br><i>geaA1::gfp::3utr::pyrG<sup>fum</sup></i>                                   | Este trabajo |
| MAD6158 | <i>pyrG89? nkuAΔ::bar pantoB100 pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD6159 | <i>pyrG89? dnfBΔ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG<sup>fum</sup>-gfp-synA nkuAΔ::bar pyroA4 pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB</i>                           | Este trabajo |
| MAD6182 | <i>pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB synA::pyrG<sup>fum</sup>::GFP-synA sarA6::pyrG<sup>fum</sup></i><br><i>pyroA4 pyrG89? nkuAΔ:: bar?</i>        | Este trabajo |
| MAD6183 | <i>pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB synA::pyrG<sup>fum</sup>::GFP-synA sarA6::pyrG<sup>fum</sup></i><br><i>pyroA4 pabaA1 pyrG89? nkuAΔ:: bar?</i> | Este trabajo |
| MAD6184 | <i>pabaA1 synAΔ::pyrG<sup>fum</sup> pyrG89? nkuAΔ::bar? pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB</i>  | Este trabajo |
| MAD6202 | <i>wA3 hypA1 copA-gfp-pyrG<sup>fum</sup> pyroA4 nkuAΔ::bar</i>  | Este trabajo |
| MAD6204 | <i>pyrG<sup>fum</sup>::mCherry-chsB ΔdnfA::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4? pyrG89? nkuAΔ:: bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD6210 | <i>pyrG89 nkuAΔ:: bar riboB2 chs5 (AN8710)Δ::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD6211 | <i>pyrG89 nkuAΔ:: bar riboB2 chs5 (AN8710)Δ::pyrG<sup>fum</sup></i>   | Este trabajo |
| MAD6220 | <i>pabaA1 pyrG89 nkuA::bar copA-gfp-pyrG<sup>fum</sup> geaA1</i>  | Este trabajo |
| MAD6221 | <i>pabaA1 pyrG89 nkuA::bar copA-gfp-pyrG<sup>fum</sup> geaA1</i>  | Este trabajo |
| MAD6222 | <i>nkuAΔ:: bar pyrG89 rabCΔ::riboB<sup>fum</sup> riboB2 pyrG<sup>fum</sup>-gfp-chsB</i>   | Este trabajo |
| MAD6253 | <i>hypB5 geaA1-gfp pyrG<sup>fum</sup>::chsBp-mCherry-chsB pyroA4 pyrG89?</i><br><i>nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD6254 | <i>hypB5 geaA1-gfp pyrG<sup>fum</sup>::chsBp-mCherry-chsB pyroA4 pantoB100</i><br><i>pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>                                      | Este trabajo |

| Cepa    | Genotipo   | Fuente       |
|---------|--|--------------|
| MAD6268 | <i>pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom::mCherry-chsB pyroA4::[pyroAt-gpdamini-gfp-tlgB] pyrG89? nkuAΔ::bar? ¿argB2[argB*-alcA-gfp-rabE]?</i>                | Este trabajo |
| MAD6269 | <i>hypB5 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom::mCherry-chsB pyroA4::[pyroAt-gpdamini-gfp-tlgB] pyrG89? nkuAΔ::bar? ¿argB2[argB*-alcA-gfp-rabE]?</i>          | Este trabajo |
| MAD6312 | <i>sarA8::pyrGfum inoB2 pantoB100 [pantoB*-gpdAsh::gfprerA]</i>  | Este trabajo |
| MAD6313 | <i>sarA8::pyrGfum inoB2 pyroA4[pyroAt-gpdAsh::mCherry::sedV]</i>   | Este trabajo |
| MAD6314 | <i>sarA8::pyrGfum pantoB100 [pantoB*-gpdAsh::gfprerA]</i>  | Este trabajo |
| MAD6315 | <i>sarA8::pyrGfum pyroA4[pyroAt-gpdAsh::mCherry::sedV]</i>   | Este trabajo |
| MAD6327 | <i>pyrG89 riboB<sup>fum</sup>-prom-gfp-chsB nkuAΔ::bar pyroA4 riboB2</i>   | Este trabajo |
| MAD6328 | <i>pyrG89 riboB<sup>fum</sup>-prom-gfp-chsB nkuAΔ::bar pyroA4 riboB2</i>   | Este trabajo |
| MAD6353 | <i>wA3 rabSΔ::pyroA<sup>fum</sup> inuA-HA::pyrG<sup>fum</sup> inoB2? niiA4? pyroA4? riboB2? nkuAΔ::bar?</i>  | Este trabajo |
| MAD6402 | <i>fimAΔ::tn31::pyr4 pyrG89? nkuAΔ::bar pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom::gfp-chsB pantoB100</i>   | Este trabajo |
| MAD6405 | <i>yA2 pantoB100 sarA8::pyrG<sup>fum</sup> pyroA4::[pyroA<sup>t</sup>-gpdA<sup>mini</sup>-gfp-tlgB]</i>  | Este trabajo |
| MAD6407 | <i>pyrG89 chs5 (AN8710)Δ::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar pyroA4 riboB<sup>fum</sup>-prom-gfp-chsB riboB2</i>  | Este trabajo |
| MAD6422 | <i>pyrG89 vps52::pyrG<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar pyroA4 riboB<sup>fum</sup>-prom-gfp-chsB riboB2</i>   | Este trabajo |
| MAD6495 | <i>pantoB100? pyroA4::[pyroAt-gpdamini-gfp-tlgB] pyrG89? rabBΔ::riboB<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar? pyroA4? inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup> riboB2?</i> | Este trabajo |
| MAD6496 | <i>pyrG89? riboB2 wAΔ [gfp-chsB::pyrG<sup>fum</sup>] nkuAΔ::bar pyroA4</i>   | Este trabajo |
| MAD6510 | <i>inoB2 niiA4 pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-gfp-chsB pyroA4[pyroA*-gpdAsh::mCherry-sedV] nkuAΔ::bar pyrG89?</i>                                      | Este trabajo |
| MAD6511 | <i>pyrG89 riboB<sup>fum</sup>-prom-gfp-chsB nkuAΔ::bar pyroA4::pyrG<sup>fum</sup>::niiAp::slaB riboB2</i>  | Este trabajo |
| MAD6552 | <i>nudA2 pyrG89? chaA1 nkuAΔ::bar? pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-gfp-chsB pyroA4?</i>   | Este trabajo |
| MAD6553 | <i>wA3 nudA5 pyrG89? nkuAΔ::bar? pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-gfp-chsB pyroA4?</i>   | Este trabajo |
| MAD6559 | <i>pyrG89? pabaA1 rabBΔ::riboB<sup>fum</sup> nkuAΔ::bar? pyroA4 inuA-HA-3'UTR-pyrG<sup>fum</sup>? riboB2? pyrG<sup>fum</sup>::chsBprom-gfp-chsB</i>  | Este trabajo |

## 3.3. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

### 3.3.1. Plásmidos

Todos los plásmidos fueron comprobados mediante digestiones analíticas y secuenciación. El plásmido p1660 se utilizó para la obtención de estirpes con un transgén integrado en *pyroA4* que se expresase bajo una forma atenuada del promotor del gen *gpdA*, denominada *gpdA<sup>mini</sup>*.

#### ***pgpdA<sup>mini</sup>::inuA-HA (p2047)***

La secuencia codificante del gen *inuA* se amplificó con oligonucleótido en cuyos extremos se había introducido las dianas de *NcoI* y *EcoRI*. El producto de la amplificación y el plásmido p1660 se digirieron con *NcoI* y *EcoRI* y se ligaron ambos fragmentos. Después se

introdujo HA<sub>3</sub> mediante la ligación EcoRI / XmaI, creando el plásmido p2047, para la obtención de una estirpe con el transgén inuA-HA3 integrado en *pyroA4* con el el gen *pyroA* silvestre reconstruido.

### ***pgpdA<sup>mini</sup>::HA-inuA (p2250)***

Se realizó una PCR de fusión entre la secuencia del péptido señal de inuA, tres copias de HA y el resto de la secuencia codificante de inuA con extremos con las dianas de *NcoI* y *XmaI*. Esta fusión se clonó mediante digestión *NcoI/XmaI* en p2047, después de eliminar el inserto que éste contenía.

### ***pgpdA<sup>mini</sup>::gfp-gelE* y *pgpdA<sup>mini</sup>::gfp-eglC (p2247)***

Se realizó una PCR de fusión entre parte del promotor *gpdA<sup>mini</sup>*, la secuencia del péptido señal de *eglC*, la secuencia de GA<sub>5</sub> (5 x Gly-Ala) -GFP-GA<sub>5</sub> y el resto del ORF de *eglC* o *gelE*. Esta PCR de fusión se amplificó con oligonucleótidos que contuviesen en los extremos las dianas *KpnI* y *XmaI* y se clonó en p1881 mediante digestión *KpnI/XmaI*. p1881 es un derivado de p1660 (decriso más arriba).

### ***pgpdA<sup>mini</sup>::eglC-gfp-gpi (p2259)***

Se realizó una PCR de fusión entre parte del promotor *gpdA<sup>mini</sup>*, los primeros 1077 nucleótidos del ORF de *eglC*, la secuencia de GFP y el resto del ORF de *eglC*. Esta PCR de fusión se amplificó con oligonucleótidos que contuviesen en los extremos las dianas *KpnI* y *XmaI* y se clonó en p1881 mediante digestión *KpnI/XmaI*. p1881 es un derivado de p1660.

### ***pchsB-gfp(p2241)* y *pchsB-mcherry(p2242)***

Estos plásmidos se utilizaron para la integración en el locus *chsB* del transgén *chsB-gfp* o *chsB-mcherry* en tándem al gen *chsB* endógeno. De esta manera se comprobó que los alelos *chsB-gfp* y de *chsB-mcherry* eran recesivos (ver Resultados). Para obtener dichos plásmidos, se amplificó la región codificante de *chsB* y los 711 pb anteriores a ella, que debían de contener la región promotora de *chsB*. Posteriormente se amplificó la secuencia de GA<sub>5</sub>-GFP o GA<sub>5</sub>-mCherry, el marcador de selección *pyrG<sup>flum</sup>* y los 800 nucleótidos aguas abajo de la región codificante de *chsB*. Estos fragmentos se unieron por PCR de fusión para generar un producto *promotor-chsB-GA<sub>5</sub>-GFP-pyrG<sup>flum</sup>-3' chsB*. Este producto se clonó en *pGEM-T Easy* (Promega).

# Materiales y Métodos

## 3.3.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Tabla M.2) fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

**Tabla M.2. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.**

| Código | Nombre                           | Secuencia  |
|--------|----------------------------------|--|
| MHG_8  | GeaA-Rev4                        | GATCCGCGCTATAAATGCC                                      |
| MHG_9  | GeaA-Fw4                         | GCCCCTTGACTCGCTCAACG                                     |
| MHG_10 | GeaA-Rev3                        | CCTTGACAATAGGCACCGCG                                     |
| MHG_11 | GeaA-Fw3                         | GCCCAGCCTTCTGAGGTTGC                                     |
| MHG_12 | GeaA-Rev2                        | CGGGGGCAA GTCCTGGC                                       |
| MHG_13 | GeaA-Fw2                         | GTCTCTCGGAAGTGCTGCGG                                     |
| MHG_14 | GeaA-Rev1                        | GCGACTGTGG TTCCGTCCAC                                    |
| MHG_15 | GeaA-Fw1                         | CTGAAGCAAGGAGCTGCACG                                     |
| MHG_16 | Fw sar1                          | CCCAACCCTTTCTTCGCAAT                                     |
| MHG_17 | Rev sar1                         | GGGAAGTACGGCTATGGTTG                                     |
| MHG_18 | Fw mutag. Sar1                   | GCTCTGACTCGATTTCAAATGTGG                                 |
| MHG_19 | Rev mutag. Sar1                  | GCGGCACAGGTTGGTAGCTAGC                                   |
| MHG_20 | Fw sarA-pyrG fusion              | CACAACCATAGCCGTCAGTCCCACCGGTCGCCTCA<br>AACAATGCTCTTCA    |
| MHG_21 | Rev pyrG-down.Sar1               | GCGTTGCGGCACAGGTTGGTAGCCTGTCTGAGAGGA<br>GGCACTGATGCG     |
| MHG_22 | Fw down. Sar1                    | GTACCAACCTGTGCCGCAAC                                     |
| MHG_23 | Rev down. Sar1                   | CCCGGCAAAGTTATGTACGTACG                                  |
| MHG_24 | Rev upstream sar1                | GGCGGGCTATGGTTGTCTG                                      |
| MHG_25 | Fw up. sar1-pyrG fusion          | CCAGCACAGACAACCATAGCCCCGCCACCGGTCGCCT<br>CAAACAATGCTC    |
| MHG_26 | Fw sarA-pyrG fusion (BIS)        | CTGCACAACCATAGCCGTCAGTCCCACCGGTCGCC<br>TCAAACAATGCTCTTCA |
| MHG_27 | Rev pyrG-down sar1 fus.<br>(BIS) | CCGTTCTGAGGGGTGATGAGGTAGACCTGTCTGAGA<br>GGAGGCACTGATGCG  |
| MHG_28 | Fw down. Sar1 (BIS)              | GTCTACCTCATCACCCCTCAGAACG                                |
| MHG_29 | Rev 3'ORF copA                   | GAGTTGGCTAGGGACATAACAACCG                                |
| MHG_30 | Fw 3'ORF copA GFP fus.           | GCGGTTGTATGTCCCTAGCCAACCTCGGAGCTGGTGC<br>AGGCGCTGGAGCC   |
| MHG_31 | Rev 3'UTR pyrG fus.              | CATAACCCATCACACGTCGTCAGGGGAGTCTGAGAG<br>GAGGCACTGATGCG   |
| MHG_32 | FW 3'UTR copA                    | TCCCCTGACGACGTGTGATG                                     |
| MHG_33 | Rev 3'UTR copA                   | CGCCGCATGGCGTAACTTG                                      |
| MHG_34 | Fw sar1 exterior                 | TCGCACAAAGTCACTCCCTCG                                    |
| MHG_35 | Rev sar1 exterior                | TGTTTCATCCACAACGGCCAAG                                   |
| MHG_36 | Fw copA exterior                 | GCCATCCCCAGGGACCTTG                                      |
| MHG_37 | Rev copA exterior                | CAGATGCCGTCTCTGCACTTCC                                   |
| MHG_38 | sec.5'ORF sar1                   | AGCGCCCGGTCTCAACGTC                                      |
| MHG_39 | Rev sar1 con 3'utr               | AAATCCGGGGAGGTGCGAT                                      |
| MHG_40 | Rev down. Sar1                   | TCCATATTGCTCCCTACGAGACTTA                                |
| MHG_41 | fw down. Sar1                    | CTGTTGCAGCTCAGATTTGCAATG                                 |
| MHG_42 | Fw fusion sar1-pyrG              | CACCCCTTATCGCACCTCCCCGATTACCGGTCGC<br>CTCAAACAATGCTCTTCA |
| MHG_43 | Rev fusion sar1-pyrG             | CCATTGCAAATCTGAGCTGCAACAGCTGTCTGAGAG<br>GAGGCACTGATGCG   |
| MHG_48 | fwNcoI(met-GLY*)Sar1             | ATATCCATGGGCTGGATTATCAACTGGTTTTACGAC                     |
| MHG_49 | MHG_49 rev (NcoI) Sar1           | ATATCCATGGCGACATATTGAGATAGCCACCTTATA<br>CCTTC            |
| MHG_54 | Fw1 hypB5                        | CATACTCCGGACTATCGCAAGG                                   |
| MHG_55 | Rev1 hypB5                       | CCTGTTGCTGCTCGTGGCTG                                     |

| <b>Código</b> | <b>Nombre</b>                | <b>Secuencia</b>  |
|---------------|------------------------------|---|
| MHG_56        | Fw2 hypB5                    | GTAACGAAGACGATGTGGACGAG                                 |
| MHG_57        | Rev3 hypB5                   | TGGCCAGAAGACTGAATCTCTTG                                 |
| MHG_58        | Fw3 hypB5                    | GGTGAAGGGTGTAGACCGGATC                                  |
| MHG_59        | Fw4 hypB5                    | TCATGACTGGCGATGATCTTGAG                                 |
| MHG_60        | Rev4 hypB5                   | TGCCTCCAGAGGACATCCCA                                    |
| MHG_61        | Fw5 hypB5                    | TCCAGCCTCTGCGTCGACATC                                   |
| MHG_62        | rev5 hypB5                   | CAGCAAACCTCTCACGGAGAGG                                  |
| MHG_63        | Fw. Up arfX (3934)           | CCTTTCCAAGTCTCAGCGAC                                    |
| MHG_64        | Rev. Up arfX (3934)          | GTTCGTGACGTTTCAATGAGAAC                                 |
| MHG_65        | Fw. Fusion up arfX pyrG      | TGGTTCTCATTGAAACGTCACGAACACCGGTGCGCT<br>CAAACAATGCTC    |
| MHG_66        | Rev. Fus dwn arfX pyrG       | ATGTTAGGACAAGGACGTTAGCTGCTGTCTGAGAGG<br>AGGCACTGATGCG   |
| MHG_67        | Fw. down arfX (3934)         | CAGCTAACGTCTTGTCTTAAC                                   |
| MHG_68        | Rev. down arfX (3934)        | GCTGCTAGGGCTATATGTCTTC                                  |
| MHG_69        | Fw. Up arl1 (5912)           | TGAGTAAGGTTAGGGCATGCAG                                  |
| MHG_70        | Rev. Up arl1 (5912)          | GTAGTAGATGCGGCGATACTCTG                                 |
| MHG_71        | Fw. Fusion up arl1 pyrG      | ACAGAGTATCGCCGCATCTACTACACCGGTGCGCTC<br>AAACAATGCTC     |
| MHG_72        | Rev. Fusion down arl1 pyrG   | TGCGTTCTCGGACTGAAGGGTTTCTGTCTGAGAGGA<br>GGCACTGATGCG    |
| MHG_73        | Fw. down arl1 (5912)         | AAACCCTTCAGTCCGAGAACG                                   |
| MHG_74        | Rev. down arl1 (5912)        | TCAGCTGTGGTACCTACCTTTG                                  |
| MHG_75        | Fw up arfA                   | ATGTTGTCCTAGTTGTTCCCGAG                                 |
| MHG_76        | Rev arfA                     | GAGCAAGCGATATACAAGTCCTAC                                |
| MHG_77        | Fw. Fusion arfA pyrG         | GTAGTAGGACTTGTATATCGCTTGCTCACCGGTGCGC<br>CTCAAACAATGCTC |
| MHG_78        | Rev. Fusion down arfA pyrG   | ACTGCACGTTGGACTGCATGTTCTGTCTGAGAGGA<br>GGCACTGATGCG     |
| MHG_79        | Fw. down arfA                | GAACATGCAGTCCAACGTGCAG                                  |
| MHG_80        | Rev. down arfA               | TTTCTACCTCATCCACAGCATCC                                 |
| MHG_81        | Fw cin4 sonda down           | TGAGCGTACCATCCACACAAC                                   |
| MHG_82        | Rev. cin4 sonda down         | GATTGCCATATAGTCAGACTGG                                  |
| MHG_83        | Sec. ORF arfA                | CTGTTGCGCTGTGCTCGCAC                                    |
| MHG_84        | Fw arfA medioORF             | TGCGAATTCTGATGGTCCGGTC                                  |
| MHG_85        | Rev orf arfA                 | GTCGCGGCCAGTCTTCCGCAG                                   |
| MHG_86        | Fw gfp fusion arfA           | GACGCTGCGGAAGACTGGCCGCGACGGAGCTGGTG<br>CAGGCGCTGGAGCC   |
| MHG_87        | Rev gfp fusion3utr arfA      | CCATTTCATCACAACCTACCGCAATTATTATTTGTATAG<br>TTCATCCATGCC |
| MHG_88        | Fw arfA 3utr                 | TAATTGCGGTAGTTGTGATGAATG                                |
| MHG_89        | MHG_89 rev. sec pyrGAf medio | AAGTCTTGCGCAGATGCGGTC                                   |
| MHG_90        | MHG_90 rev sec pyrGAf ppio   | CACATCGGTGCTGTATTCTC                                    |
| MHG_91        | fw sucA ORF end              | AAAGAATGGCGTGACCCTAATG                                  |
| MHG_92        | rev sucA_ORF                 | GTTCCAAACAGACCCAACCTTA                                  |
| MHG_93        | fw fusion sucA-ga5-HA        | GTGAGTAAGGTTGGGTCTGTTTGGAAACGGAGCTGGT<br>GCAGGCGCTGGAG  |
| MHG_94        | rev fusión 3'utr-sucA-HA     | CCAAACAACAAAACATCTAGCTAGATCCTTCACTGA<br>GCAGCGTAATCTGG  |
| MHG_95        | fw 3'utr sucA                | AGGATCTAGCTAGATGTTTTGTTG                                |
| MHG_96        | rev terminator sucA          | TCGCCCTACTGGAGCTTTCAC                                   |
| MHG_97        | fw fusión sucA-pyrG          | TGGTGAAAGCTCCAGTAGGGCGAACCGGTGCGCTCA<br>AACAATGCTCTTCA  |

## Materiales y Métodos

| Código  | Nombre                   | Secuencia   |
|---------|--------------------------|---|
| MHG_98  | rev fus downsucA-pyrG    | GCAACGTATCATAGTCGTGGGTGATGTCTGAGAGGA<br>GGCACTGATGC     |
| MHG_99  | fw down sucA             | ATCACCCACGACTATGATACG                                   |
| MHG_100 | rev down sucA            | GAGATCTATAGAAGGGAGGTTG                                  |
| MHG_104 | XmaI-Rev-pyrG            | ATATCCCGGGCTGTCTGAGAGGAGGCACTG                          |
| MHG_111 | Fw sonda AN6120          | AGACTTTCCTTCCAGTCGACC                                   |
| MHG_112 | Rev sonda AN6120         | GTACTCAGGCGGTATATCAGC                                   |
| MHG_113 | Fw ATG1                  | GCCGCAAATGAACCAACAAAATG                                 |
| MHG_114 | Fw ATG2                  | AAGTAACTCAAGCGTATGAAATG                                 |
| MHG_115 | Rev para ATG             | GCCTTGCAGAGAGATATCAAG                                   |
| MHG_116 | Fw cDNA control          | TCTGGATATCAAAGGCCTTCTTC                                 |
| MHG_117 | Rev cDNA control         | AGTATTGTCGGCTCCAATTTGG                                  |
| MHG_118 | AN3438 Fw sonda          | AGTCGTGAGCCTCTCAGATGC                                   |
| MHG_119 | AN3438 Rev sonda         | GAGATTGTTCTCCGTAGTTCCG                                  |
| MHG_120 | 5'utr an1127             | ACTCCTCATTCAATCTACGGTC                                  |
| MHG_121 | Rev orf an1127           | GTGTGCACGACGACAGTGTTG                                   |
| MHG_122 | Fw orf an1127            | ACTCAAGCCGACAGTATCGAG                                   |
| MHG_123 | 3'utr rev an1127         | CAGAGGGAGGCTGATACTAAG                                   |
| MHG_124 | Rev stop2 an1127         | CTACCCTTTCATCGGCATG                                     |
| MHG_125 | Fw sonda AN1931          | GACTATGGTGGGTGTCATTCC                                   |
| MHG_126 | Rev sonda AN1931         | TGCTGGTTCTGCAACGCTAAC                                   |
| MHG_127 | Fw sonda AN4274          | TTGCCTCGCTAGGGATTGATC                                   |
| MHG_128 | Rev sonda AN4274         | AGGACCGTAGGGATTCCCAC                                    |
| MHG_129 | Fw sec p2164             | TACGAGGGCACCCAGACCG                                     |
| MHG_130 | Rev sec p2164            | AATGAACCAACGTAATTTGTAGC                                 |
| MHG_131 | Fw s. AN1629             | AACCTCTCTACGACTTCTACTC                                  |
| MHG_132 | Rev s. AN1629            | AGAATCAGCACCTGCAACGAC                                   |
| MHG_133 | Fw s. AN6033             | TCAACAGCTAAACGAGTGCAAG                                  |
| MHG_134 | Rev s. AN6033            | GTCCATTGAGGTCAGTCTCGG                                   |
| MHG_135 | Fw s. sec12              | TAGATAGTCGCGAAGAAAAGGC                                  |
| MHG_136 | Rev s. sec12             | ACAGAGGCCTGGAGACTATTC                                   |
| MHG_144 | Fw chsB orf medio        | TACATCTACCTTGCGTTCCTGC                                  |
| MHG_145 | Rev chsB final           | CCGACGGGCGAAGCAGCAG                                     |
| MHG_146 | Fw fus chsB-gfp          | CTGCTGCTTCGCCCCGTGGGGAGCTGGTGCAGGCGC<br>TGGAGCC         |
| MHG_147 | rev fus gfp-3utr chsB    | CCATTAGGCAAAGCATGCTCTTATTATTTGTATAGTT<br>CATCCATGCC     |
| MHG_148 | Fw 3'utr chsB            | TAAGAGCATGCTTTGCCTAATGG                                 |
| MHG_149 | rev chsB final transcrip | TACAGTACGGGATTAGAGTAAAG                                 |
| MHG_150 | fw fus chsB dwn-pyrG     | CTTTACTCTAATCCCGTACTGTAACCGGTGCGCTCAA<br>ACAATGCTC      |
| MHG_151 | rev fus pyrG-down chsB   | CTTGTAACAAGCCATCGCCTCCTGTCTGAGAGGAG<br>GCACTGATGCC      |
| MHG_152 | fw chsB down             | GAGGCGATGGCTTGTGTACAAG                                  |
| MHG_153 | rev chsB down            | GGTAAATCTTTTGCGTGCACTTG                                 |
| MHG_154 | Fw fus uprabB-riboB      | GCTCATTGTCCAACCGTCCCCATCAAGAGGCCGTTT<br>AGGAGTCTGG      |
| MHG_155 | Rev fus downrabB-riboB   | CGGACGGATCGAATAGGCTCAGAACGTTTTCGCTGC<br>AGAAC           |
| MHG_156 | Fw up an2222             | ATTGCTGTCAAGGTCGCCATTG                                  |
| MHG_157 | Rev up an2222            | GGCGTATAAAAGCTGCAAGACG                                  |
| MHG_158 | Fw dwn an2222            | TTTGACATAGATATGGTAAGGCTAG                               |
| MHG_159 | Rev dwn an2222           | ACATGCCTCATGGAACCCCTC                                   |
| MHG_160 | Fw fus pyrG-2222         | CGTCTTGCAGCTTTTATACGCCACCGGTGCGCTCAA<br>ACAATGCTC       |
| MHG_161 | Rev fus pyrG-2222        | CTAGCCTTACCATATCTATGTCAAACCTGTCTGAGAG<br>GAGGCACTGATGCC |

| Código  | Nombre                    | Secuencia   |
|---------|---------------------------|---|
| MHG_162 | fw up an1629              | ACTTGCCCATCAGAATTCGCAC                              |
| MHG_163 | rev up an1629             | GTCGAATTATGGAGAGCTTTATTTA                           |
| MHG_164 | Fw pyrG-1629 fus          | TAAATAAAGCTCTCCATAAATTCGACACCGGTTCGCCTCAAACAATGCTC  |
| MHG_165 | rev pyrG-1629 fus         | GAGTAGAAGTCGTAGAGAGGTTCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG     |
| MHG_166 | fw chsB up                | TTGGTGCTCAATAAGATTGGCTG                             |
| MHG_167 | rev chsB up               | GGTTAAACTGGTAGTATGTGCG                              |
| MHG_168 | fw fus up chsB-pyrG       | CGCACATACTACCAGTTTAACCACCGGTTCGCCTCAAACAATGCTC      |
| MHG_169 | rev fus down-chsB pyrG    | CTTTCATTAGGCAAAGCATGCTCCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG    |
| MHG_170 | fw chsB up                | GAGCATGCTTTGCCTAATGGAAAG                            |
| MHG_171 | rev fus mcherry-3utr chsB | CCATTAGGCAAAGCATGCTCTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC      |
| MHG_172 | rev externo chsB          | ATGACTGCATTTCAGATTCAGCAC                            |
| MHG_173 | fw2 sacII-up chsB         | ATATCCGCGGGAATAAATTACCGCCAGGCCG                     |
| MHG_174 | rev medio orf chsB        | CAAGGATAAACTGCAAGAGCAGG                             |
| MHG_175 | rev NsiI-chsB dwn         | ATATATGCATGGTAAATCTTTTTCGCTGCACTTG                  |
| MHG_176 | fw up rabB ext            | GCAGTTCCTTCAACATAGTCAAG                             |
| MHG_177 | rev dwn rabB ext          | TGTTTTCGTCACCATACCTGACC                             |
| MHG_178 | fwBIS sacII-up chsB       | ATATCCGCGGCTTGGTGCTCAATAAGATTGGC                    |
| MHG_179 | Fw up eglC                | TGAAGGGAAGCAGAGGGGATC                               |
| MHG_180 | Rev up eglC               | TGATTAGTCCATTGATTAGTCACG                            |
| MHG_181 | Fw pyrG fus eglC          | CGTGACTAATCAATGGACTAATCAACCGGTTCGCCTCAAACAATGCTC    |
| MHG_182 | Rev pyrG fus eglC         | GTACTACCATACGCCGTCTATCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG      |
| MHG_183 | Fw promotor eglC          | ATAGACGGCGTATGGTAGTAC                               |
| MHG_184 | Rev s.p. eglC             | GGAGACGGCCTCAGCGGAAG                                |
| MHG_185 | Fw fusion gfp             | CTTCCGCTGAGGCCGTCTCCGGAGCTGGTGCAGGCCGCTGGAGCC       |
| MHG_186 | Rev fusion gfp            | CCGGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCTTTGTATAGTTCATCCATGCCATG  |
| MHG_187 | Fw dwn eglC fus           | GAGCTGGTGCAGGCCGCTGGAGCCGGTGCCAAGGGCTTCAACTATGGAGCC |
| MHG_188 | Rev dwn eglC              | AGTCACCAGAGGTGCTGGTG                                |
| MHG_194 | Rev GFPmejorado           | TCACTTGTAGAGCTCGTCCATG                              |
| MHG_195 | Fw fusion GFPmej-pyrG     | CATGGACGAGCTCTACAAGTGAACCGGTTCGCCTCAAACAATGCTC      |
| MHG_196 | Fw 5xGA-eGFP              | GGAGCTGGTGCAGGCCGCTGGAGCCGGTGCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT |
| MHG_197 | Rev eGFP-stop             | CTACTTGTACAGCTCGTCCATG                              |
| MHG_198 | Fw fusion eGFP-pyrG       | CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGACCGGTTCGCCTCAAACAATGCTC |
| MHG_199 | Fw fus wA-pyrG            | GGACTTGACTCTCCTTCTCCTGATCACCGGTTCGCCTCAAACAATGCTC   |
| MHG_200 | Rev fus wA-pyrG           | GAAACGGGAAAGTAAAACCTTATGAGCCTGTCTGAGAGGCACTGATG     |
| MHG_201 | fw AN4274                 | TCTCCGGACTTAATCATCTAAGC                             |
| MHG_202 | rev AN4274                | ACCGGGGATCGAAGACTCATC                               |
| MHG_204 | rev gpda-eglc fus         | GAATCTGGGTCTTGGTGAACATGGTGATGTCTGCTCAAGCGG          |
| MHG_205 | rev2 gpda-eglc fus        | CAATCGACAGAGCGAGGGCGAGAATCTGGGTCTTGTTGAACATGGTG     |
| MHG_206 | Fw2 fus sp-gfp            | AGATTCTCGCCCTCGCTCTGTGCGATTGCTTCCGCTGAGGCCGTCTCC    |

## Material es y Métodos

| Código  | Nombre                    | Secuencia   |
|---------|---------------------------|---|
| MHG_207 | Rev XmaI-EglC             | TATACCCGGGTTAGAGAGCGACCGCGAGGG                          |
| MHG_209 | fw genotip gcs1           | TCCTAGGTGCCGTCTTG CAGC                                  |
| MHG_210 | rev genotip gcs1          | TGTCTAGCCTTACCATATCTATG                                 |
| MHG_213 | Fw NcoI-sucA              | ATATATCCATGGCGCGCGCCCGCAC                               |
| MHG_214 | Rev fus s.p. sucA-ha      | ATCGTATGGGTAAAAGATGCGGCCTGGTGCTGATGG<br>TTGAAGAGCG      |
| MHG_215 | Fw fus s.p. sucA-ha       | TCGCTCTTCAACCATCAGCACCAGGCCGCATCTTTTA<br>CCCATACG       |
| MHG_216 | Rev fus HA-ga5            | CACCGGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCCTGAGCAG<br>CGTAATCTGGAACG  |
| MHG_217 | Fw fus ga5-sucA           | GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCGGCCC<br>AGCTCCTTACACCG   |
| MHG_218 | XmaI Rev sucA             | ATATCCCGGGTCAGTTCCAACAGACCCAACC                         |
| MHG_220 | Fw fus up wA-chsB         | CTTGACTCTCCTTCTCCTGATCCTTGGTGCTCAATAA<br>GATTGGC        |
| MHG_221 | rev 5' coil eglC          | GCCGAGGGAGCCGCGCTGG                                     |
| MHG_222 | Fw fus eglC coil-GFP      | TCTCGGCCACGGCGGCTCCCTCGGCAGCAAGGGCGA<br>GGAGCTCTTC      |
| MHG_223 | rev fus eglc coil-GFP     | TGGCCTCCAGAGAACGAGCCAGAGGACTTGTAGAG<br>CTCGTCCATGCCG    |
| MHG_224 | Fw 3'coil EglC            | TCCTCTGGCTCGTTCTCTGG                                    |
| MHG_225 | rev 3'utr eglC            | CTCAAGCTAAAGTTTCTTTTATTTTCC                             |
| MHG_226 | fw fus eglC-pyrG          | GGAAAATAAAAAGAACTTTAGCTTGAGACCGGTTCG<br>CCTCAAACAATGCTC |
| MHG_227 | rev fus pyrG-down eglC    | CTAGTAATACGAAAATGAGGAGAAGAACGACTGTC<br>TGAGAGGAGGCACTG  |
| MHG_228 | fw down eglC              | TCGTTCTTCTCCTCATTTCGTATTAC                              |
| MHG_229 | rev down eglC             | CATTTTCGCCGACAGTCTGTCC                                  |
| MHG_230 | Fw up eglC                | TTAGGGAGCATATGCTCTGCAG                                  |
| MHG_231 | Fw upstream real chsb     | AAGAATAGGAACAAAGACCGCTAG                                |
| MHG_232 | Rev up chsb               | CGGCCTGGCGGTAATTTAGTTC                                  |
| MHG_233 | Fw fus up chsb-pyrG       | AGAACTAAATTACCGCCAGGCCGACCGGTGCCTCA<br>AACAATGCTCTTCA   |
| MHG_234 | Rev fus pyrG pr. chsB     | AGCCAATCTTATTGAGCACCAAGCTGTCTGAGAGGA<br>GGCACTGATGC     |
| MHG_235 | Fw prom. chsB             | CTTGGTGCTCAATAAGATTGGC                                  |
| MHG_236 | Rev 5'utr chsb            | GGTTAAACTGGTAGTATGTGCG                                  |
| MHG_237 | Fw fus 5'utr chs-GFPm     | ATTCGCACATACTACCAGTTTAACCATGAGCAAGGG<br>CGAGGAGCTCTTC   |
| MHG_238 | Rev fus GFPm-GA           | ACCGGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCCTTGTAGAG<br>CTCGTCCATGCCG   |
| MHG_239 | Fw fus ga-chsb sin atg    | GAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCGCCTACC<br>ACGGCTCTGGTCC   |
| MHG_241 | fw chsB sin atg           | GCCTACCACGGCTCTGGTCC                                    |
| MHG_242 | FwBIS fus ga-chsb sin atg | CAGGCGCTGGAGCCGGTGCCGCCTACCACGGCTCTG<br>GTCC            |
| MHG_244 | Fw up gelE                | TGTA AATATCTAGACGAGTCAGAC                               |
| MHG_245 | Rev up gelE               | TGGATCCCGACCGTGCTGTTC                                   |
| MHG_246 | Fw fus upgelE-pyrG        | GAACAGCACGGTCCGGATCCAACCGGTGCCTCAA<br>ACAATGCTC         |
| MHG_247 | Rev fus pyrG-prom gelE    | GGGCATTGGGTGGTCCGGTCCCTGTCTGAGAGGAGG<br>CACTGATGCG      |
| MHG_248 | Fw prom gelE              | GGAACCGACCACCCAATGCC                                    |
| MHG_249 | rev sp gelE               | GTCGGCCGCCAGGGCGCTG                                     |
| MHG_250 | fw fus sp gelE-gfp        | CAGCGCCCTGGCGGCCGACAGCAAGGGCGAGGAGC<br>TCTTC            |

| Código  | Nombre                    | Secuencia   |
|---------|---------------------------|---|
| MHG_251 | Fw fus GA-gelE            | CAGGCGCTGGAGCCGGTGCCTGCCCTGCCCGTGATTGCCT<br>CCAAG     |
| MHG_252 | rev down gelE             | AAAGTGCACGTAAGTACTGACAGGAG                            |
| MHG_253 | rev 5'coil gelE           | TGTATTAACGTTGCCGGTACCG                                |
| MHG_254 | fw fus coil gelE-GFP      | CGGTACCGGCAACGTTAATACAGGAGCTGGTGCAG<br>GCGCTGGAGCC    |
| MHG_255 | rev fus 3'coil gelE-gfp   | CGCCAACACCGCCGTCGGGCTTGTAGAGCTCGTCCA<br>TGCCG         |
| MHG_256 | Fw 3'coil gelE            | CCCACGCGCGGTGTTGGCG                                   |
| MHG_257 | rev 3'utr gelE            | TACACAGGTAGTAGATAGACATTAG                             |
| MHG_258 | fw fus 3'utr gelE-pyrG    | CTAATGTCTATCTACTACCTGTGTAACCGGTCGCCTC<br>AAACAATGCTC  |
| MHG_259 | rev fus pyrG down gelE    | TTCGCTGCATAGTAGCCATCATACTGTCTGAGAGGA<br>GGCACTGATGCG  |
| MHG_260 | fw down gelE              | TATGATGGCTACTATGCAGCG                                 |
| MHG_261 | rev GAs                   | GGCACCGGCTCCAGCGCC                                    |
| MHG_262 | fw fus 5'utr chsb-mcherry | TCTATTTCGCACATACTACCAGTTAACCATGGTGAG<br>CAAGGGCGAGGAG |
| MHG_267 | rev up sucA               | TTTGGTGATGTGCTGACCCGC                                 |
| MHG_268 | fus up sucA-EglC          | TACGCGCGGTCAGCGACATCACAAAATGTTACCA<br>AGACCCAGATTC    |
| MHG_269 | fw fus coilgelE-HA        | ACGGTACCGGCAACGTTAATACAGGCCGCATCTTTT<br>ACCCATAC      |
| MHG_270 | rev fus HA-gelE           | TCACCGCCAACACCGCCGTCGGGCTGAGCAGCGTAA<br>TCTGGAAC      |
| MHG_271 | Fw Chs5                   | TTGCGCGAAGAGCGCGAGCAGC                                |
| MHG_272 | Rev Chs5                  | ATGCGCGAAGCTCTTTACAATG                                |
| MHG_273 | Fw Chs5                   | AGAACGCGGATTTGATGCAGAG                                |
| MHG_274 | rev up chs5               | TGACGGAAGCACGAATCGACAG                                |
| MHG_275 | fw fus chs5-pyrG          | CTGTGATTTCGTGCTTCCGTCAACCGGTCGCCTCAA<br>ACAATGCTC     |
| MHG_276 | rev fus chs5-pyrG         | CTCGAACGTAGCGCTCAACAGTGTCTGAGAGGAGGC<br>ACTGATGC      |
| MHG_277 | Fw dwn chs5               | ACTGTTGAGCGCTACGTTTCGAG                               |
| MHG_278 | rev dwn chs5              | ACACTCTACGCAGAACCGGAATG                               |
| MHG_280 | fw chsb genotip.          | TTATCCAATTTTGAGCAATGCTCG                              |
| MHG_281 | Fw sucA externo           | GAGTGGAGAAGCCAGCAAGAG                                 |
| MHG_282 | Fw fus up chsB-riboBAf    | GAACTAAATTACCGCCAGGCCGAAGAGGCCGTTCA<br>GGAGTCTGG      |
| MHG_283 | Rev fus riboBAf-prom chsB | GCCAATCTTATTGAGCACCAAGCAGAACGTTTGCGC<br>TGCAGAAC      |
| JFA117  | Δrab7 genot fw            | GAGCTGCGTGCTACGCTCG                                   |
| JFA118  | Δrab7 genot rev           | GACAGTGTCTAAAGCGCGGCAG                                |
| MHG_292 | fw fus final chsb-riboBAf | TTTACTCTAATCCCGTACTGTAAAGAGGCCGTTCA<br>GAGTCTGG       |
| MHG_293 | rev fus riboBAf-pyrGAf    | GCATTGTTGAGGCGACCGGTCAGAACGTTTGCCT<br>GCAGAAC         |
| MHG_294 | rev medio pyrG (a 600pb)  | AGCCGAGCAATGAGGTATATTATC                              |
| MHG_295 | rev ppio ChsB             | AACTGTATCCAGACGTCGGAC                                 |
| MHG_296 | Fw medio ppio ChsB        | CTTGGCAGCTGGAATCGAAAC                                 |
| MHG_297 | Fw chsB para secuenciar   | TTACGCTCGTAGTGAACTTCG                                 |
| MHG_298 | Fw slaB genotip slaB1     | AGAAGGCCTAATGATAACCGTAC                               |
| MHG_299 | Rev slaB genotip slaB1    | CTACAAGCATACAATCAGTAAGG                               |

### 3.4. Manejo de *Escherichia coli*

Se utilizó LB en todos los casos (bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. El pH se ajustó a 7.5 con NaOH. Para solidificar el medio se utilizó agar 1.5% (m/v). Se utilizaron las cepas DH1 (*F- recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44*); DH5α [*F' endA1 hsdR17 supE44 thi1 recA1 gyrA relA1Δ(lacIZYA-argF')*]; XL10-Gold Ultracompetent Cells; y B538 (BL21 con el plásmido pRIL). Para transformar *E. coli* se utilizó el método de Hanahan [178]. Para la selección de transformantes resistentes se añadió ampicilina (100 µg/ml) o cloranfenicol (34 µg/ml), en cada caso. Cuando se seleccionaron colonias sin actividad β-galactosidasa, por integración de un inserto en el plásmido correspondiente, se añadió al medio X-gal (0.131 mM) e IPTG (100 mM).

### 3.5. Manejo de *Aspergillus nidulans*

#### 3.5.1. Cultivo y mantenimiento de cepas

Se utilizó en medio MCA para el mantenimiento de cepas y la obtención de conidiosporas. Como inóculo para cultivos líquidos se recogieron esporas por raspado de la superficie de las colonias con una espátula estéril y se resuspendieron en una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v). Para los experimentos en los que se analizaba la secreción y la glicosilación de InuA las esporas se contaron en una cámara Neubauer, con el fin de realizar un inóculo inicial de  $1.5 \times 10^7$  esporas/mL, concentración final.

#### 3.5.2. Transformación

Se detalla el protocolo, descrito previamente [179]. En todos los casos, se transformó con 600 ng de DNA, si no se indica lo contrario. Se inocularon  $2 \times 10^6$  conidiosporas en 400 ml de MMA líquido con los requerimientos. Se incubó 16 h a 30°C, el micelio se recogió por filtración a través de Miracloth (muselina con un poro de 22-25 µm, Calbiochem 475855) y se lavó con tampón de protoplastos frío (TP: MgSO<sub>4</sub> 1.2M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 5.8).

##### 3.5.2.1. Generación de protoplastos

Se resuspendió 1 g de micelio en 25 ml de TP. Se digirió la pared celular con 350 mg de la mezcla enzimática Vinoflow FCE (Novozymes) a 30°C con agitación durante 1-2 h. Se comprobó la formación de protoplastos por observación al microscopio. A la suspensión de protoplastos, en tubos Falcon, se añadió un volumen (V) de Colchón de flotación (D-Sorbitol 0.6 M; Tris-HCl 0.1 M; pH 7.5) frío y se centrifugó a 4°C, 10 min, a 6000×g. Tras la

centrifugación, los protoplastos formaron una banda en la interfase. Se recogieron y se diluyeron con 2 V de Solución ST (D-Sorbitol 1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7.5). La suspensión se centrifugó a 4°C, 10 min, a 4000×g, se eliminó el sobrenadante y se lavó el “pellet” de protoplastos con 1 ml de Solución ST, mediante resuspensión y centrifugación en minifuga en un tubo eppendorf a 13000 rpm, 1 min. El lavado se repitió dos veces utilizando la solución STC (D-Sorbitol 1M; Tris-HCl 10 mM pH 7.5; CaCl<sub>2</sub> 10 mM). Tras los lavados, se estimó el número de protoplastos con una cámara de Neubauer. Se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en el volumen adecuado de STC para obtener ~5 x 10<sup>7</sup> protoplastos/100 µl.

### 3.5.2.2. Transformación

A 200 µl de esta suspensión se añadieron 600 ng del DNA transformante y 50 µl de una solución de polietilenglicol [SPEG: PEG 6000 (Fluka) 60% (p/v); Tris-HCl 10 mM pH 7.5; CaCl<sub>2</sub> 10 mM]. Se incubó 20 min en hielo. Tras esto, se añadió 1 ml de SPEG a la mezcla y se dejó 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 3 ml de Solución STC, se agregaron 15 ml de *Top agar* [MMA o MCA con sacarosa 1 M y agar 0.4% (p/v), con los requerimientos de la cepa, menos el que se pretende complementar], fundido y atemperado. Finalmente, se extendieron 5 ml de la mezcla en placas de medio de regeneración [MMA o MCA con sacarosa 1 M y agar 1% (p/v), con los requerimientos de la cepa, menos el que se pretende complementar]. Si la complementación era con *pyrG<sup>fum</sup>* se utilizó MCA y MMA si era con otro marcador de selección.

Como control positivo de regeneración de los protoplastos, se plaqueó la misma mezcla sin DNA añadido en medio de regeneración con uracilo/uridina, y como control negativo en medio de regeneración.

### 3.5.3. Extracción de DNA genómico

#### 3.5.3.1. Método rápido, para PCR

Se depositaron conidiosporas en un tubo con 100 µl de *Breaking Buffer* (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) y 150 mg de esferas de vidrio (Ø 0,45-0,65 nm). Se incubó a 70°C, 30 min. Se añadieron 200 µl de Fenol Sevag, se mezcló y se centrifugó a 16110 × g 5 min. Se recogió la fase superior.

#### 3.5.3.2. Método elaborado, para Southern Blot

Se filtró micelio con Miracloth, se congeló en nieve carbónica y se liofilizó. El liofilizado se trituró con una bola de cerámica en un tubo de 2 ml en un molino FP120 Fast Prep

## Materiales y Métodos

---

Cell Disruptor, 10 seg, fuerza 4. Se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 25 mM pH 8, sacarosa 250 mM, EDTA 20 mM. Se añadió SDS hasta una concentración 0.1% (v/v) y se incubó 15 min a 65°C. Se añadió 1 V de fenol Sevag y se mezcló y centrifugó. La fase acuosa se recogió y se precipitó con 0.1 V de acetato sódico 3 M y 0.6 V de isopropanol. Se centrifugó y el pellet se lavó con etanol 80% (v/v). Se resuspendió en agua y se trató con RNasa A. Se volvió a precipitar y lavar y se resuspendió en agua.

### 3.5.4. Extracción de proteína total

Se siguió el protocolo descrito por Hervás *et al.* [157]. Se filtró micelio con Miracloth (muselina con un poro de 22-25  $\mu$ m, Calbiochem 475855), se escurrió, congeló en nieve carbónica y liofilizó. Se pulverizó con una bola de cerámica en un tubo de 2 ml en un molino FP120 Fast Prep Cell Disruptor, 10 seg, fuerza 4. Se resuspendieron 6 mg del micelio con 1 ml de 0.2 M NaOH, 0.2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol. Se precipitaron las proteínas con 75  $\mu$ l de ácido tricloroacético durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugó en microfuga durante 5 min a 14000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se neutralizó con 100  $\mu$ l de Tris 1 M. Se añadieron 200  $\mu$ l de tampón Laemmli [62.5 mM Tris-HCl a pH 6.8, 2% SDS (m/v), 5%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v), 6 M urea y azul de bromofenol 0.05% (m/v)]. Antes de cargarse en un gel de poliacrilamida, el precipitado se resuspendió con vórtex y se incubó a 90°C 2 min, se volvió a mezclar y se centrifugó 1 min a 14000 rpm en microfuga.

### 3.5.5. Cruces entre estirpes de *A. nidulans* por reproducción sexual

Se siguió el protocolo descrito por Todd [152]. Se realizaron inóculos puntuales de ambas estirpes en una placa de MCA de modo que al crecer contactasen. Los parentales tenían distintos requerimientos nutricionales. Una vez favorecida la anastomosis (2-3 días de crecimiento), se cortaron porciones de medio sólido de las zonas donde habían entrado en contacto las colonias, que se traspasaron a placas de MMA selectivo, que permite sólo el crecimiento de los heterocariontes. Las placas se incubaron hasta que se formaron sectores heterocarióticos (2 días). Para favorecer la entrada en ciclo sexual, las placas contenían nitrato de sodio 10 mM como fuente de nitrógeno y se sellaron para generar anaerobiosis. Los cleistotecios se formaron a los 10-15 días de incubación, se recogieron de la placa con un palillo estéril y se rodaron sobre una placa de agar 3% hasta que se desprendieron los restos de la colonia adheridos al cleistotecio, realizándose el proceso con una lupa binocular. Se liberaron las ascosporas rompiendo cada cleistotecio en la pared de un tubo eppendorf con 1 ml de agua estéril, se sembraron 5  $\mu$ l en una placa de MMA selectivo y se cultivaron dos días para comprobar si el cleistotecio era híbrido. Tras identificar un cleistotecio híbrido, se plaquearon

diluciones seriadas y se utilizó una placa con colonias separadas, con el fin de analizar la progenie.

### 3.5.6. Precipitación de proteínas de medio de cultivo

Se recogió 1 ml de medio de cultivo y se le añadió 20  $\mu$ L de lisozima 1 mg/ml y ácido tricloroacético 10% (v/v). Se mezcló y se dejó precipitar 10 min. Se centrifugó a 4°C y 14000 rpm durante 10 min en una centrífuga de mesa. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol:éter 1:1. Se mezcló por inversión y se centrifugó 5 min a 14000 rpm y 4°C. Se volvió a lavar con etanol:éter 1:3 y se centrifugó de nuevo. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y el pellet se dejó secar. Finalmente se añadieron 25  $\mu$ l de tampón Laemli y se calentó a 100°C durante 2 min.

### 3.5.7. Genotipado de cepas transformantes

Todas las cepas obtenidas por transformación se genotiparon por Southern *blot*, excepto tres cepas: la cepa en la que se deletionó *hypB*; la que contiene en el locus *chsB* la casete *riboB<sup>fum</sup>-prom-gfp-chsB*; y la cepa *chs5Δ*. Estas tres cepas fueron genotipadas por PCR con oligonucleótidos externos a las regiones de recombinación homóloga de los casetes. En todos los Southern *blots* se diseñaron sondas que pudiesen detectar tanto el locus silvestre como el locus con el transgén integrado. En todos los casos, la estrategia diseñada permitía detectar en el Southern *blot* posibles integraciones múltiples del transgén.

### 3.5.8. Inducción de la expresión a partir de genes integrados en el locus *inuA*

#### 3.5.8.1. Cultivo en matraz

Este protocolo se siguió tanto en los ensayos de expresión de InuA-HA, como en los realizados con la construcción *inuA::[eglC-gfp-GPIs.p.]*. Se inocularon  $\sim 15 \times 10^6$  esporas/ml en 25 ml de MMA. La cantidad de esporas se estimó con una cámara de Neubauer. Se incubaron en un matraz de 100 ml a 30°C en agitación. Después de 16 h, se filtraron los cultivos con Miracloth, se lavaron con 1 V de MMA con sacarosa 1% en vez de glucosa. El micelio se recogió delicadamente y se introdujo en un matraz nuevo con MMA con sacarosa 1% en vez de glucosa. En los controles de no inducción el medio de lavado y el de los matraces nuevos fue MMA (con glucosa 1%). En las pruebas de inducción con otras fuentes de carbono el medio contenía, en vez de sacarosa, la fuente indicada en cada caso. Una vez transferido el micelio al nuevo matraz, se incubó durante 1.5 h en agitación a la temperatura indicada en cada caso. Para

## Materiales y Métodos

---

las temperaturas de 37°C, 39°C y 42°C se utilizaron baños de agua con agitación, de este modo la temperatura se alcanzaba rápidamente.

### 3.5.8.2. Cultivo para microscopía

Este tipo de inducciones se llevó a cabo con la construcción *inuA::[eglC-gfp-GPIs.p.]*. Después de incubar esporas durante 16 h en WMM (con glucosa 0.1%) a 26°C, el cultivo se atemperó a 28°C, colocando la cámara de incubación en el incubador acoplado al microscopio. Posteriormente, se realizó el cambio de medio a WMM con sacarosa 0.1% en vez de glucosa. En concreto, se retiró el medio original del pocillo y se añadieron 350 µl del nuevo medio, recogiénolo y soltándolo 3 veces con la pipeta para lavar las células, se retiró y se añadió finalmente otro volumen al pocillo. En este momento, en los experimentos de incremento de temperatura, se subió la temperatura de la sala, del incubador y del objetivo del microscopio. También en estos casos, el medio nuevo estaba atemperado a ~30°C.

## 3.6. Técnicas de biología molecular, biología celular y bioquímica

### 3.6.1. Obtención de casetes de transformación mediante PCR de fusión

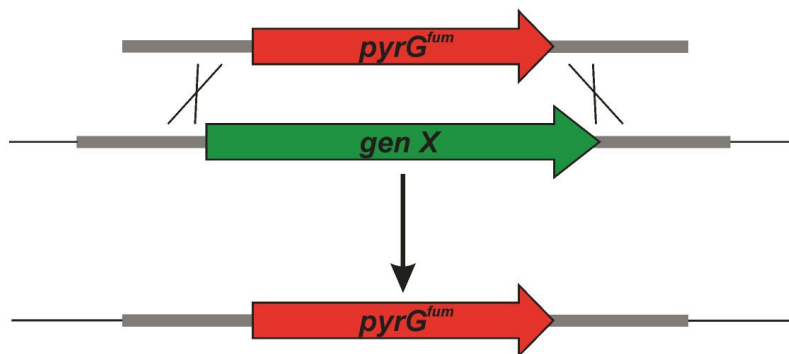
Los casetes de delección utilizados en este trabajo se obtuvieron del *Fungal Genetics Stock Center* [180] cuando estaban disponibles, en caso contrario se construyeron mediante PCR de fusión. Los casetes necesarios para sustituir un gen endógeno por un transgén también se obtuvieron por PCR de fusión, siguiendo el protocolo descrito previamente [181]. Brevemente, se amplificaron los fragmentos de fusión por separado de tal manera que tuviesen las regiones solapantes necesarias para realizar la fusión. A continuación, se utilizaron todos los fragmentos para realizar una reacción de PCR de fusión con los oligonucleótidos más externos del producto de fusión deseado. De este modo, se obtuvo un producto de PCR que consistía en la unión de los fragmentos utilizados.

En el caso de los casetes de delección, éstos comprendían 800 pb aguas arriba del ORF y otros 800 pb aguas abajo, con el gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus* (y su región promotora) entre ambas secuencias, como marcador de selección. De este modo, al transformar *A. nidulans*, el ORF de cada gen y, en algún caso, algunos nucleótidos adyacentes, se sustituyeron por el marcador de selección *pyrG<sup>fum</sup>* (ver esquema en la Figura M.1A).

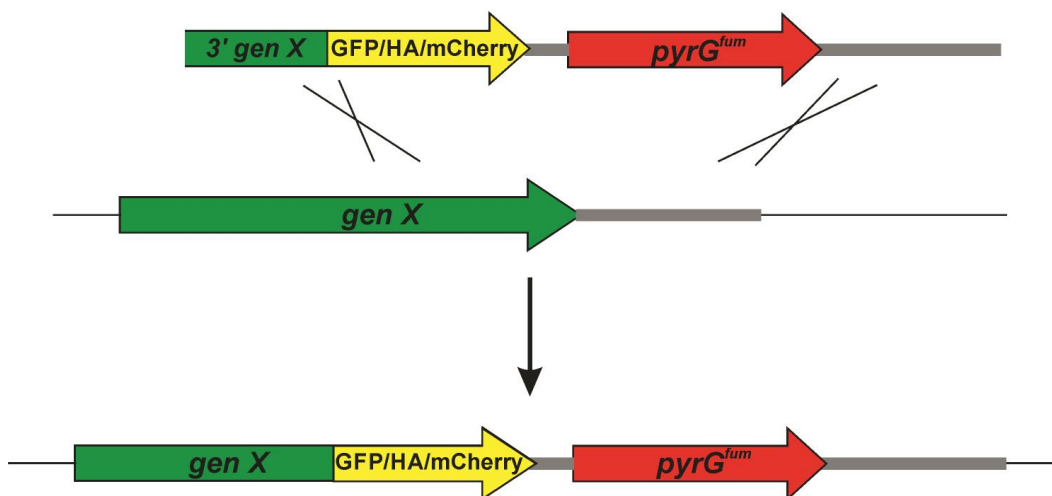
Con el fin de obtener un transgén para expresar ChsB etiquetada en N-terminal se realizó una PCR de fusión de 5 fragmentos como sigue: (1) región 5' complementaria de ~800

pb; (2) marcador de selección *pyrG<sup>fum</sup>* o *riboB<sup>fum</sup>*; (3) región promotora estimada (de 711 pb) y 5'UTR; (4) *GFP* o *mCherry*; y (5) inicio del marco abierto de lectura (~800pb). Para el marcaje en C-terminal de CopA, ChsB o InuA se hizo una PCR de fusión de 5 fragmentos: (1) final del marco abierto de lectura (~800 pb); (2) *HA*, *GFP* o *mCherry*; (3) 3'UTR (excepto en el caso de CopA, en el que este fragmento no se incluyó); (4) *pyrG<sup>fum</sup>*; y (5) región 3' complementaria de ~800 pb. En la Figura M.1B se representa esquemáticamente el proceso de recombinación que ocurre al transformar *A. nidulans* con un fragmento de DNA diseñado para realizar un marcaje en C-terminal. En los casos de la integración de transgenes en el locus *wA* o en el locus *inuA*, para dirigir la recombinación en dichos loci se utilizaron casetes con secuencias 5' y 3' complementarias a las secuencias inmediatamente aguas arriba y aguas abajo del marco abierto de lectura de *wA* o *inuA*, respectivamente. Los casetes de transformación para reemplazar *eglC* y *gelE* con los transgenes de dichos genes que contienen GFP en el “interior” del ORF, se construyeron mediante PCRs de fusión similares. La posición precisa donde se colocó la secuencia de GFP se indica en la sección de Resultados.

### A



### B



**Figura M.1. Representación esquemática de un reemplazamiento génico y de la integración de un transgén en un locus.** Se representa la transformación por recombinación homóloga que se produce entre los casetes generados por PCR de fusión. **A.** Delección de un gen por el marcador de selección *pyrG* de *A. fumigatus*. **B.** Generación de una cepa que expresa una proteína fusionada en C-terminal a GFP, mCherry o HA.

### 3.6.2. Southern-blot

Los DNA aislados y digeridos se corrieron en un gel de agarosa y se rompió el DNA con luz UV durante 5 min. Se incubó el gel en solución desnaturalizante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) 45 min y, después, en solución neutralizante (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 3 M NaCl) dos veces, 20 min. Se lavó con solución  $2 \times$  SSC (3 M NaCl y 300 mM citrato trisódico, pH 7.4) y se transfirió a una membrana de nylon. El DNA se fijó a la membrana con UV, 5 min. La membrana se incubó en solución de Church [1% (m/v) BSA, EDTA 1 mM, tampón fosfato 0.5 M, 7% SDS (m/v)] 2 h y se hibridó con la sonda marcada con  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP (kit *Rediprime II Random Prime Labelling System*) durante 16 h, a 55°C. Se lavó dos veces con 50 ml de  $2 \times$  SSC, 0.1% SDS y dos veces con 50 ml de  $0.2 \times$  SSC, 0.1% SDS. El  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP utilizado tenía una actividad específica de 3000 Ci/mmol (Amersham). A continuación, se utilizó una película *Curix RP2* (AGFA Healthcare) para revelar el resultado del Southern blot.

### 3.6.3. Electroforesis e inmunodetección de proteínas por western-blot

Los extractos proteicos se resolvieron en geles de poliacrilamida con 0.1% SDS, utilizando una cubeta *Mini-Protean Tetra Cell* o *Protean II xi Cell*, ambas de BioRad. Utilizamos una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 29:1. Para separar InuA-HA y EglC-GFP utilizamos un porcentaje de acrilamida del 8%, para el resto de proteínas utilizamos entre 10% y 12% de poliacrilamida. Se utilizaron las condiciones de electroforesis recomendadas por el fabricante. Cuando se requirió, los geles se tiñeron con *Biosafe Coomassie Staining* (Biorad) o se transfirieron utilizando el sistema de transferencia semiseca *Trans-Blot Turbo Transfer System* de BioRad a membranas de nitrocelulosa, utilizando el programa predefinido para proteínas de alto peso molecular. La membranas se bloquearon en PBS con leche desnatada 5% (m/v) 1 h, incubado con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla M.3) en PBS con Tween 0.05% (v/v) leche 1% hasta el día siguiente o durante 2 h. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (Tabla M.3) en PBS Tween 0.05% leche 1% durante 1.5 h. Después cada incubación se lavó 10 min y tres veces con PBS-Tween. Finalmente, se lavó con PBS y se reveló utilizando el sistema *ECL* (GE Pharmaceuticals) o el sistema *Clarity Western ECL* (Biorad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La quimioluminiscencia se detectó por exposición a películas *Curix RP2 Plus* (AGFA HealthCare) o utilizando el sistema *ChemiDoc MP Imaging System* de Biorad.

**Tabla M.3. Anticuerpos utilizados para *western-blot***

| <i>Anticuerpos</i>      | <i>Dilución</i> | <i>Origen</i> | <i>Referencia</i>                                 |
|-------------------------|-----------------|---------------|---|
| <b>Primarios</b>        |                 |               |   |
| $\alpha$ -HA            | 1:1000          | rata          | Roche, 3F10                                       |
| $\alpha$ -Actina        | 1:8000          | ratón         | MP Biomedicals, 69100                             |
| $\alpha$ -SarA          | 1:20 000        | conejo        | Producción propia con Davids Biotechnologie GmbH) |
| $\alpha$ -GFP           | 1:5000          | ratón         | Roche, 11814460001                                |
| <b>Secundarios</b>      |                 |               |   |
| $\alpha$ -IgG de ratón  | 1:8000          | cabra         | Jackson Immunoresearch Laboratories, 115-035-003  |
| $\alpha$ -IgG de conejo | 1:10000         | asno          | GE Healthcare, NA934                              |
| $\alpha$ -IgG de rata   | 1:4000          | cabra         | 3010-05, Southern Biotech                         |

### 3.6.4. Generación de mutantes *sarA*

#### 3.6.4.1. Obtención y clonaje del casete de reemplazamiento génico de *sarA*

El casete de reemplazamiento génico de *sarA* utilizado para la mutagénesis se construyó de la siguiente manera: amplificamos la secuencia codificante de *sarA* flanqueada por 997 pb de la región 5' (que incluye los 89 pb correspondiente a la 5'UTR) y 627 pb de la región 3' (incluyendo los 572 pb de la 3'UTR), utilizando MHG\_16 y MHG\_39. También se amplificó *pyrG<sup>fum</sup>* y 785 de la región 3' flanqueante del locus *sarA*. Se fusionaron los tres fragmentos y la casete resultante se clonó en *pGEM-T easy* (Promega), obteniendo el plásmido p2138. El inserto fue secuenciado completamente. La polimerasa utilizada fue PrimeSTAR HS (Takara) y se siguieron las recomendaciones del fabricante.

#### 3.6.4.2. Generación de una mutateca de *sarA*

Se utilizó el kit GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit (Stratagene, número de catálogo #200552), según el protocolo propuesto por el fabricante. Utilizando como molde p2138 y los oligonucleótidos MHG\_18 y MHG\_19, que flanquean el marco abierto de lectura de *sarA*, se realizó una PCR con la enzima mutagénica del kit. La reacción de PCR se ajustó para obtener 2 mutaciones de media: 10 veces más cantidad de producto que de molde añadido, utilizando 1,2  $\mu$ g de p213 y realizando 23 ciclos de PCR. Se comprobó en gel la proporción entre la cantidad de producto y del plásmido inicial. Se utilizaron 500 ng de este DNA mutagenizado como cebadores para amplificar p2138. Tras la PCR se degradó el plásmido molde por digestión con *DpnI*, obteniendo una población plasmídica con mutaciones en *sarA*.

Se transformaron las células *XL10-Gold*. Se resuspendieron las colonias en LB líquido y fueron cultivadas iniciando el cultivo con una  $DO_{600} = 0.5$  hasta duplicarlo. Se realizó una extracción plasmídica del cultivo total, obteniéndose finalmente la mutateca.

## Materiales y Métodos

---

### 3.6.4.3. Transformación de *A. nidulans*

Una parte de la mutateca se digirió (*SpeI* / *NcoI*) para obtener 600 ng de DNA mutagenizado, con los que se transformó la cepa 1739 de *A. nidulans*.

### 3.6.5. Expresión de SarA en *Escherichia coli*, purificación y obtención de anticuerpos

Se utilizó una librería de cDNA de *A. nidulans*. Para la clonación del cDNA de *sarA* se realizó una PCR (enzima PrimeStarHS, Takara) con los oligonucleótidos MHG\_48 y MHG\_49, que introducen la diana *NcoI* en los extremos, y añaden un triplete de Gly tras la Met iniciadora de SarA. El producto de PCR se digirió con *NcoI* y se purificó (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Se ligó (ligasa T4, Takara) al plásmido comercial pDvi previamente digerido (*NcoI*) y desfosforilado (fosfatasa alcalina, Roche). Se transformaron células DH1, se identificaron colonias con el plásmido recombinante por PCR y se secuenciaron. Se transformaron células BL21, que también contienen el plásmido pRIL (Stratagene), que codifica tRNAs para los codones raros de Arg, Ile y Leu (AGG, AGA, AUA y CUA). Para expresar SarA-10xHis, cultivamos las células en LB Ampicilina (Amp) Cloranfenicol (Cf) a 37°C, en agitación, 16 h. A partir de 2 ml de este cultivo se inoculó un matraz con 500 mL de LB Amp Cf y se cultivó hasta alcanzar un valor de 0.55 de densidad óptica. Se indujo la expresión de SarA-10xHis añadiendo isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido e incubando a 37°C durante 3.5 h. Las células fueron peleteadas. Una décima parte de las células fueron tratadas con 30 ml de buffer de lisis (tampón fosfato 20 mM pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1% Triton X100 (v/v), 70 mM imidazol, 0.2 mg/ml de lisozima, 1  $\mu$ g/ml de DNasa) y homogeneizadas en una French Press. Tras centrifugar el homogeneizado en un rotor Thermo SS34 durante 30 min, a 16000 rpm y 4°C, recogimos el sobrenadante y lo mezclamos con 0.5 ml de Ni-Sepharose 6 FastFlow beads (GE Healthcare). Lo incubamos 30 min a 4°C en agitación. Peleteamos las *beads* y lavamos con PBS 70 mM imidazol y después con PBS 10 mM imidazol. Eluimos SarA-10xHis con PBS EDTA 0.1 M e intercambiamos el buffer a PBS en una columna preempacada de Sephadex G-25 (GE Healthcare). Comprobamos por PAGE-SDS la pureza y concentración de SarA-10xHis y liofilizamos la muestra. Enviamos este liofilizado a Davids Biotechnologie (Regensburg, Alemania) para la obtención de anticuerpos en conejo contra esta proteína de fusión SarA-10xHis.

### 3.6.6. Desglicosilación con PNGasa F

Para la digestión con PNGasa F de la proteína del micelio de una cepa *inuA-HA* se pesaron 3 mg de micelio pulverizado y liofilizado y se mezclaron con 500  $\mu$ l de NaOH 0.2 M,

$\beta$ -mercaptoetanol 0.2% (v/v). Posteriormente esta mezcla se incubó 5 min, se pipeteó en un filtro *Microcon (Regenerated Cellulose YM-30)* y se centrifugó 30 min a  $14000 \times g$  para permitir la elución del tampón y la concentración del material celular en el filtro. El filtro se invirtió para pellear el material celular lisado mediante centrifugación durante 5 min a  $3000 \times g$ . Se resuspendió en 200 ml de Hepes pH 7.2 50 mM, KCl 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM e inhibidores de proteasas (*Complete ULTRA EDTAfree*, Roche) a la concentración recomendada. Se recogieron 36  $\mu$ l de esta solución y se mezclaron con *Glycoprotein Denaturing Buffer 10x (PNGase F kit, New England)* para, posteriormente, incubar 10 min a  $100^{\circ}\text{C}$ . A partir de aquí se siguieron las recomendaciones del fabricante (New England). Para la digestión del medio extracelular, se recogieron 3.2 ml del medio de cultivo utilizado para crecer una cepa *inuA-HA* en sacarosa y se filtró en un filtro *Microcon (Regenerated Cellulose YM-30)*. Finalmente se resuspendió en 180  $\mu$ l del mismo medio de cultivo. Se recogieron 36  $\mu$ l de esta solución y se mezclaron con *Glycoprotein Denaturing Buffer 10x (PNGase F kit, New England)* para, posteriormente, incubar 10 min a  $100^{\circ}\text{C}$ . A partir de aquí se siguieron las recomendaciones del fabricante (New England). Finalmente, las soluciones una vez digeridas se mezclaron con un volumen de tampón Laemli y se analizaron por PAGE-SDS y *western-blot*.

### 3.7. Microscopía de fluorescencia *in vivo*

#### 3.7.1. Especificaciones técnicas

Para todas las observaciones *in vivo*, utilizamos un microscopio invertido Leica DMI6000B con una fuente de luz externa Leica EL6000, que incluye un intercambiador de excitación. Las imágenes se tomaron utilizando un objetivo HCX  $\times 63$ , con una apertura numérica de 1.4 y con una cámara acoplada Hamamatsu ORCA ER-II *cooled-charge*. Se utilizaron los filtros Semrock Brightline GFP-3035B (para GFP), TXRED-4040B (para mCherry, mRFP y FM4-64) y el filtro adecuado para blankophor BA y CMAC (355–425 nm; dicróico 455 nm; emisión, LP 470 nm). Cuando se requirió, usamos un *image splitter* DualView DV2. Las imágenes se analizaron, si no se indica lo contrario, utilizando los programas Metamorph (Molecular Devices) e ImageJ. Cuando se indica, las imágenes fueron sometidas a un tratamiento de deconvolución con el algoritmo CMLE del programa informático *Huygens Professional* o *Autoquant*.

#### 3.7.2. Condiciones de cultivo e incremento de temperatura en mutantes termosensibles

Se inocularon esporas en cámaras de incubación *ibidi  $\mu$ -Slide 8 Well Uncoated Grid-500* (GmbH), con 0.35 ml de medio de cultivo por pocillo. Se incubaron 16-17 horas a  $26^{\circ}\text{C}$  y

## Materiales y Métodos

---

se observaron al microscopio, con una temperatura base de 28°C. La temperatura se controló con un incubador acoplado a la pletina del microscopio y una camisa térmica que envolvía el objetivo HCX × 63, ambos controlados por un equipo *Leica 37-2 digital temperature controller* (Leica Microsystems). Además, la habitación estaba calentada con un calefactor eléctrico. Cuando se utilizaron mutantes termosensibles generalmente la temperatura se incrementó de tal forma que el medio estuviese a 37°C.

### 3.7.3. Utilización de colorantes fluorescentes

Se añadió CMAC (Molecular Probes C2110, Invitrogen; 7-amino-4-clorometil coumarin) a una concentración final de 10 µM. Después de 5 min de incubación, se recogió el medio con CMAC y lavó dos veces con medio sin el fluoróforo, finalmente se añadió un tercer volumen de medio con CMAC. Para el marcaje con Blankophor BA [Bayer AG, [4,4'-bis[(4-anilino-subst.1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilben-2,2'-disulfonic acid]] se utilizó una concentración de 1 µg/ml y se dejó incubar durante un minuto, se retiró el medio con Blankophor BA y se añadió medio nuevo. Para la “carga” con FM4-64 [dibromuro de N-(3-trietilamoniopropil)-4-(*p*-dietilaminofenilhexatrienil) piridinio] se añadió a una concentración final de 1 µM, se incubó 5 minutos y se lavó una vez con medio sin fluoróforo.

### 3.7.4. Utilización de las drogas Latrunculina B y Brefeldina A

Latrunculina B se utilizó a una concentración final de de 0.1 mM y Brefeldina A a 200 µg/ml.

### 3.7.5. Inducción del promotor *niiA*

Para la regulación de la expresión de SlaB, bajo el control del promotor *niiA* (alelo *slaB1* [177]), inoculamos esporas en WMM con diferente fuente de nitrógeno, cultivándolas durante 16-18 horas. Para condiciones permisivas utilizamos nitrato 10 mM y para restrictivas NH<sub>4</sub> 40 mM.

### 3.7.6. Análisis de colocalización: Li y Pearson

Para el cálculo del cociente de Li y el coeficiente de Pearson [182] se utilizaron proyecciones de intensidades máximas de imágenes correspondientes a varios planos en el eje z. Estas imágenes, previo a la proyección máxima, habían sido sometidas a deconvolución con el programa Huygens Professional. El cociente de Li y el coeficiente de Pearson se calcularon con

el plugin JaCoP (*Just another Colocalization Plugin*) de ImageJ, mediante la utilización de regiones rectangulares intracelulares que no contuviesen núcleos.

### 3.7.7. Cuantificaciones con imágenes de microscopía de fluorescencia

En los casos en que se compararon valores absolutos de fluorescencia, las imágenes siempre se adquirieron con la misma cámara, con la misma distancia entre los diferentes planos del eje z y con las mismas condiciones de excitación e iluminación.

#### 3.7.7.1. Intensidad de fluorescencia de CopA en *sarA6*

Para determinar los valores de intensidad de fluorescencia medios de CopA-GFP, obtuvimos proyecciones máximas de cinco planos centrales de 4 células wt y 4 células *sarA6* después de 80 min a 37°C. Posteriormente obtuvimos, con ImageJ, los valores medios de intensidad de los píxeles intracelulares en las primeras 10  $\mu\text{m}$  de cada célula. Los valores obtenidos de las imágenes de células wt los agrupamos e hicimos lo mismo para los datos provenientes de imágenes de la cepa *sarA6*. A continuación, clasificamos los valores de los píxeles en 50 clases dependiendo del valor de intensidad que tenían. Finalmente, representamos el porcentaje de píxeles que se agrupaban en cada una de las clases (intervalos de intensidad) en cada condición (wt o *sarA6*).

#### 3.7.7.2. Cuantificación del área ocupada por cisternas y de la fluorescencia citosólica de células *sarA6* mRFP-PH<sup>OSBP</sup>

Para la cuantificación de la fluorescencia asociada a cisternas o citosólica se utilizaron proyecciones suma de los tres planos medios de una serie de planos en el eje z. Para estimar la superficie ocupada por cisternas del Golgi, dibujamos en cada célula un rectángulo ( $1.5 \times 20 \mu\text{m}$ ) cercano a la región apical, excluyendo de éste el espacio ocupado por los núcleos. Después de sustraer la señal de fondo (i.e. la intensidad de fluorescencia de una región del cultivo sin células), segmentamos las imágenes con Metamorph de tal modo que elegimos un valor de intensidad de mRFP-PH<sup>OSBP</sup> que incluyese a todas las cisternas. De este modo determinamos el porcentaje del área total que estaba ocupado por cisternas, analizando 13 hifas para cada condición (28°C y 37°C). Para cuantificar la fluorescencia citosólica de mRFP-PH<sup>OSBP</sup> antes y después del incremento de temperatura del cultivo a 37°C, dibujamos un polígono de  $10 \mu\text{m}^2$  cubriendo un espacio libre de cisternas de la región apical de las hifas utilizadas para la anterior cuantificación. A continuación determinamos la intensidad media de cada una de estas regiones. Los dos grupos mostraron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) en un análisis no paramétrico de Mann-Whitney.

## Materiales y Métodos

---

### 3.7.7.3. Gradiente ChsB/TGN

Hemos medido la intensidad de fluorescencia producida por GFP-ChsB y mRFP-PH<sup>OSBP</sup> de un total de 60 cisternas del TGN. Estas cisternas son las correspondientes las primeras 10  $\mu\text{m}$  de proyecciones máximas de 6 células diferentes. Para determinar si existe relación entre la variable distancia y las intensidades de GFP-ChsB y mRFP-PH<sup>OSBP</sup>, llevamos a cabo un Análisis de correlación de Pearson, seguido del análisis estadístico correspondiente, denominado *Pearson Product Moment Correlation*.

### 3.7.7.4. Localización relativa ChsB y AbpA

Para determinar la posición relativa de ambas proteínas en la membrana, primero realizamos la proyección máxima de los 5 planos centrales y medimos la variación en fluorescencia media de ChsB a lo largo de  $\sim 8 \mu\text{m}$  de cada hifa de uno de los “laterales” de la membrana (dado que es una proyección, la imagen resultante es bidimensional), es decir trazamos un *linescan* de 4 píxeles de ancho en la superficie celular. Además, medimos la fluorescencia media de AbpA en todo el ancho de la hifa (ya que AbpA se localiza únicamente asociado a la membrana), a lo largo de  $\sim 8 \mu\text{m}$  de cada hifa.

### 3.7.7.5. Vida media de las cisternas del TGN con ChsB

Adquirimos una imagen cada 1 o 2 segundos. A partir de estas “películas”, representamos quimógrafos y medimos la vida media de aquellas cisternas que conseguíamos seguir durante todo su ciclo de aparición/desaparición.

### 3.7.7.6. Relocalización de ChsB en los mutantes *nudA2* y *nudA5*

Para cuantificar el cambio en localización de ChsB en estos mutantes, primero realizamos proyecciones máximas de los 4 planos centrales en el eje z y medimos la fluorescencia máxima de ChsB a lo largo del eje longitudinal la hifa. Para ello, trazamos *linescans* de  $\sim 7 \mu\text{m}$  de longitud, que tuviesen el ancho de la hifa y representamos las fluorescencias máximas.

## 3.8. Herramientas informáticas

Para la búsqueda de secuencias se utilizaron las bases de datos del Broad Institute, del NCBI y la *Aspergillus Genome DataBase*. El diseño y el análisis de los transgenes y plásmidos se realizaron con el programa Vector NTI (Invitrogen). Los alineamientos de secuencia se realizaron con ClustalW, si no se indica lo contrario, y se visualizaron mediante la herramienta

*EScript 3.0* [183] o el programa GeneDoc. Para la representación gráfica y el análisis descriptivo o estadístico de datos se utilizó *Excel 2010* y *SigmaPlot 11.0*.

### 3.9 Reactivos, enzimas y kits comerciales de biología molecular utilizados

#### 3.9.1. Kits

Los siguientes kits, que no han sido nombrados previamente, se utilizaron siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes son los siguientes:

**QIAquick® PCR Purification Kit** (Qiagen): se utilizó para la purificación de productos de PCR.

**QIAquick® Gel Extraction Kit** (Qiagen): para la purificación de fragmentos de DNA procedentes de electroforesis en geles de agarosa.

**QIAprep® Spin Miniprep Kit** (Qiagen): para la extraer de plásmidos de *E. coli* con alto grado de pureza y concentración.

**Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit** (GE Healthcare): se utilizó para la purificación de fragmentos de DNA procedentes de PCR o de electroforesis en geles de agarosa.

**pGEM T-Easy Vector System** (Promega): Se utilizó para la clonación de productos de PCR.

**Rediprime™ II Random Prime Labelling System** (GE Healthcare): para el marcaje de fragmentos de DNA con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP.

**ProbeQuant™ G-50 Micro Columns** (GE Healthcare): se utilizó para la limpieza de las sondas de DNA marcadas radiactivamente.

#### 3.9.2. Reactivos y enzimas de biología molecular

Se detallan la procedencia de los reactivos y enzimas utilizados de manera general en el laboratorio. Los reactivos químicos utilizados y los suplementos de los medios de cultivo fueron generalmente de las marcas Sigma, Fluka y Merck. Los componentes de origen microbiológico de los medios de cultivo utilizados fueron suministrados por Difco Laboratories y Pronadisa. La calidad de los productos empleados fue siempre calidad analítica. Las enzimas de restricción utilizadas procedían de New England Biolabs, Roche y Takara. Los reactivos empleados en las reacciones de PCR (Prime Star® HS DNA polymerase) y la DNA Ligasa del fago T4 fueron suministrados por Takara.



# **RESULTADOS**



# Capítulo I

## 4.1. Capítulo I. Bloqueo condicional del tráfico COPII

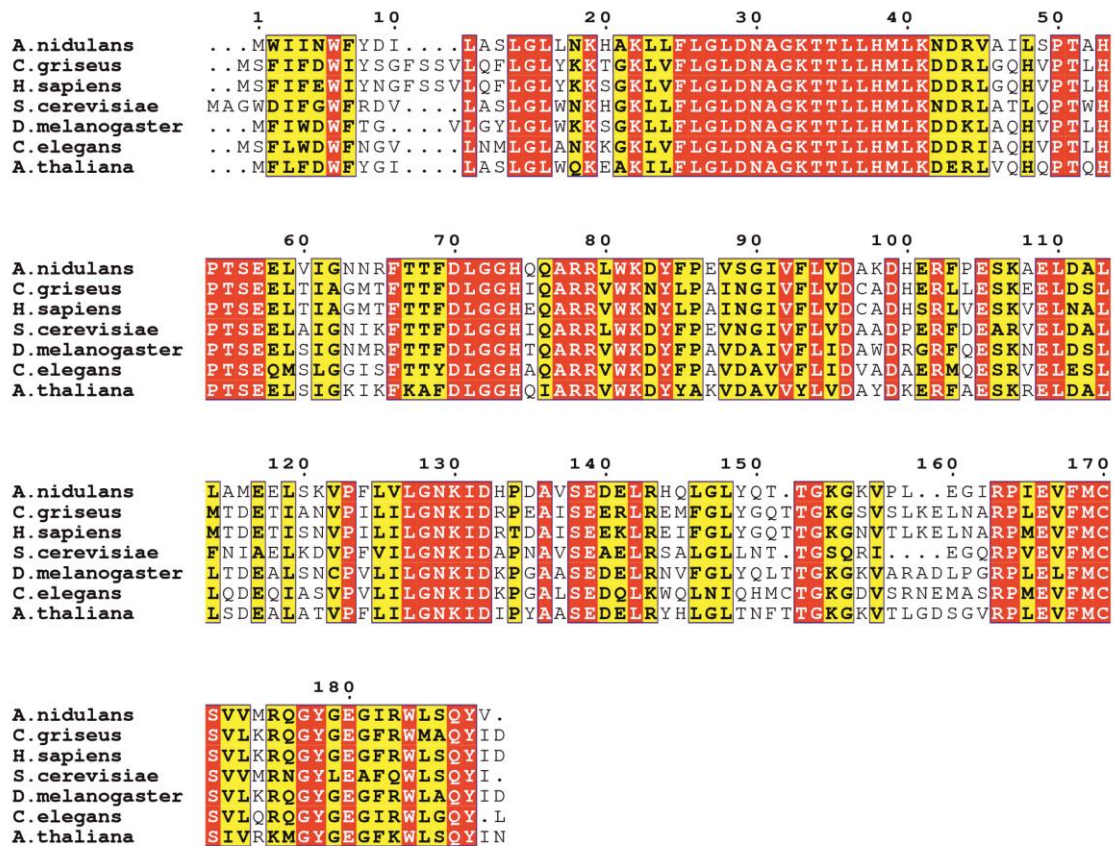
La salida de membrana y proteínas desde el retículo endoplasmático (RE) en vesículas COPII es uno de los procesos mejor conocidos del tráfico intracelular de eucariotas [50, 184]. La biogénesis de las vesículas COPII está regulada por la proteína Sar1, conservada en todos los eucariotas (Figura R.1). Una forma posible de bloquear la salida de vesículas del RE en *Aspergillus nidulans* era mediante la manipulación genética del ortólogo de Sar1. Sin embargo, el posible papel esencial de esta proteína obligaba a la utilización de mutantes condicionales, no existentes al comenzar este trabajo. En esta parte de la tesis, nos propusimos obtener mutantes termosensibles de *sarA*, el ortólogo de Sar1, y determinar el efecto que tiene el bloqueo de la salida del RE en la organización del aparato de Golgi.

### 4.1.1. Localización del homólogo de *sar1* en el genoma de *A. nidulans*

*A. nidulans* tiene un único homólogo de *sar1*, que se denomina *sarA* (AN0411) [185]. Mediante alineamientos de las secuencias de aminoácidos calculamos una identidad del 73% con *SAR1* de *S. cerevisiae* y del 65% con *SAR1a* de *Homo sapiens*. En todos los eucariotas (metazoos, plantas, hongos) existe un alto grado de conservación de Sar1 (Figura R.1).

### 4.1.2. *sarA* es un gen esencial

Dado que en *S. cerevisiae* *SAR1* es un gen esencial [186] y que Sar1 es fundamental en la ruta secretora esperábamos que *sarA* tuviese también una función esencial. Para verificar esta predicción, mediante la técnica de rescate de heterocariontes [187], reemplazamos por transformación la secuencia codificante de *sarA* por el gen *pyrG*, de *A. fumigatus* (*pyrG<sup>fum</sup>*) [181], que complementa la auxotrofia para pirimidinas que la cepa transformada tenía, por poseer la mutación *pyrG89*. En esta cepa el gen *nkuA* estaba delecionado (*nkuAΔ::bar*) para prevenir la recombinación no homóloga. Únicamente obtuvimos transformantes diploides o heterocariontes, según el genotipado de las cepas mediante Southern-*blot* y PCR (véase el capítulo II, donde se reúnen las deleciones de todas las GTPasas de la familia Arf / Sar). Las colonias heterocariontes darían lugar a dos tipos de conidiosporas: transformantes (*sarAΔ::pyrG<sup>fum</sup>*) y no transformantes (*pyrG89; sarA*). Comprobamos que las esporas procedentes de las colonias heterocariontes eran incapaces de crecer en medio sin pirimidinas (capítulo II), lo que indica que *sarA* es un gen esencial.



**Figura R.1. Alineamiento de la familia Sar1.** Alineamiento múltiple de secuencia mediante ClustalW. El color rojo indica residuo invariable y el amarillo similitud de secuencia con un umbral de 0.15 usando la matriz BLOSUM62. Nombre de especie y números de identificación de GenBank: *Aspergillus nidulans*: 74598992, *Cricetulus griseus*: 55976614, *Homo sapiens*: 8926205, *Saccharomyces cerevisiae*: 1370452, *Drosophila melanogaster*: 24648946, *Caenorhabditis elegans*: 373220385; *Arabidopsis thaliana*: 15223516.

Para comprobar en qué fase de la transición morfogénica de conidio a hifa se detiene el crecimiento en ausencia de *sarA*, incubamos esporas de las colonias heterocariontes en medio sin pirimidinas. De las 300 esporas observadas ninguna fue capaz de emitir tubo germinativo (datos no mostrados). Esto indica que *sarA* se requiere para el establecimiento de polaridad.

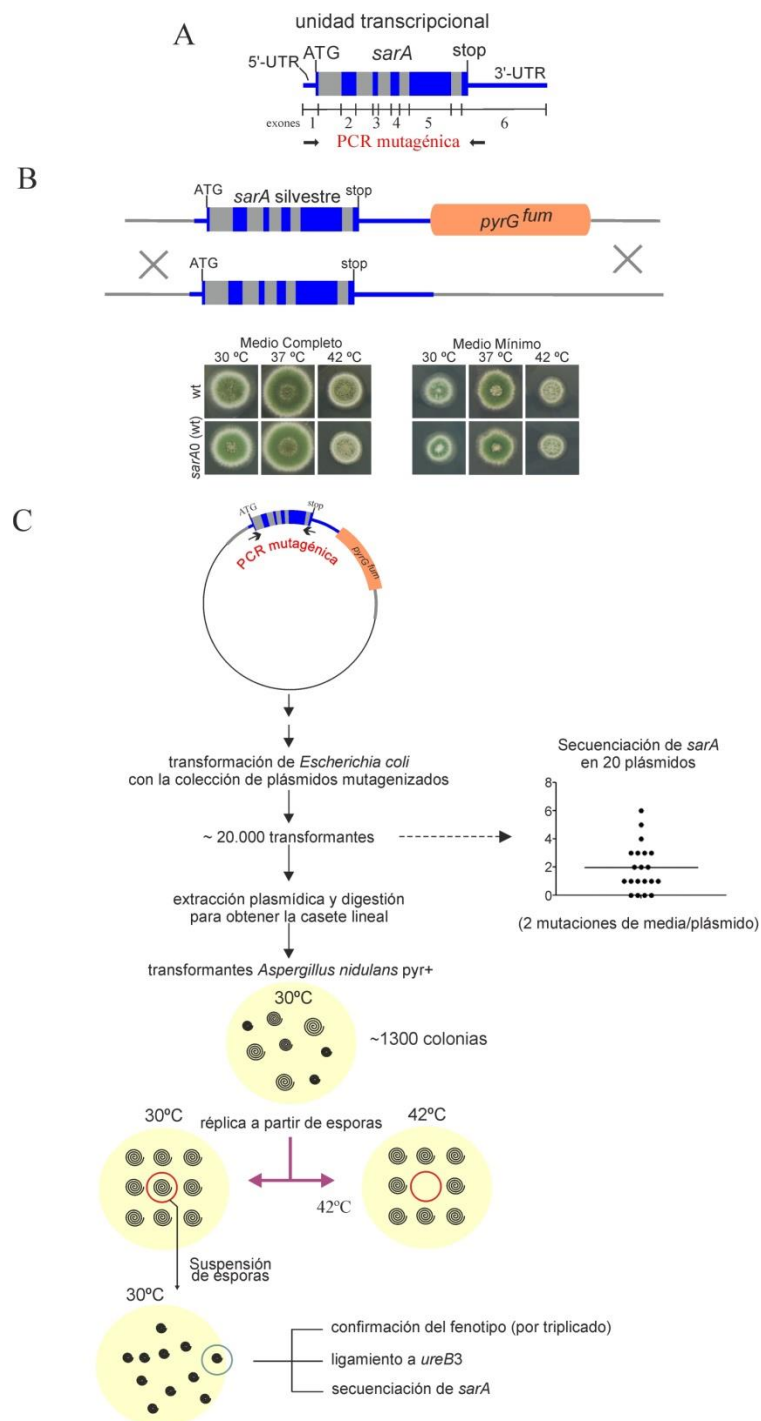
**4.1.3. Diseño del método de generación de mutantes termosensibles**

Nuestro objetivo era buscar mutaciones en *sarA* que (a) causasen termosensibilidad y (b) permitiesen realizar estudios estructura-función. Las mutaciones se obtuvieron por PCR mutagénica. El método elegido requiere la clonación del gen en un plásmido que replique en *E. coli* (Figura R.2). Tras ello, se amplifica por PCR el gen clonado con una polimerasa con alta tasa de error. Ambas hebras del producto obtenido se usan como cebadores para amplificar el plásmido completo en una reacción posterior, generando así plásmidos recombinantes mutagenizados al azar en el gen diana. Con la población de plásmidos se transforma *E. coli* y se

hace una extracción de la población de plásmidos, que constituye la mutateca. En primer lugar, el gen *sarA* es pequeño. Su región codificante, intrones inclusive, es de 1086 pb; por lo cual su clonación en un vector es trivial. Por tanto, el factor limitante del método arriba explicado es la obtención de un número suficiente de clones transformantes de *E. coli* con los plásmidos mutagenizados que constituya una mutateca representativa; sin embargo, el número de clones necesarios para obtener tal mutateca en el caso de un gen tan pequeño como *sarA* es relativamente bajo. Como consecuencia, este método de mutagénesis era idóneo para generar una mutateca de la secuencia completa de *sarA*. Para la obtención de los mutantes deseados, la frecuencia de mutación idónea que permitiría realizar estudios de estructura-función, sería aquella que causase una única mutación de cambio de sentido por gen. El número de mutaciones para conseguir este objetivo se ve influido por la degeneración del código genético (1-2 mutaciones necesarias para obtener una mutación de cambio de sentido), y por la presencia de intrones. SarA posee 5 intrones, que cubren un 49.6% de su región codificante. Por tanto, decidimos introducir ~2 mutaciones por gen.

#### 4.1.4. Construcción de la mutateca de *sarA* en *Escherichia coli*

Utilizamos una casete que contiene el gen *sarA* silvestre, con su región 3'UTR completa y, aguas abajo, el marcador de selección *pyrG<sup>fum</sup>* (Figura R.2A-B). Para comprobar que la disposición del marcador de selección en una posición adyacente a *sarA* no afectaba a la función del gen, se transformó con dicha casete una cepa *nkuAΔ pyrG89*. Los transformantes se genotiparon mediante *Southern-blot* para comprobar la correcta integración y la ausencia de eventos de recombinación ectópicos. Se comprobó que estos transformantes eran indistinguibles, en cuanto a su crecimiento, de una cepa silvestre a 30°C, 37°C y 42°C, tanto en medio completo como en medio mínimo (Figura R.2B). Esto demostró que las manipulaciones genéticas necesarias para el reemplazamiento de *sarA* no provocan una pérdida detectable de función del gen. Denominamos a este alelo “pseudosilvestre”, que contiene el marcador de selección *pyrG<sup>fum</sup>* adyacente a *sarA*, *sarA0*. Clonamos en un plásmido la casete arriba detallada y generamos plásmidos mutagenizados en *sarA*, mediante PCR mutagénica (ver Materiales y Métodos y la Figura R.2C). Transformamos *E. coli*, obteniendo alrededor de 20.000 colonias. Para determinar el número medio de mutaciones introducidas y su distribución estadística secuenciamos el gen *sarA* del plásmido de 20 transformantes (Figura R.2C). El número de mutaciones por clon se ajustó a una distribución normal (test D'Agostino-Pearson), y su media se ajustó a 2 (Figura R.2C). Por tanto, el número medio de mutaciones por gen es el que se había decidido en el diseño experimental, por lo que consideramos que el ajuste de las condiciones de PCR mutagénica fue el correcto.



**Figura R.2. Mutagénesis de *sarA*.** **A.** Estructura del gen *sarA* que muestra, a escala, los exones (azul) y los intrones (gris). Las flechas indican la región sometida a PCR mutagénica, que abarca, casi totalmente, desde el primer codón hasta el último. **B.** Arriba, esquema del reemplazamiento génico. Específicamente, la casete consiste en 997 pb aguas arriba del codón de iniciación, seguido por la región codificante, el 3'UTR completo (572 pb) y 55 nucleótidos adicionales, para facilitar la terminación de la transcripción. Este fragmento genómico está fusionado al marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus fumigatus* y, para la integración por recombinación homóloga, seguido de 785 pb del DNA flanqueante a AN0411 (*sarA*). Abajo, se muestra en un test de crecimiento que la cepa silvestre que porta el alelo natural de *sarA* y la cepa con el reemplazamiento génico de la casete mostrada arriba (alelo denominado *sarA0*) no presentan diferencias detectables de crecimiento, ni en medio mínimo ni en completo. **C.** Esquema del proceso de mutagénesis, transformación de *A. nidulans* y selección de mutantes termosensibles.

### 4.1.5. Selección y caracterización de 8 alelos termosensibles de *sarA*

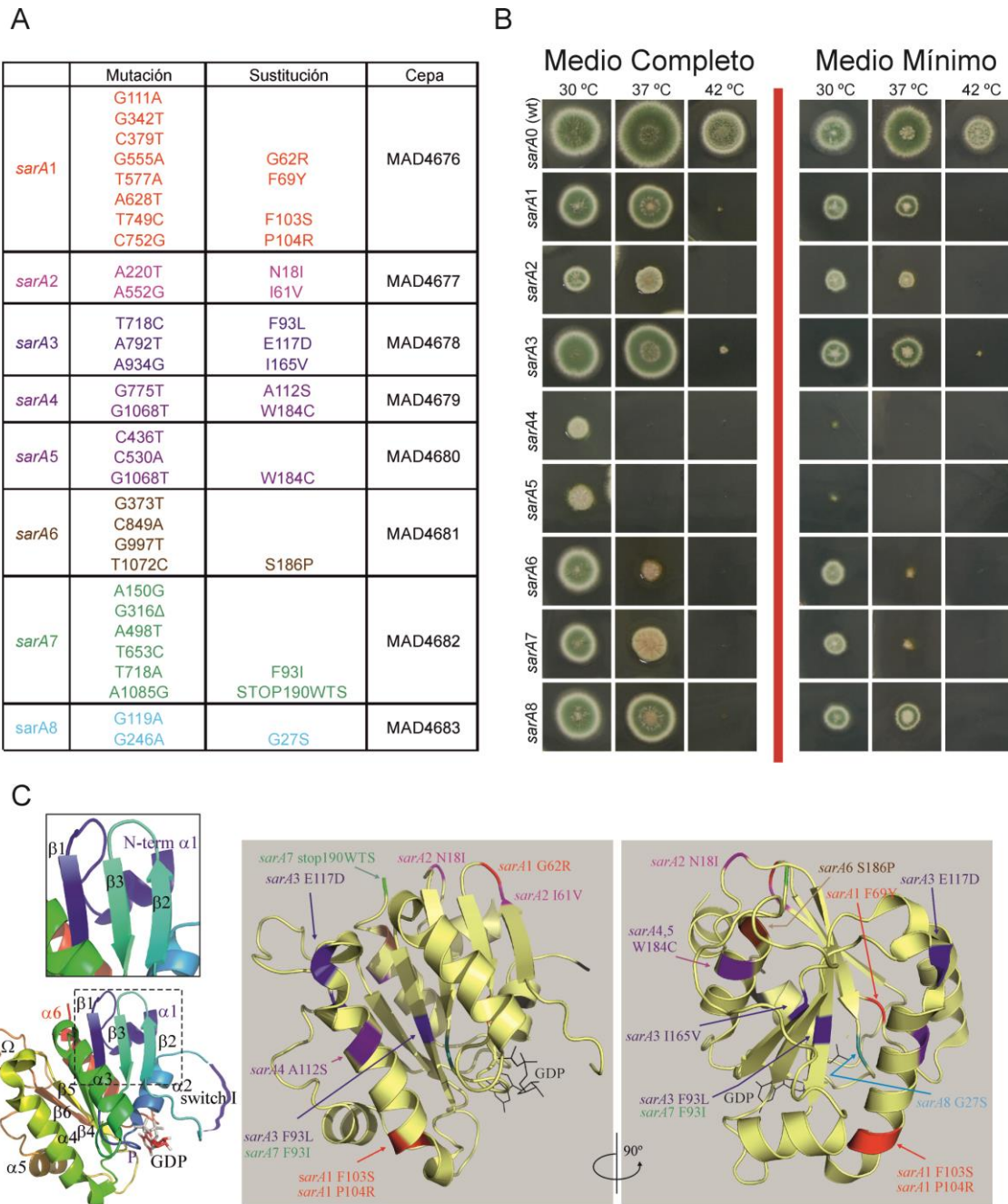
Mediante transformación de *A. nidulans* con la mutateca obtuvimos una colección de transformantes portadores de alelos *sarA* mutados. Replicamos un total de ~1300 transformantes primarios en medio mínimo a 30°C y 42°C (Figura R.2C) e identificamos ocho transformantes que crecían a 30°C pero que eran incapaces de crecer a 42°C. Purificamos estos transformantes mediante aislamiento de colonias, tras plaquear una suspensión de conidiosporas en medio completo sin pirimidinas. Además comprobamos por triplicado en cada caso la termosensibilidad de estas colonias aisladas (Figura R.2C). La secuenciación de *sarA* en las ocho cepas seleccionadas mostró que todas contenían mutaciones de cambio de sentido en *sarA*. Denominamos a estos nuevos alelos *sarA1-sarA8*. De los 8 alelos diferentes, 5 tenían más de una mutación de cambio de sentido, mientras que los tres restantes contenían una única mutación de este tipo (Figura R.3A). Además, la mayoría de ellos contenía al menos una mutación silenciosa (Figura R.3A).

Mediante un test de crecimiento a 30°C, 37°C y 42°C (Figura R.3B), tanto en medio mínimo como completo, comprobamos que existían diferentes grados de termosensibilidad: i) crecimiento silvestre a 30°C y 37°C y ausencia de crecimiento a 42°C (*sarA1*, *sarA3* y *sarA8*); ii) crecimiento silvestre a 30°C, crecimiento deficiente a 37°C y ausencia de crecimiento a 42°C (*sarA2*, *sarA6* y *sarA7*); iii) crecimiento deficiente a 30°C y ausencia de crecimiento a 37°C y 42°C (*sarA4* y *sarA5*).

### 4.1.6. La termosensibilidad de los transformantes estaba genéticamente ligada a *sarA*

El locus *ureB* se encuentra a 64 kb de *sarA* en dirección hacia el centrómero del cromosoma VIII y codifica la única ureasa de *A. nidulans* [188]. La distancia genética entre *ureB* y el locus *ureA* situado a 30 kb centrómero distal es de 0,5 cM [188]. Esto indica, aun teniendo en cuenta que la distancia física no correlaciona totalmente con la distancia genética, que el gen *sarA* debiera estar fuertemente ligado a *ureB*. La mutación *ureB3* impide el crecimiento con urea como fuente de nitrógeno. Para averiguar si la termosensibilidad de los transformantes seleccionados es debida a las mutaciones detectadas en *sarA*, cruzamos cada mutante termosensible con una cepa *ureB3*. Los mutantes *sarA4* y *sarA5* no cruzaron. Confirmamos que la termosensibilidad de los restantes mutantes es debida a una mutación en un único gen, ya que alrededor del 50% de la descendencia de cada cruce fue termosensible. Mediante crecimiento a 42°C o con urea como fuente de nitrógeno confirmamos que *ureB3* y la termosensibilidad se encontraban en repulsión y determinamos una frecuencia de recombinación (dobles mutantes *ts ureB3* o *no-ts ureB<sup>+</sup>*) similar para todos los cruces (alrededor de 10 cM), lo que concuerda con la disposición cromosómica de *sarA* y *ureB* y las distancias genéticas conocidas de la zona. Por tanto la termosensibilidad de los mutantes está genéticamente ligada a

*sarA*, lo que descartó la posibilidad de que se debiera a mutaciones no relacionadas con los alelos *sarA*, que se hubiesen generado espontáneamente durante la transformación.



**Figura R.3. Mutantes termosensibles de *sarA*.** **A.** Caracterización molecular de los alelos *sarA*. La posición en el DNA es relativa al primer nucleótido del codón de iniciación. **B.** Test de crecimiento de las cepas mutantes en *sarA*. **C.** A la izquierda, estructura 3D de Sar1 de hámster con la nomenclatura de la estructura secundaria (pdb 1F6B). La región punteada está aumentada para facilitar la visualización de la inserción de la hélice N-terminal. A la derecha, los aminoácidos sustituidos mapeados en la estructura de Sar1 de hámster. Las sustituciones para cada alelo, y los residuos involucrados están en el mismo color que en A. Los números corresponden a los residuos en *A. nidulans*. Nótese que tanto *sarA4* y como *sarA5*, que comparten la sustitución W184C, están de color morado.

### 4.1.7. Los niveles de SarA no están alterados en la estirpe control *sarA0*

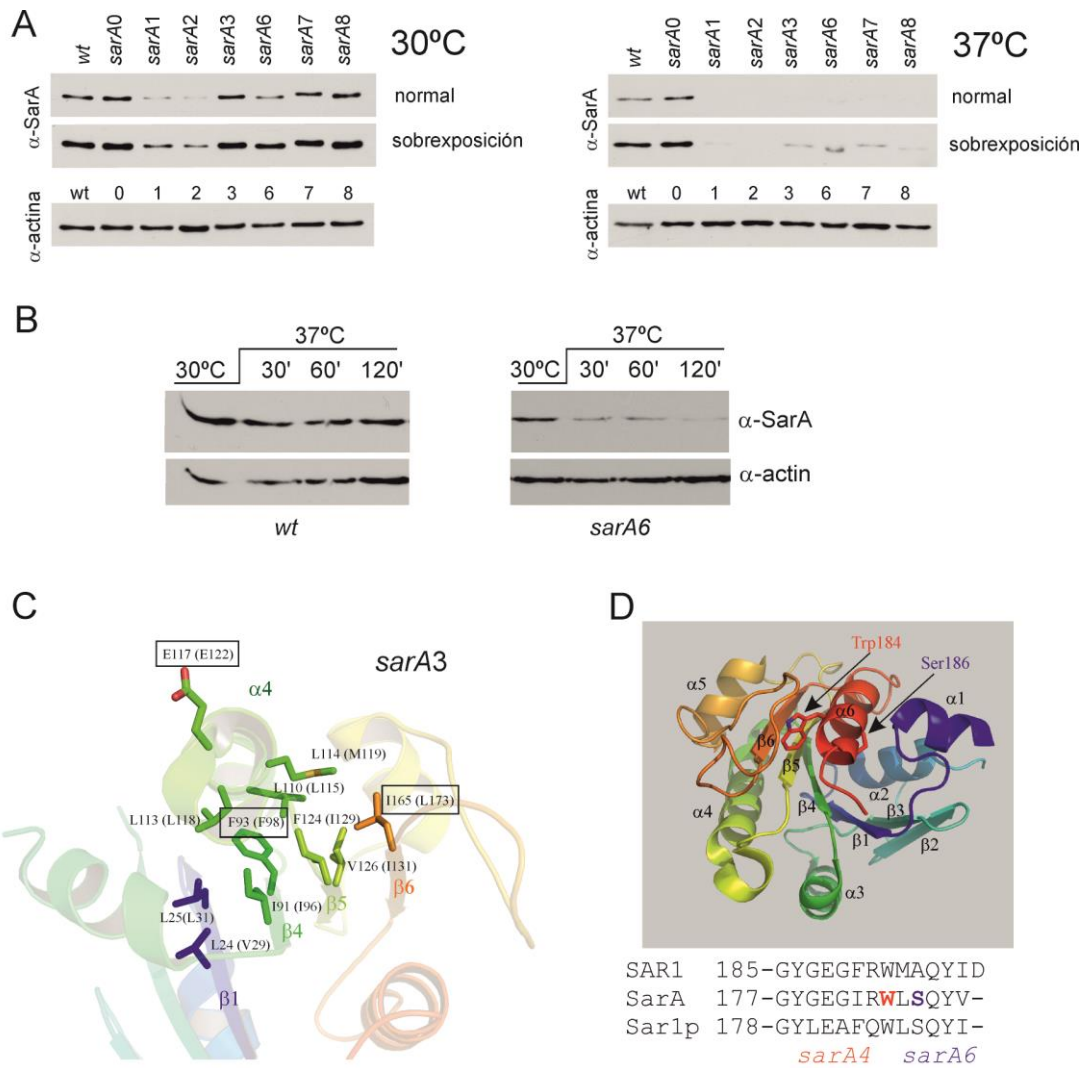
Con el objetivo de analizar SarA por *western-blot*, obtuvimos un anticuerpo policlonal. Para ello, expresamos SarA marcada con 10 histidinas (SarA-10xHis) en *E. coli* y la purificamos incubando un extracto soluble con una resina de sepharosa-níquel (ver Materiales y Métodos). Una vez purificada, utilizamos SarA-10xHis como antígeno y obtuvimos antisuero de conejo, inmunorreactivo en *western-blot* contra SarA.

Para determinar los niveles de SarA en una cepa wt y otra *sarA0*, las cultivamos a 30°C y 37°C. Extrajimos la proteína total mediante lisis alcalina directa del micelio, para reducir la posibilidad de proteólisis. Este método requiere congelar y liofilizar el micelio para, posteriormente, lisar las células con un tampón alcalino. Posteriormente, se realiza una precipitación con ácido tricloroacético y se resuspende el pellet con tampón Laemli (ver Materiales y Métodos).

Mediante *western-blot*, comprobamos que los niveles de SarA en nuestro control “pseudosilvestre” *sarA0* eran los mismos a los de una cepa silvestre, independientemente de la temperatura de cultivo (Figura R.4A). Esto confirma que el reemplazamiento génico de *sarA* con la casete *sarA-pyrG<sup>flum</sup>* no afecta a la expresión de SarA, lo que demuestra la validez del método de reemplazamiento génico.

### 4.1.8. Los niveles de SarA de los mutantes *sarA*-ts disminuyen con el aumento de la temperatura

Una vez comprobado que el reemplazamiento génico empleado no afectaba a los niveles SarA, estudiamos el efecto de las distintas mutaciones. Del mismo modo que en el apartado anterior, cultivamos los mutantes termosensibles a 30°C y 37°C (no utilizamos *sarA4* y *sarA5* dado su fuerte defecto de crecimiento). Como se aprecia en la Figura R.4A, los niveles de SarA a 30°C en *sarA1*, *sarA2* y *sarA6* (Figura R.4B) eran menores a los de la cepa silvestre. Esto indica en estos mutantes que el plegamiento de SarA está afectado incluso a temperatura permisiva. Por otro lado, *sarA3*, *sarA7* y *sarA8* no causaron una reducción de los niveles de SarA a 30°C. Sin embargo, a 37°C, los niveles de SarA fueron notablemente menores en todos los mutantes termosensibles estudiados (Figura R.4A). Estos resultados sugieren que las cepas termosensibles obtenidas expresan variantes mutantes de SarA que, a temperatura restrictiva, pierden su conformación nativa y son degradadas por los sistemas de control de calidad. Concluimos que, al menos varios de los mutantes obtenidos, eran una herramienta genética excelente para bloquear de manera reversible, rápida y específica el transporte de proteínas y lípidos desde el RE al Golgi y así estudiar la biogénesis y el funcionamiento de este último.



**Figura R.4. Niveles de SarA a 30°C y 37°C y análisis in silico de *sarA3*, *sarA4* y *sarA6*.** **A.** Extractos de proteína total, obtenidos mediante lisis alcalina, de las cepas con los alelos indicados, obtenidos de cultivos crecidos en medio mínimo a 30°C o 37°C, analizados mediante *western-blot*. Se utilizaron anticuerpos específicos contra SarA. El cambio de movilidad de la banda correspondiente a SarA7 (SarA se alarga en 3 aminoácidos) confirma la especificidad de la inmunodetección. **B.** Western blot de wt y *sarA6* similar a A, realizando un cambio de temperatura de 30 a 37°C durante el tiempo indicado en cada caso. **C.** *sarA3* provoca tres sustituciones, involucrando los residuos recuadrados. El diagrama muestra la red hidrofóbica que incluye la fenilalanina 93 y la isoleucina 165, afectadas por *sarA3*, con su equivalencia en hámster entre paréntesis. El código de colores corresponde al mostrado en la Figura R.3C. **D.** Se muestran las posiciones de las sustituciones causadas por *sarA4* y *sarA6*, localizadas en la  $\alpha$ -hélice C-terminal. El alineamiento corresponde a hámster, *A. nidulans* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

#### 4.1.9. Análisis de las sustituciones resultantes de las mutaciones de *sarA1-sarA8* en el contexto de la estructura de la proteína

La proteína Sar1 de hámster, ortóloga de SarA, está cristalizada [189] y su secuencia es muy similar a la de SarA (Figura R.1). Por lo tanto, estudiamos las sustituciones aminoacídicas sobre su estructura tridimensional. Recuérdese que las GTPasas de la familia Arf / Sar se activan mediante la unión de GTP y la consecuente inserción de su  $\alpha$ -hélice N-terminal

## Capítulo I

---

anfipática en la membrana donde actúan. Cuando están unidas a GDP, la  $\alpha$ -hélice N-terminal se encuentra en un bolsillo cerrado por el bucle que conecta las  $\beta$ -láminas 2 y 3 (para detalle de esta región, ver Figura R.3C). La unión de GTP por intercambio con GDP provoca que estas  $\beta$ -láminas se desplacen. Este desplazamiento cambia la posición del bucle y permite que la hélice N-terminal se extienda hacia fuera de la estructura.

Tanto *sarA1* como *sarA2* probablemente provoquen un defecto general en el plegamiento de SarA, ya que causan una notable reducción de los niveles de dicha proteína incluso a 30°C (Figura R.4A). *sarA2* es un mutante hipomorfo que crece menos que una cepa silvestre a 30°C y 37°C y no crece a 42°C (Figura R.3B). *sarA2* causa las sustituciones Asn18Ile e Ile61Val en SarA. Ile61 se encuentra en el bucle entre las láminas  $\beta$ -2 y  $\beta$ -3, que participan en el broche que sujeta la  $\alpha$ -hélice N-terminal. Por otro lado, la sustitución Asn18Ile alteraría la posición del bucle que conecta dicha  $\alpha$ -hélice N-terminal con la primera  $\beta$ -lámina. Posiblemente, la combinación de ambas sustituciones altere la correcta disposición de la  $\alpha$ -hélice N-terminal. Una de las sustituciones causadas por *sarA1*, Gly62Arg, también afecta al bucle  $\beta$ -2  $\rightarrow$   $\beta$ -3, posiblemente alterando el adecuado funcionamiento del mecanismo de plegamiento / extensión de la hélice  $\alpha$ -1.

Las sustituciones resultantes de *sarA3* impiden el crecimiento a 42°C, aunque permiten un crecimiento esencialmente silvestre a 30°C y 37°C. Sin embargo, los niveles de SarA están muy reducidos ya a 37°C (Figura R.4A). Las tres sustituciones Phe93Leu, Asp117Glu e Ile165Val son conservativas. Asp117Glu afecta a un residuo orientado hacia el disolvente. Por su parte, Phe93Leu e Ile165Val podrían debilitar los contactos hidrofóbicos entre la  $\alpha$ -hélice 4 y la  $\beta$ -lámina central (Figura R.4C).

Las mutaciones *sarA4* y *sarA5* afectan al crecimiento incluso a 30°C y no forman colonias a 37°C ni a 42°C. Son fenotípicamente indistinguibles entre sí. *sarA4* provoca una doble sustitución Ala112Ser, Trp184Cys, mientras que *sarA5* codifica una proteína SarA mutante con una única sustitución, Trp184Cys. Por lo tanto, el defecto de crecimiento provocado por *sarA4* y *sarA5* es debido a la sustitución Trp184Cys. El residuo Trp184 está conservado en todos los ortólogos de Sar1 que han sido caracterizados, incluido el de hámster (Figura R.1) y se localiza en la  $\alpha$ -hélice C-terminal, que cubre la  $\beta$ -lámina central, que es hidrofóbica (Figura R.4D).

*sarA6* provoca la sustitución Ser186Pro, que también afecta a la  $\alpha$ -hélice C-terminal (Figura R.4D). Esta sustitución Ser186Pro interrumpiría la  $\alpha$ -hélice, lo que presumiblemente afectaría al plegamiento. De hecho, los niveles de SarA en *sarA6* disminuyen con el aumento de la temperatura (Figura R.4A). Podemos, por tanto, asumir razonablemente que *sarA6* es un mutante termosensible válido para estudiar el efecto de la inactivación de todas las funciones de SarA.

La mutación *sarA7* (Phe93Ile, STOP191Trp + Thr192 Ser193) causa, al igual que *sarA3*, una sustitución de Phe93 por un aminoácido con cadena lateral alifática. Además, es posible que la adición de tres residuos más en la hélice C-terminal afecte al plegamiento de la proteína, al alterar el bucle que conecta  $\alpha 1$  con  $\beta 1$ .

*sarA8* sólo causa la sustitución Gly27Ser. Gly27 forma parte del denominado bucle P (*P-loop*) o motivo de Walker A [190]. El *P-loop* tiene la secuencia consenso GxxxxGKS/T, en donde el residuo N-terminal de Gly corresponde al sustituido en SarA8. Esta glicina está conservada en la gran mayoría de ATPasas y GTPasas [191]. El mutante *sarA8* crece a 30°C y 37°C como una cepa silvestre y no crece a 42°C (Figura R.3B).

#### **4.1.10. Selección de los alelos termosensible idóneos para estudios por microscopía**

Para determinar el efecto de la inactivación de SarA nuestro propósito era visualizar, mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*, el comportamiento de los diferentes compartimentos exocíticos utilizando proteínas fluorescentes. Dado que nuestro microscopio admite una temperatura máxima en la pletina de 37-39°C, debíamos seleccionar un mutante termosensible adecuado a esta limitación. *sarA6* y *sarA7* tienen un gran defecto en el crecimiento a 37°C; sin embargo, *sarA1*, *sarA2*, *sarA3* y *sarA8* crecen bien a esta temperatura. Por lo tanto, *sarA6* y *sarA7* eran potencialmente útiles para microscopía *in vivo*, dado que permiten hacer el cambio a la temperatura restrictiva en la propia pletina del microscopio. Elegimos inicialmente *sarA6* porque, a diferencia de *sarA7*, contiene una única mutación de cambio de sentido y, por lo tanto, conocemos la sustitución concreta que provoca la termosensibilidad. Nos propusimos determinar cómo variaban los niveles de SarA a lo largo del tiempo cuando se incrementa la temperatura de incubación de las células *sarA6* desde 30°C a 37°C. Cultivamos la cepa mutante *sarA6* y una estirpe silvestre durante 16 horas a 30°C, para después cambiar los cultivos a 37°C. Recogimos células antes del cambio de temperatura y después de 30, 60 y 120 minutos a 37°C. Mediante *western-blot* comprobamos que, mientras que en la cepa silvestre no hubo variaciones en los niveles de SarA, en el mutante *sarA6* se produjo una disminución drástica de SarA después de 30 minutos del cambio de temperatura (Figura R.4B). Por lo tanto, seleccionamos *sarA6* para realizar estudios por microscopía.

#### **4.1.11. La inactivación condicional de SarA detiene la secreción al nivel del retículo endoplasmático**

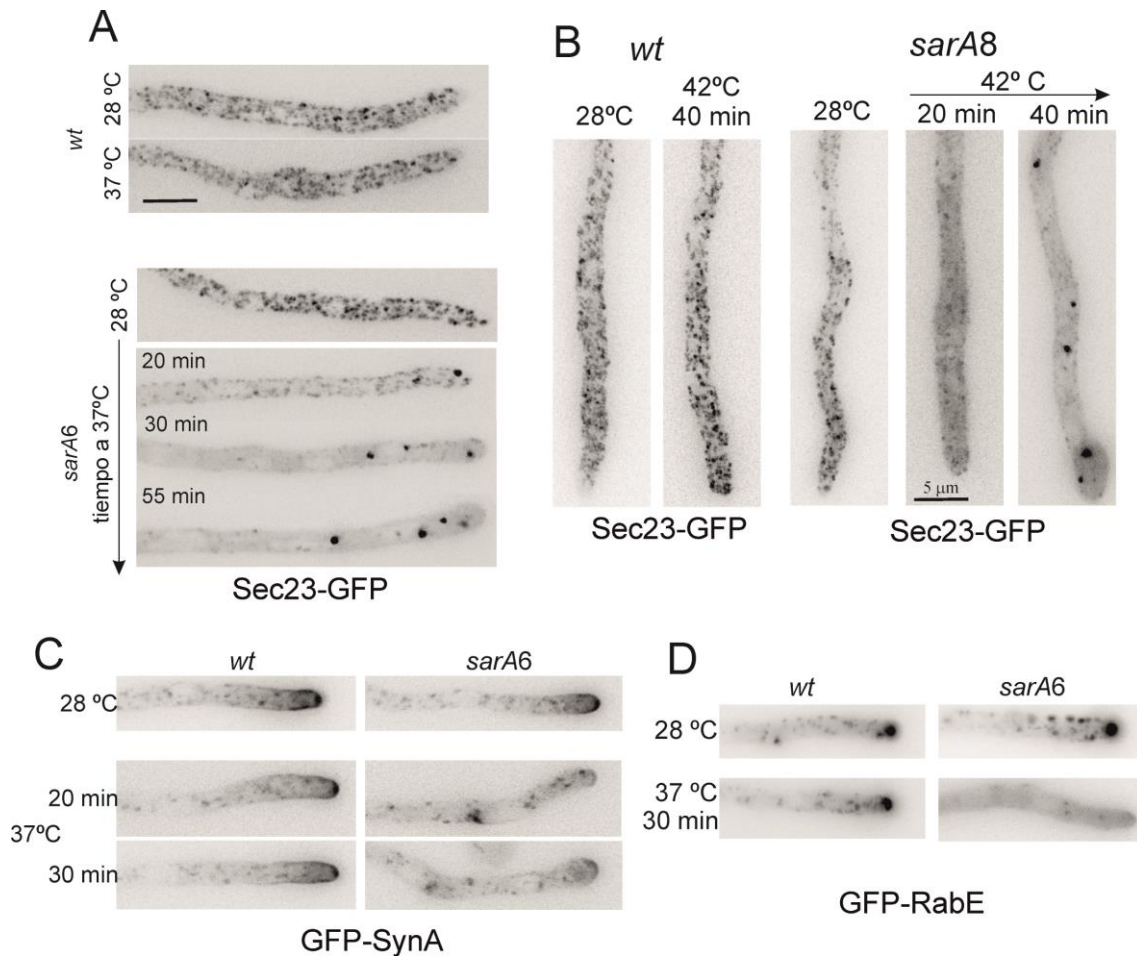
##### **4.1.11.1. Deslocalización de Sec23 de los sitios de salida del retículo endoplasmático**

Primero, estudiamos el reclutamiento de COPII a los sitios de salida del retículo endoplasmático (ERES) en el mutante *sarA6*, mediante la visualización de la subunidad de

COPII Sec23 [192]. Utilizamos una cepa *sarA6* cuya única copia de Sec23 está etiquetada con GFP endógenamente y se expresa en su locus y con su promotor nativo. En una cepa silvestre, Sec23-GFP se localiza en numerosos puntos intracelulares, que corresponden a los ERES [24] (Figura R.5A). El patrón de localización subcelular de Sec23-GFP en el mutante *sarA6* fue indistinguible del silvestre a 28°C (Figura R.5A). Sin embargo, después de 20 minutos tras el cambio de temperatura a 37°C en el microscopio, la mutación *sarA6* provocó la deslocalización parcial de Sec23 de estos focos hacia un patrón difuso de fluorescencia en el citosol. Después de 30 minutos, los ERES estaban claramente reducidos a unos pocos agregados de mayor tamaño. Este fenotipo era aún más conspicuo tras 55 minutos del cambio de temperatura (Figura R.5A). Por lo tanto, a 37°C *sarA6* provoca una desorganización de los ERES. Nos preguntamos si este efecto era específico del alelo *sarA6*. Realizamos el mismo experimento utilizando el mutante *sarA8* y comprobamos que el efecto de *sarA8* sobre los ERES era indistinguible del producido por *sarA6* (Figura R.5B). Esto indica que la desorganización de los ERES no era un efecto específico de alelo, sino que se debía a la inactivación de SarA. Por tanto, estos resultados sugieren que la inactivación de SarA impide la formación de vesículas COPII para el transporte desde el RE al aparato de Golgi.

#### 4.1.11.2. Deslocalización de la GTPasa exocítica RabE y de la v-SNARE SynA

Esperábamos que la inactivación de la salida del RE bloquease la exocitosis. Para averiguarlo, utilizamos dos proteínas que intervienen en los últimos pasos de la exocitosis: RabE, que se encuentra en las vesículas de secreción que viajan desde el *trans*-Golgi (TGN) hacia la membrana plasmática y se acumulan en el Spitzenkörper (SPK) [36]; y la v-SNARE SynA que presumiblemente participa en la fusión de estas vesículas de secreción con la membrana plasmática [12]. A 28°C SynA se localiza en la membrana apical y en el SPK, tanto en *sarA6* como en una cepa silvestre (Figura R.5C). Por su parte, RabE marca el SPK de forma indistinguible en *sarA6* y en una cepa silvestre (Figura R.5D). A los 20-30 minutos de cambiar la temperatura a 37°C, tanto SynA como RabE cambiaron su localización en *sarA6*. SynA se deslocalizó parcialmente de la membrana plasmática, acumulándose en estructuras intracelulares (Figura R.5C) mientras que RabE se volvió citosólico, probablemente porque ya no se reclutaba a las membranas del TGN (Figura R.5D). Estos resultados son consistentes con un bloqueo de la exocitosis y sugieren que *sarA6*, al desorganizar los ERES, impide la exocitosis a 37°C.



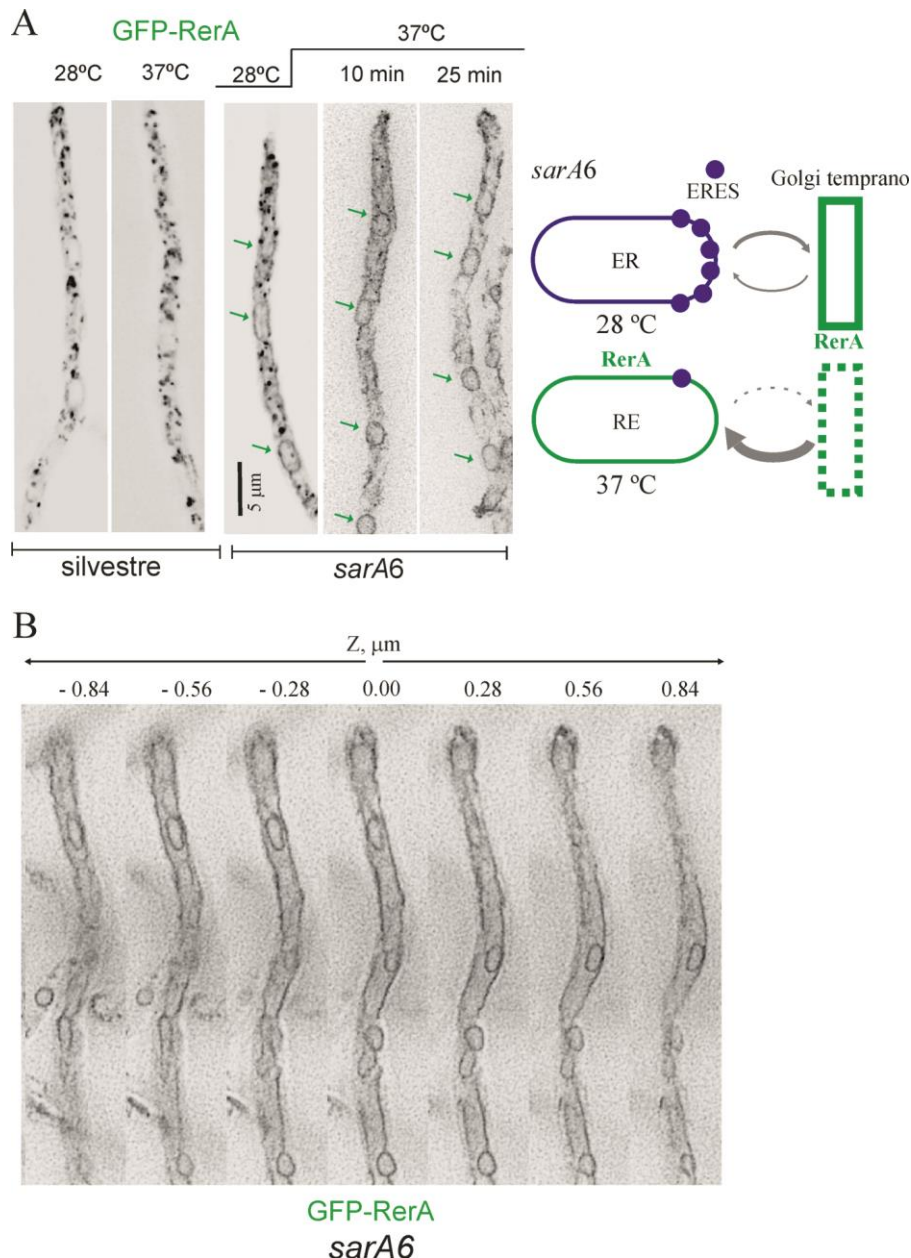
**Figura R.5. *sarA6* impide la secreción y *sarA6* y *sarA8* impiden la biogénesis de vesículas COPII.**  
**A.** Sec23-GFP en células wt y *sarA6*. Las células fueron precultivadas a 28°C y cambiadas a 37°C durante el tiempo indicado. Sec23 se deslocaliza en el mutante *sarA6*. **B.** Sec23-GFP en células wt y *sarA8*, mostrando el mismo resultado que con *sarA6*. **C.** GFP-SynA, como en A. **D.** GFP-RabE. (Todas las imágenes a la misma magnificación).

#### 4.1.11.3. RerA, que continuamente cicla entre el retículo endoplasmático y el Golgi, se encuentra desplazada hacia el retículo en el mutante *sarA6*

Con el fin de comprobar si verdaderamente estaba ocurriendo un bloqueo del tráfico al nivel del RE, nos propusimos estudiar una proteína transmembrana que ciclase continuamente entre el RE y el aparato de Golgi. La predicción era que al inactivar SarA se impediría la salida de vesículas COPII y dicha proteína se acumularía en el RE. Para ello elegimos RerA, ya que su localización está bien caracterizada [18]. RerA es una proteína transmembrana que, aunque cicla continuamente entre el RE y el Golgi, en el estado estacionario se localiza en el Golgi temprano [18]. Su función es facilitar la vuelta al RE de proteínas residentes de este orgánulo que han viajado al Golgi [193]. Después de construir una cepa *sarA6 gfp-rerA*, realizamos experimentos de microscopía *in vivo*. Descubrimos que *sarA6* altera la localización normal de RerA-GFP incluso a 28°C. Mientras que en una cepa silvestre GFP-RerA marca las cisternas del Golgi temprano, en *sarA6* se localiza, además, en las envolturas nucleares (Figura R.6A). (Recuérdese

## Capítulo I

que las envolturas nucleares corresponden a membranas del RE). Por lo tanto a temperatura permisiva *sarA6* se comporta como un mutante hipomorfo (como sugería el *western-blot* de la Figura R.4A), que impide parcialmente el transporte desde el RE al aparato de Golgi. Cuando incrementamos la temperatura del cultivo, en tan sólo 10-15 minutos toda la señal de fluorescencia GFP-RerA se desplazó al RE, marcándose tanto las envolturas nucleares como la red de membranas correspondiente al RE periférico (Figura R.6A-B) [169]. Concluimos que la inactivación de SarA mediante el mutante *sarA6* bloquea el tráfico desde el RE al aparato de Golgi.



**Figura R.6. Rápida inactivación del tráfico anterógrado en la interfaz retículo-Golgi por *sarA6*.** **A.** GFP-RerA en hifas wt y *sarA6*, precultivadas a 28°C y cambiadas a 37°C. Nótese la rápida relocalización del marcador al retículo, resepresentada esquemáticamente en la derecha. Las flechas señalan los núcleos. **B.** Secciones de un z-stack, sometido a deconvolución mostrando la localización de RerA en el retículo endoplasmático, después de más de 30 minutos del cambio de temperatura a 37°C.

#### 4.1.12. Desorganización del Golgi por inactivación de SarA

Una vez establecido que *sarA6* impide la adecuada salida del RE, determinamos su efecto en el aparato de Golgi utilizando proteínas marcadoras tanto del Golgi temprano como del TGN (Tabla R.1). Utilizamos tanto proteínas periféricas como integrales de membrana. De este modo podíamos estudiar tanto el mantenimiento de la identidad de las cisternas del Golgi como el destino final de las membranas.

**Tabla R.1.** Proteínas marcadoras utilizadas en el estudio de la desorganización del Golgi.

|                        | Golgi temprano | TGN                |
|------------------------|----------------|--------------------|
| Periférica de membrana | CopA           | PH <sup>OSBP</sup> |
| Integral de membrana   | SedV           | TlgB               |

##### 4.1.12.1. El Golgi temprano pierde su identidad y sus membranas se relocalizan al retículo endoplasmático

###### La proteína periférica CopA se relocaliza al citosol

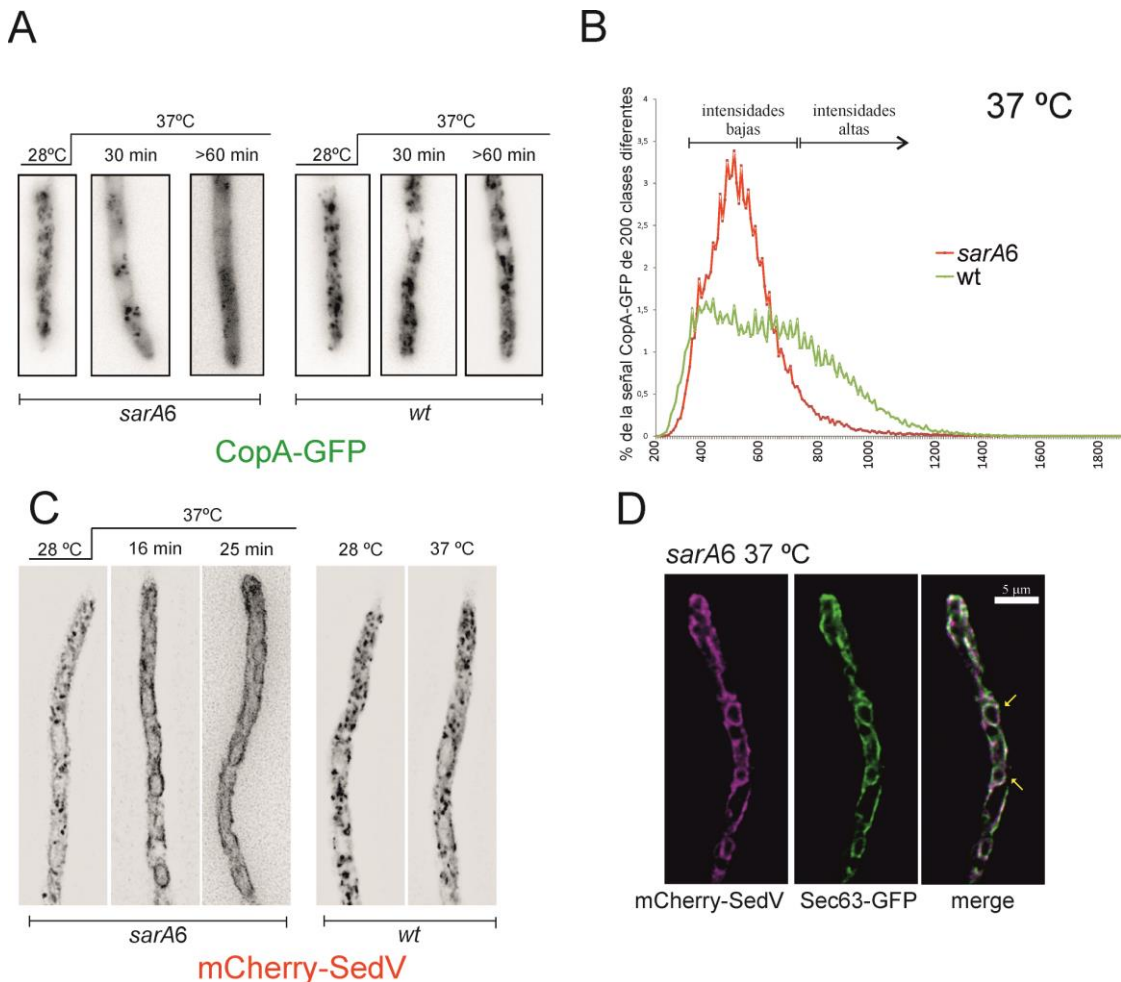
El complejo oligomérico COPI está implicado en el tráfico dentro del aparato de Golgi y en el transporte retrógrado entre el Golgi y el RE. Al tráfico retrógrado intra-Golgi mediado por COPI se le atribuye un papel clave en la maduración de cisternas [55, 135, 194]. CopA es una subunidad esencial de COPI [172], la denominada subunidad  $\alpha$ . Como se demuestra en el capítulo IV, CopA-GFP se localiza en el Golgi temprano. En el mutante *sarA6* cultivado a 28°C, CopA-GFP se localizó igual que en una cepa wt (Figura R.7A). Sin embargo, a los 20-30 minutos de incrementar la temperatura a 37°C, CopA-GFP se deslocalizó desde las cisternas del Golgi al citosol (Figura R.7A). La Figura R.7B muestra una cuantificación del aumento de fluorescencia citosólica (intensidades bajas), que correlaciona con una disminución de fluorescencia en cisternas (intensidades altas de fluorescencia). Dicho efecto no ocurre en la cepa silvestre. Este resultado es compatible con que se produzca una reabsorción de las cisternas del Golgi temprano al bloquearse el tráfico desde el RE.

###### Las membranas del Golgi temprano marcadas con SedV se reabsorben por el RE

Posteriormente, investigamos el destino de una proteína transmembrana. Elegimos la t-SNARE específica del Golgi temprano, SedV [18]. SedV se encuentra normalmente en las cisternas del Golgi temprano; sin embargo, en el mutante *sarA6* a 28°C, se localizó parcialmente en las envolturas nucleares (Figura R.7C), de un modo similar a RerA (Figura R.6A). A los 10-15 minutos de incrementar la temperatura a 37°C, SedV se localizó totalmente en las

# Capítulo I

membranas del RE (Figura R.7C), como demuestra su colocalización con el marcador del RE Sec63-GFP [169] (Figura R.7D). Este resultado subraya la desorganización del aparato de Golgi causada por *sarA6*. Por tanto, la función *sarA* es necesaria para la existencia del Golgi temprano. En ausencia de SarA, CopA se hace citosólica mientras que las membranas del Golgi que contienen SedV se relocalizan al RE.



**Figura R.7. Desorganización del aparato de Golgi temprano tras la inactivación de SarA con *sarA6*.** **A.** Desorganización del Golgi temprano marcado con CopA-GFP. **B.** La desorganización se muestra con este gráfico, que reúne las intensidades de fluorescencia de 4 células *wt* o *sarA6* después de 80 minutos a 37°C, mostrando que en *sarA6* hay una reducción en las intensidades altas, correspondientes a las cisternas del Golgi y un aumento en las intensidades bajas, correspondientes a la señal citosólica. **C.** Relocalización de mCherry-SedV desde el Golgi temprano al RE debido al incremento a 37°C de células *sarA6*. **D.** Plano medio de una célula apical *sarA6* que expresa Sec63-GFP y mCherry-SedV, sometidas a deconvolución, donde se aprecia la colocalización de ambos marcadores. Las flechas señalan los núcleos.

## 4.1.12.2. Las cisternas del trans-Golgi (TGN) se desorganizan y disipan

### 4.1.12.2.1. La proteína periférica PH<sup>OSBP</sup> se desplaza desde el TGN al citosol

A continuación, estudiamos los efectos de *sarA6* sobre el TGN, en primer lugar con una proteína periférica, PH<sup>OSBP</sup>, que se recluta a la monocapa citosólica del TGN por detección por

coincidencia de Arf1 y PtdIns4P [24, 168]. Esta proteína marca específicamente las cisternas del TGN y es similar a CopA en que se recluta de manera Arf1-dependiente. En el capítulo IV demostramos que mRFP-PH<sup>OSBP</sup> (TGN) no colocaliza con CopA-GFP (Golgi temprano).

mRFP-PH<sup>OSBP</sup> se localizó en las cisternas del TGN en el mutante *sarA6* como en la cepa silvestre (Figura R.8A). Sin embargo, al incrementar la temperatura a 37°C, mRFP-PH<sup>OSBP</sup> se deslocalizó al citosol en *sarA6*, pero no en la cepa silvestre (Figura R.8A). El aumento en fluorescencia citosólica correlacionó con la disminución de fluorescencia en las cisternas del TGN (Figura R.8B).

#### 4.1.12.2.2.Las cisternas del TGN marcadas con TlgB se disipan

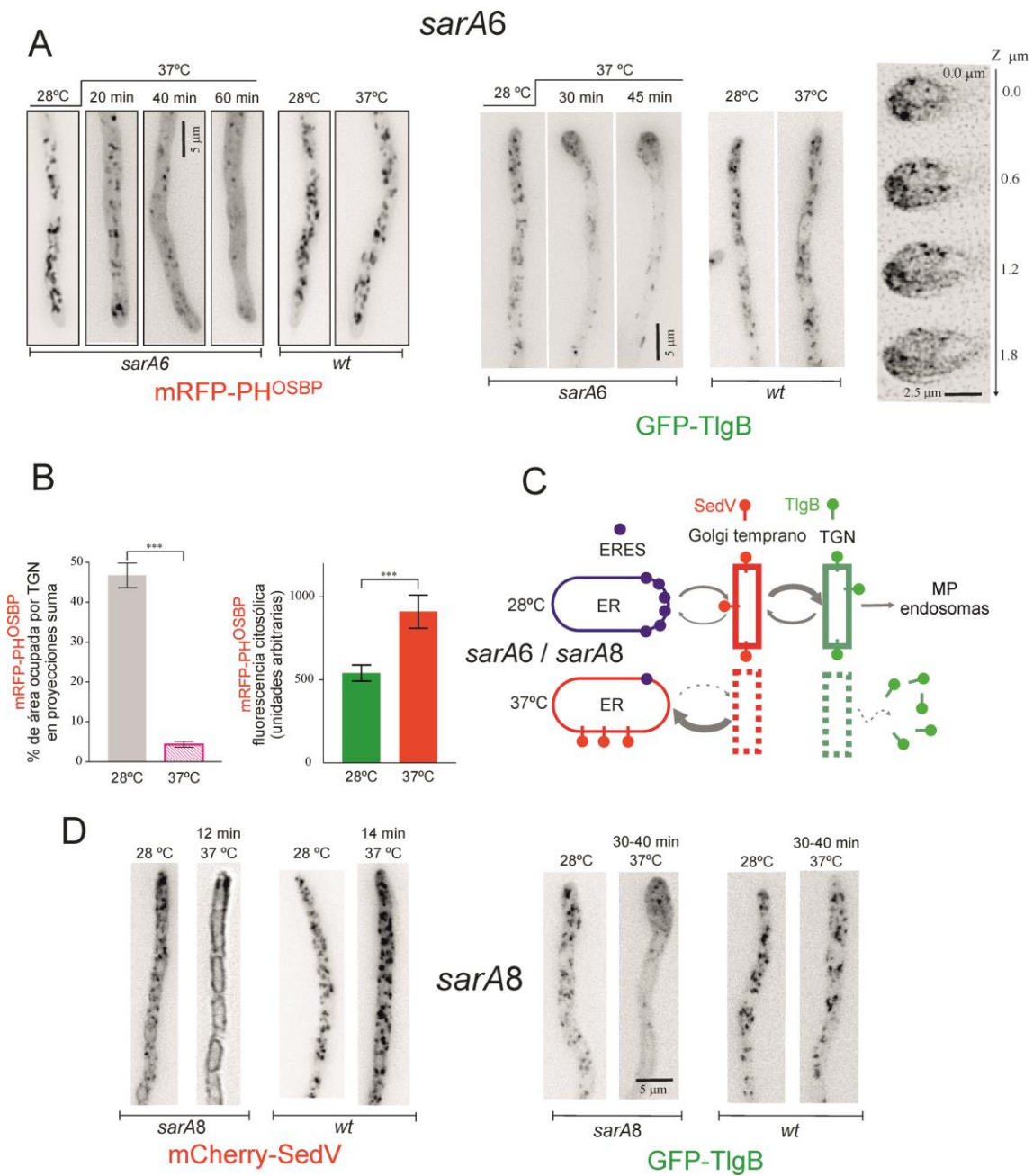
Finalmente, estudiamos el efecto de *sarA6* en TlgB, la t-SNARE del TGN, y por tanto una proteína integral de membrana [38]. A 28°C, GFP-TlgB marcó las cisternas del TGN tanto en *sarA6* como en una cepa silvestre. Tras 30-45 minutos de subir la temperatura del cultivo, GFP-TlgB se deslocalizó de las cisternas hacia un patrón citosólico difuso en la región apico-proximal de las células, sobre cuyo fondo se distinguía un entramado poco fluorescente (Figura R.8A). Este comportamiento de TlgB en respuesta a *sarA6* contrasta con el de SedV, dado que el efecto en TlgB fue mucho más tardío y TlgB no se desplazó al RE. Las estructuras remanentes de TlgB que se concentran en los ápices hinchados podrían corresponder a un estadio desorganizado del TGN resultante del bloqueo de la salida del RE. Estos resultados ponen de manifiesto la asimetría existente entre las cisternas del Golgi temprano y las del TGN (Figura R.8C).

Para corroborar que esta desorganización del aparato de Golgi no es específica del alelo *sarA6*, sino que por el contrario es debida a la inactivación de SarA, utilizamos el mutante *sarA8*. Determinamos el efecto de *sarA8* en las dos t-SNAREs del Golgi, SedV y TlgB. A 28°C, TlgB se localizó en el TGN, mientras que SedV mostró una localización parcialmente desplazada hacia el RE (Figura R.8D), como en el mutante *sarA6*. A la temperatura restrictiva, SedV se desplazó totalmente a las membranas del RE, mientras que TlgB se relocalizó en un patrón reticular difuso en la región próxima al ápice (Figura R.8D). En resumen, la deslocalización de SedV y TlgB causada por *sarA6* y *sarA8* fue indistinguible, lo que confirma que no era específica del alelo utilizado.

En resumen, estos resultados demuestran que se requiere la salida del RE para la biogénesis tanto de las cisternas del Golgi temprano como del TGN, lo que concuerda con el modelo de maduración de cisternas, según el cual el Golgi no es una entidad estable, sino que se mantiene mediante aporte continuo de tráfico del RE. Además, concluimos que la inactivación de SarA desorganiza el aparato de Golgi de manera asimétrica: el Golgi temprano se reabsorbe

# Capítulo I

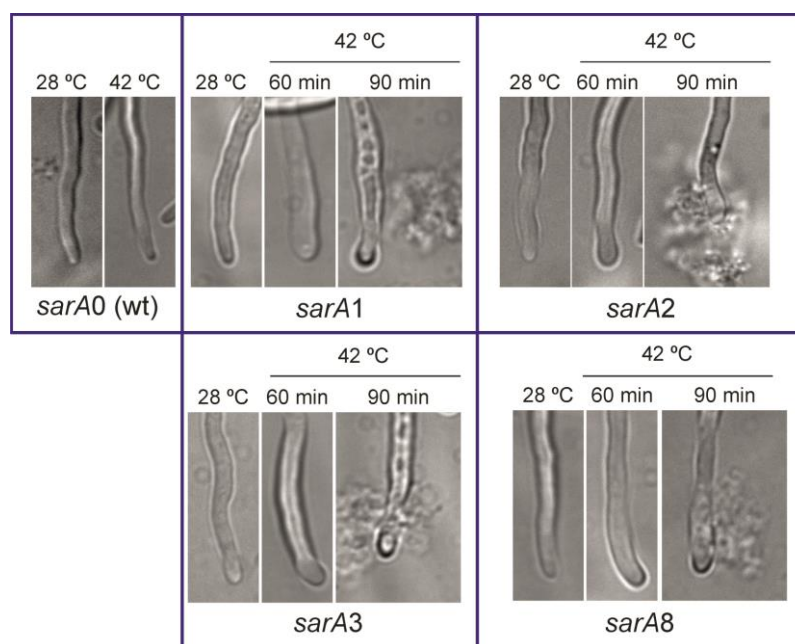
por el RE junto con SedV y libera CopA al citosol, mientras que el TGN se disipa (esquema en la Figura R.8C).



**Figura R.8. Desorganización del *trans*-Golgi por inactivación de SarA.** **A.** A la izquierda, desorganización de las cisternas del TGN, marcadas con mRFP-PH<sup>OSBP</sup> tras un cambio a 37°C. A la derecha, relocalización de GFP-TlgB a una señal citosólica difusa y a estructuras remanentes poco fluorescentes (las imágenes detalle de la derecha corresponden a secciones sometidas a deconvolución). **B.** A la izquierda, gráfico de barras que muestra el área en proyecciones suma ocupadas por estructuras mRFP-PH<sup>OSBP</sup> en n=13 células *sarA6* antes y después del cambio de temperatura a 37°C. El gráfico de la derecha representa el incremento en fluorescencia citosólica de mRFP-PH<sup>OSBP</sup> en las mismas células. **C.** Diagrama que enfatiza los diferentes destinos de las sintaxinas del Golgi temprano y el TGN después del bloqueo del tráfico de COPII mediante *sarA6*. **D.** Efecto causado por *sarA8* sobre mCherry-SedV y GFP-TlgB, el cual es indistinguible del causado por *sarA6*.

**4.1.13. La inactivación de SarA tiene consecuencias morfológicas: formación de globos apicales**

Previamente, se habían descrito alteraciones morfológicas apicales causadas por el bloqueo de la ruta secretora al nivel del aparato de Golgi [18]. Por ello, determinamos el efecto en la morfología celular de incrementar la temperatura de cultivos de los mutantes termosensibles obtenidos. En el caso de los mutantes *sarA1*, *sarA2*, *sarA3* y *sarA8*, que son capaces de crecer relativamente bien a 37°C (Figura R.3B), estudiamos el efecto morfológico realizando un cambio de 28°C a 42°C, utilizando un incubador no acoplado al microscopio. A 28°C las hifas estos mutantes presentaron una morfología normal (Figura R.9). Tras incubar estas células durante 60 o 90 minutos a 42°C los cuatro mutantes presentaron el mismo cambio morfológico: las regiones apicales se hincharon a los 60 minutos, mientras que después de 90 minutos la mayoría de estos ápices estaban lisados (Figura R.9). Por lo tanto, una inactivación aguda de SarA provoca que los ápices se hinchen y, si se mantiene la inactivación, las células finalmente se lisan, probablemente por debilitamiento de la pared celular como resultado de la ausencia de exocitosis.

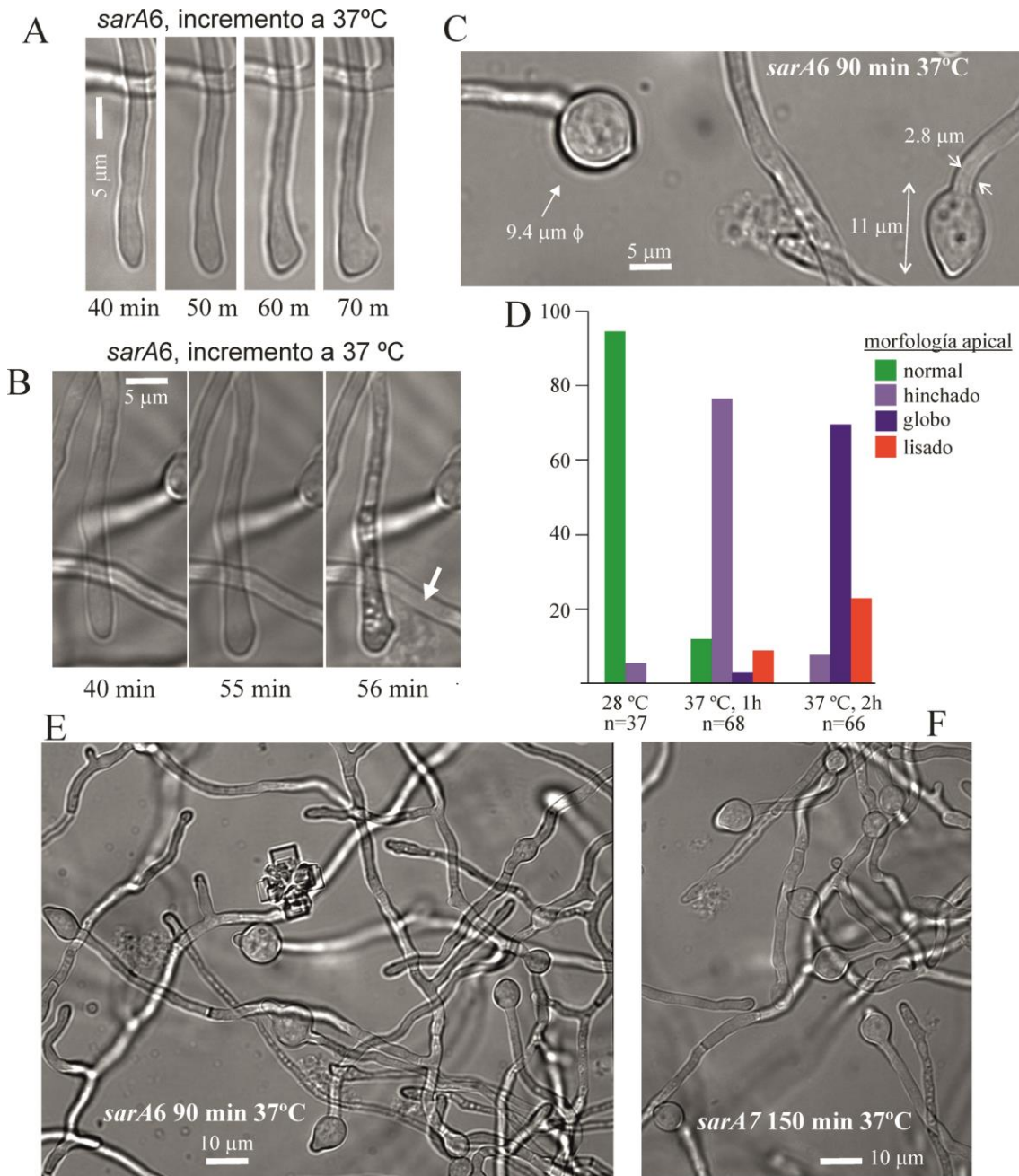


**Figura R.9. Ápices inflados y lisis de los mutantes cuya temperatura restrictiva es 42°C.** La morfología apical de las cepas con el alelo *sarA* indicado, a 28°C y después de un cambio a 42°C durante 60 o 90 minutos. Nótese, tras 90 minutos, las nubes correspondientes al material intracelular liberado tras la lisis.

El efecto morfológico del incremento de temperatura en los otros dos mutantes, *sarA6* y *sarA7*, cuyo crecimiento está muy afectado a 37°C (Figura R.3B), lo estudiamos directamente en la pletina del microscopio. A 28°C, su morfología fue normal. Sin embargo, tras 45-60 minutos del cambio a 37°C, *sarA6* sufrió un engrosamiento apical (Figura R.10A), similar al del

## Capítulo I

resto de mutantes. También, una cierta proporción de la población celular se lisó (Figura R.10B). Sorprendentemente, tras más de 90 minutos de incubación de las células a 37°C, una mayoría de los ápices que no habían lisado continuó creciendo isotrópicamente, formando grandes *globos* apicales o subapicales de alrededor de 10 µm de diámetro (Figura R.10C).



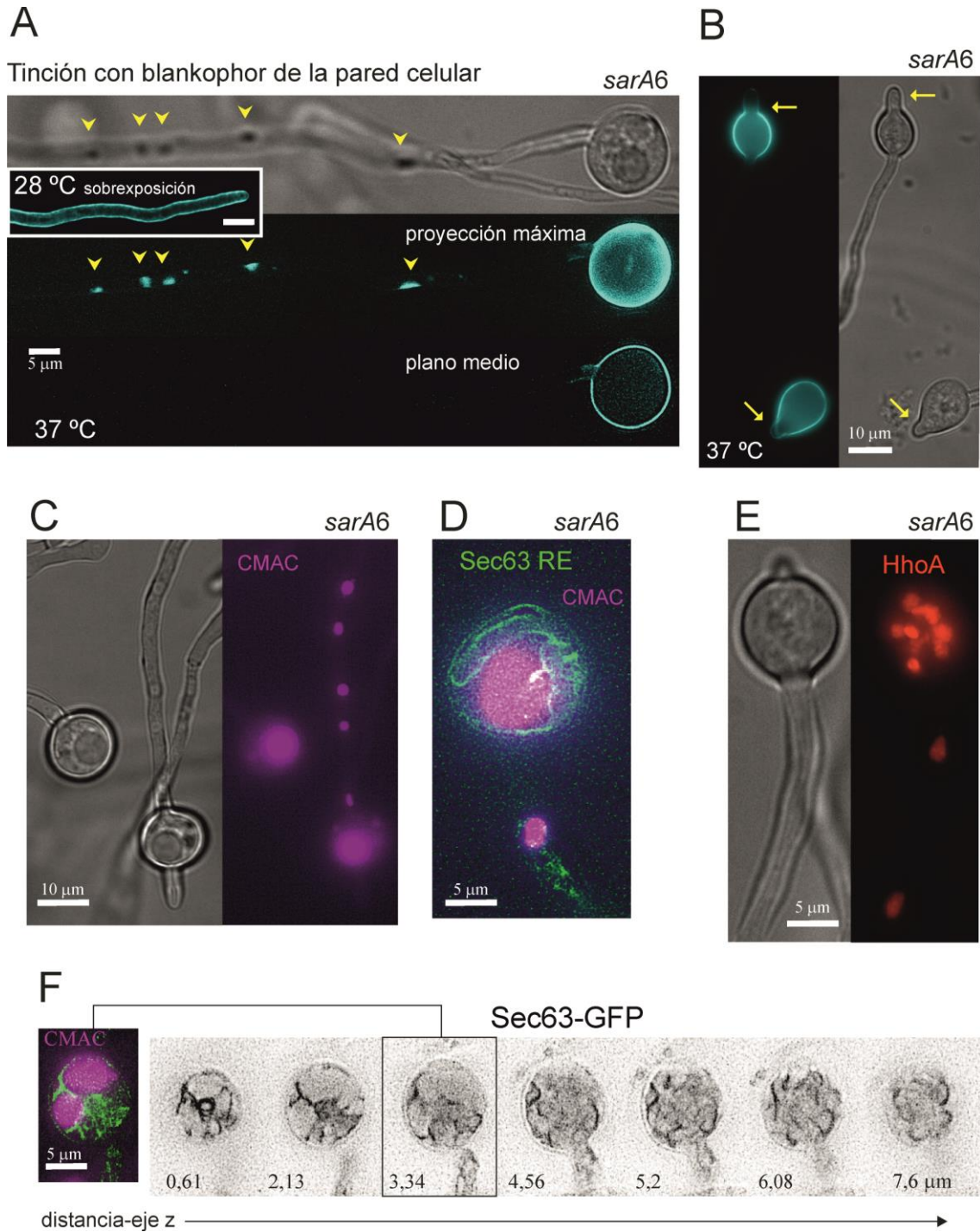
**Figura R.10. Consecuencias morfológicas de *sarA6*.** **A.** Ápice inflándose a medida que aumenta el tiempo a 37°C. **B.** Ejemplo de un ápice que se lisa después de ~1 hora a 37°C. **C.** Globo formado después de 90 minutos de incubación a 37°C. **D.** Cuantificación de ápices *sarA6* normales, hinchados, en globo y lisados a 28°C (n=37), 1 hora a 37°C (n=68) y 2 horas a 37 °C (n=66). En el eje y se representa la proporción porcentual. **E.** Campo general de un cultivo de células *sarA6* preincubadas a 28°C y cambiadas a 37°C. **F.** Imagen similar para un cultivo de una cepa *sarA7*.

En la Figura R.10D se cuantifica la morfología de la población, clasificando los ápices en cuatro grupos excluyentes: normal, hinchado, en *globo* y lisado. El fenotipo celular de *globo* representa alrededor de un 60% de la población después de 2 horas a 37°C. Este fenómeno, que fue completamente reproducible, no era específico del alelo *sarA6* (Figura R.10E), ya que también se dio en las células *sarA7* transferidas a 37°C (Figura R.10F). Hay que recordar que al menos en el caso de *sarA6*, en estas condiciones de temperatura existen aún niveles detectables de proteína SarA (ver el *western-blot* de la Figura R.4B) y es posible que exista un nivel basal de salida del RE, que alimentaría la formación de estos globos. De hecho, cuando la temperatura se incrementó a 39°C las células *sarA6* se lisaron (no mostrado).

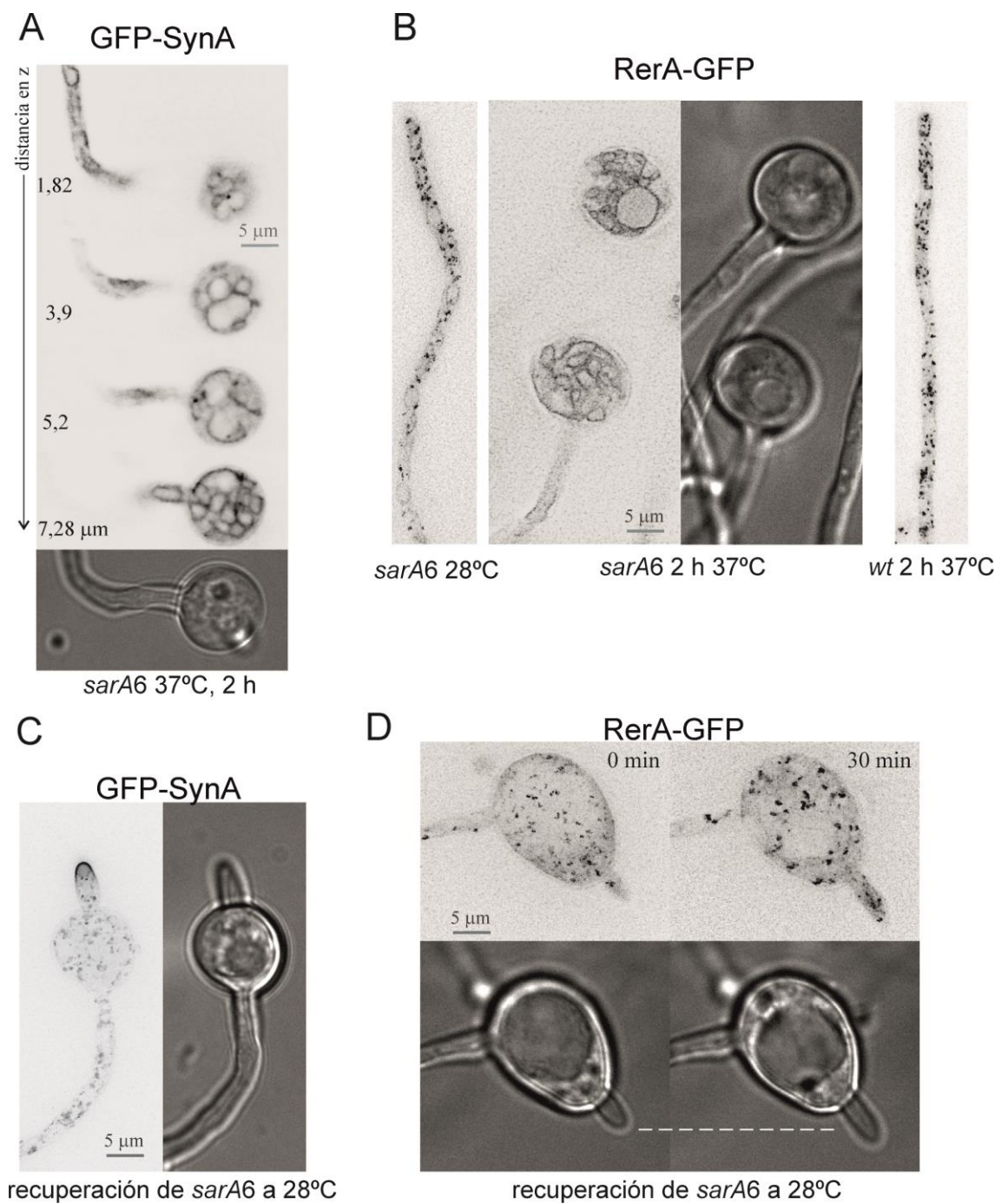
### **4.1.13.1. Los globos formados por *sarA6* tienen una pared celular engrosada, una gran vacuola, gran cantidad de retículo endoplasmático y múltiples núcleos**

Para detectar posibles alteraciones de la pared celular, teñimos las células con Blankophor BA (BPBA). BPBA es un agente blanqueador fluorescente, análogo al Calcofluor White, que se une a la quitina y a los glucanos de la pared celular de hongos [195]. A 28°C, BPBA marcó la pared celular más o menos homogéneamente tanto en la cepa *sarA6* (Figura R.11A) como en la silvestre (no mostrado). Sin embargo, tras la formación de los globos a 37°C el marcaje con BPBA mostró que éstos están delimitados por una pared celular mucho más reactiva al compuesto, lo que indica que la pared está engrosada (Figura R.11A). También aparecieron puntos hiper-reactivos a lo largo de la hifa (Figura R.11A). La microscopía de contraste diferencial (DIC) confirmó que tanto los globos como los puntos mencionados tienen la pared celular engrosada (Figura R.11A). Además, los globos formados en la región subapical presentan ápices que, aunque se marcan con BPBA, lo hacen en mucho menos grado que el globo adyacente (Figura R.11B). Estos resultados sugieren que la lisis celular de los globos se impide por un reforzamiento de su pared.

Otro rasgo característico de estos globos era que muchos contenían una gran estructura intracelular esférica (ver Figura R.11C, imagen izquierda), semejante a una gran vacuola. Utilizamos 7-amino-4-clorometil coumarin (CMAC), que marca fluorescentemente el lumen vacuolar, y demostramos que efectivamente están ocupados por grandes vacuolas (ver Figura R.11C, imagen derecha). Además, demostramos que los globos contienen una gran acumulación de membranas del RE (marcadas con Sec63-GFP) y entre 4 y 8 núcleos [marcados con la histona H1, HhoA, etiquetada con mCherry (Figura R.11D-F)].



**Figura R.11. Caracterización subcelular de los globos.** **A.** Ejemplo de una célula con globo teñida con blankophor. Las imágenes fluorescentes bajo la imagen Nomarski corresponden a una proyección de intensidades máximas y a un plano medio de un z-stack sometido a deconvolución. **B.** Globo formado subapicalmente, teñido con blankophor. **C.** Globos teñidos con CMAC para marcar las vacuolas, que también son visibles en la imagen Normarski. **D.** Ápice en globo teñido con CMAC y expresando Sec63-GFP para marcar las membranas del RE. La imagen es un plano de un z-stack tratado con un programa de deconvolución. **E.** Un globo con los núcleos marcados con HhoA-mCherry (histona H1). Se trata de una proyección de las intensidades máximas. **F.** Varios planos de un stack de Sec63-GFP en un globo. La imagen de la izquierda muestra, adicionalmente, una tinción de las vacuolas con CMAC.



**Figura R.12. El reestablecimiento de la polaridad correlaciona con la reactivación de la exocitosis.** **A.** Arriba, diferentes planos de un z-stack con deconvolución de GFP-SynA en células cambiadas a 37°C durante 2 horas, localizándose únicamente en el RE, en *sarA6*. **B.** RerA-GFP marcando el retículo en globos. **C.** Recuperación de la localización de GFP-SynA en la membrana apical de un ápice recién formado en una célula recuperándose al cambiarla de 37°C a 28°C. **D.** Recuperación de la localización normal de GFP-RerA al recuperarse el crecimiento apical.

### **4.1.13.2. Reorganización del Golgi y restablecimiento del crecimiento morfológicamente normal**

En el estadio de globos observamos la localización de RerA y de la v-SNARE SynA y determinamos que se encuentran completamente en el RE (Figura R.12A-B). Posiblemente, la acumulación de GFP-SynA en el RE corresponde a proteína de nueva síntesis, cuya salida del RE está bloqueada o limitada. Estos resultados sugieren que el aparato de Golgi está desorganizado en el estadio morfológico de globos.

Este estadio es sin embargo reversible. Cuando redujimos la temperatura a 28°C, los globos reestablecieron un eje (o varios ejes) de polaridad y emitieron tubos germinativos normales, con crecimiento polarizado (Figura R.12C-D). En estas condiciones, RerA volvía a localizarse en cisternas (Figura R.12D), probablemente correspondientes a un aparato de Golgi funcional. De hecho, SynA recuperó su característica localización apical en el nuevo eje (o los nuevos ejes) de crecimiento (Figura R.12C). Estos resultados indican que, una vez restaurado el tráfico desde el RE, el aparato de Golgi se reorganiza, se restaura la secreción apical y la morfología normal reaparece. Por lo tanto, estos resultados demuestran fehacientemente que el aparato de Golgi es un orgánulo dinámico que puede desorganizarse y, posteriormente, reorganizarse y subrayan la capacidad morfogenética que tiene la regulación de la exocitosis a nivel de salida del RE, e indirectamente a través de la biogénesis del Golgi.

### **4.1.14. Búsqueda de mutantes revertientes de la termosensibilidad de *sarA6* y *sarA8***

Para encontrar interactores genéticos de *sarA*, decidimos buscar mutaciones supresoras de la ausencia de crecimiento resultante de la falta de función de *sarA*. Con este objetivo nos propusimos utilizar los mutantes termosensibles que habíamos obtenido.

Es importante señalar que, en este momento de la investigación, aún no habíamos sido capaces de encontrar el ortólogo de Sec12 en *A. nidulans*, dada la gran divergencia a nivel de secuencia de esta proteína en eucariotas (ver capítulo II). Considerábamos posible realizar la búsqueda de la proteína activadora (GEF) de SarA mediante esta estrategia de búsqueda de supresores, dado que *SEC12*, en *S. cerevisiae*, es supresor en multicopia de un alelo termosensible de *SAR1* [196].

Decidimos utilizar los alelos termosensibles que mejor habíamos caracterizado: *sarA6* y *sarA8*. Por lo tanto, para encontrar mutaciones que suprimieran la letalidad de *sarA6* o de *sarA8* a 42°C, buscamos revertientes extragénicos. Este proyecto lo llevamos a cabo en colaboración con el Profesor Herb N. Arst. Mutagenizamos con luz ultravioleta esporas *sarA6* o *sarA8* y las

plaqueamos en medio completo, incubando las placas a 42°C. Después, preseleccionamos colonias con crecimiento a dicha temperatura. Lamentablemente, sólo caracterizamos supresores intragénicos, que, por otro lado, nos podían ayudar a estudiar las relaciones estructura/función en SarA.

#### 4.1.14.1. Mutaciones intragénicas supresoras de la termosensibilidad de *sarA6*

*sarA6* tiene 3 mutaciones silenciosas (G373T, G849A, G997T) y una mutación de cambio de sentido (g.T1072C). Esta última mutación provoca la sustitución Ser186Pro (ver capítulo X). En este caso, preseleccionamos y purificamos 30 colonias revertientes. Finalmente, seleccionamos y analizamos un total de 10. Todas ellas contenían las mutaciones silenciosas en *sarA6*. Además, los 10 revertientes analizados tenían nuevas mutaciones de cambio de sentido en *sarA*, casi con seguridad causantes de la reversión fenotípica. En la tabla R.2 se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla R.2.** Revertientes intragénicos de *sarA6*.\*

|                  | Mutación                     | Sustitución       | Fenotipo  | Interpretación   |
|------------------|------------------------------|-------------------|---|--|
| <i>sarA</i><br>6 | (T1072C) <sup>1</sup>        | (S186P)           | Mal crecimiento a 37°C, no crece a 42°C                   | Alteración de la $\alpha$ -hélice C-terminal                     |
| s2               | A1070T<br>(T1072C)           | I182L<br>(S186P)  | Revertiente muy débil                                     | Estabiliza la $\alpha$ -hélice C-terminal, afectada por S186P    |
| s25              |                              |                   | Revertiente muy débil                                     |  |
| s30              |                              |                   | Buen crecimiento a 37°C, fenotipo único a 42°C            |  |
| s24              | G1058C<br>(T1072C)           | G181A<br>(S186P)  | Buen crecimiento a 37°C                                   | Permiten la correcta formación de la $\alpha$ -hélice C-terminal |
| s8               | C1073T<br>(T1072C)           | S186L             | Buen crecimiento a 37°C                                   |  |
| s16              |                              |                   |   |  |
| s10              | T1082C<br>(T1072C)           | S186A             | Buen crecimiento a 37°C                                   |  |
| s28<br>s29       | T1072<br>+ C1073T            | S186F             | Criosenible. 42°C es su temperatura óptima de crecimiento |  |
| s21              | T1072<br>(reversión directa) | S186<br>(SarA wt) | <Crecimiento silvestre>                                   | <<revertiente directo>>  |

\* *sarA6* y todos los revertientes contienen, además, las mutaciones silenciosas G373T, G849A, G997T.

<sup>1</sup>La mutación es relativa al primer codón de iniciación.

Todos los revertientes fueron intragénicos. Se pueden dividir en tres tipos:

**1-Reversión verdadera:** el revertiente s21 codifica una proteína SarA silvestre.

**2-Reversión equivalente:** los revertientes s8, s16, s10, s28 y s29 han sufrido una mutación *missense* en el codón mutado en *sarA6*, provocando un cambio a un tercer aminoácido, aceptable para la función de SarA. Se cambia la prolina presente en SarA6 (Ser186Pro) por leucina, alanina o fenilalanina, las cuales, al contrario que la prolina, son aceptables en una  $\alpha$ -hélice. Por tanto, la  $\alpha$ -hélice C-terminal se formaría adecuadamente, permitiendo el crecimiento a 42°C. Es interesante el caso de la sustitución Ser186Phe, porque causa criosensibilidad, con una temperatura óptima de crecimiento de 42°C.

**3-Mutación *missense* en un segundo sitio:** s2, s25, s30 y s24 tienen dos mutaciones *missense*: mantienen la mutación de *sarA6*, y tienen otra mutación en un codón diferente.

En s2, s25 y s30 la mutación supresora provoca el cambio Ile182Leu; en s24 la mutación supresora provoca la sustitución Gly181Ala. Las dos “sustituciones supresoras” están en la  $\alpha$ -hélice C-terminal, y deben de compensar de algún modo la alteración de ésta provocada por S186P.

Por otro lado, las cepas s2, s25 y s30 tienen la mutación A1070T (Ile182Leu). Las dos primeras son revertientes muy débiles; sin embargo, la cepa s30 crece bien a 37°C y tiene un fenotipo único a 42°C. Esta diferencia se puede explicar de dos modos: que s2 y s25 tuviesen mutaciones deletéreas adicionales, o que la cepa s30 tuviese una mutación supresora adicional.

#### 4.1.14.2. Mutaciones intragénicas supresoras de la termosensibilidad de *sarA8*

*sarA8* contiene una mutación silenciosa (g.G119A) y una mutación *missense* (g.G246A→Gly27Ser). Preseleccionamos y aislamos 10 revertientes de *sarA8*. Secuenciamos el gen *sarA* de 5 de ellos. La tabla R.3 muestra la caracterización de estas 5 cepas revertientes.

v4 es un revertiente verdadero y v3, v7 y v10 son revertientes intragénicos por mutaciones *missense* en un segundo sitio.

**Tanto v3 como v10** tienen una sustitución en la posición 182 de SarA (I182L y I182F, respectivamente), además de la sustitución causada por *sarA8* (G27S). I182 está en la  $\alpha$ -hélice C-terminal y la sustitución I182L es el mismo cambio en la secuencia proteica que tienen los revertientes s2, s25 y s30 de *sarA6*. Además, la  $\alpha$ -hélice C-terminal está a más de 10 Å de distancia de G27S. Es posible que la sustitución I182L estabilice la estructura o mejore la función de la proteína de manera independiente de las sustituciones originales de SarA6 y SarA8, lo que destacaría la importancia de la  $\alpha$ -hélice C-terminal en la función/estabilidad de SarA.

**Tabla R.3.** Revertientes de *sarA8*\*.

|                  | Mutación                                   | Sustitución         | fenotipo                                | Interpretación   |
|------------------|--|---------------------|---|--|
| <i>sarA8</i>     | (G246A)                                    | (G27S)              | Crece bien a 37°C,<br>no crece a 42°C   | Afecta la unión del nucleótido por<br>estar sustituido el P-loop   |
| v2               | (G246A)<br>+<br>(supresión<br>extragénica) | (G27S)              | Colonias compactas<br>y pequeñas a 42°C |  |
| v3               | A1070C<br>(G246A)                          | I182L<br>(G27S)     | X                                       | Estabilización de la estructura /<br>función de SarA de modo<br>independiente a la mutación<br>termosensible |
| v4               | G246                                       | G27<br>(SarA wt)    | X                                       | <Revertiente directo>  |
| v7               | A701G<br>(G246A)                           | E87G<br>(G27S)      | X                                       |  |
| v10 <sup>2</sup> | A1070T<br>A1072T<br>(G246A)                | I182F<br><br>(G27S) | X                                       | Estabilización de la estructura /<br>función de SarA de modo<br>independiente a la mutación<br>termosensible |

\**sarA8* y todos los revertientes contienen, además, la mutación silenciosa G119A.

<sup>1</sup>La posición es relativa al primer nucleótido del codón de iniciación.

<sup>2</sup>Una parte de un intrón y 35 pb de un exón sin secuenciar.

**El mutante v7** tiene la sustitución de *SarA8* (Gly27Ser) y la sustitución Glu87Gly en una  $\alpha$ -hélice alejada de Gly27Ser, en la región del *switch* II de esta GTPasa. En esta posición 87, en SAR1 de humano, hámster chino, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, hay una alanina en vez de un glutamato. El cambio Glu87Gly aumenta la similitud de *SarA* con dichos ortólogos, y podría mejorar la estabilidad o la función de la proteína.

**v2** es un revertiente extragénico, ya que la secuencia de *sarA* corresponde con el alelo *sarA8*. Por lo tanto, cruzamos v2 con una cepa silvestre para determinar la segregación de la supresión y la termosensibilidad. En la descendencia del cruce, el fenotipo revertiente no segregó mendelianamente: sólo una pequeña proporción tenía el fenotipo de v2 (~1/50). Como consecuencia, abandonamos la investigación de este revertiente: una posibilidad que explicase esta segregación anormal sería que la reversión se deba a una mutación no mendeliana, como por ejemplo una aneuploidía. Otra posibilidad sería que una gran proporción de ascosporas con el genotipo revertiente no germinase. Dado que previamente habíamos visto una interacción genética entre *sarA8* y *sec23-gfp* (la cepa doble mutante crece peor que los mutantes simples), comprobamos por secuenciación si *sec23* estaba mutado en la cepa v2. El revertiente v2 no contiene mutaciones en el gen *sec23*.

# Capítulo II

## 4.2. Análisis sistemático de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras GEFs y GAPs

La regulación espacio-temporal de un gran número de procesos celulares está determinada por proteínas G pequeñas. Las proteínas G de la familia Arf/Sar participan en el tráfico intracelular y en la organización del citoesqueleto (ver Introducción) [7]. Para la hidrólisis del GTP es necesaria la estimulación de la actividad GTPasa por su proteína GAP (*GTPase activating protein*) correspondiente. Para la liberación de GDP es necesaria la acción de su GEF (*GTP exchange factor*).

En este capítulo se muestran los resultados de la búsqueda bioinformática de las proteínas de la familia Arf/Sar en *Aspergillus nidulans*, y de sus correspondientes GEFs y GAPs, así como la delección de cada uno de los genes que las codifican. En las tablas R.4 y R.5 se muestra un resumen de los resultados.

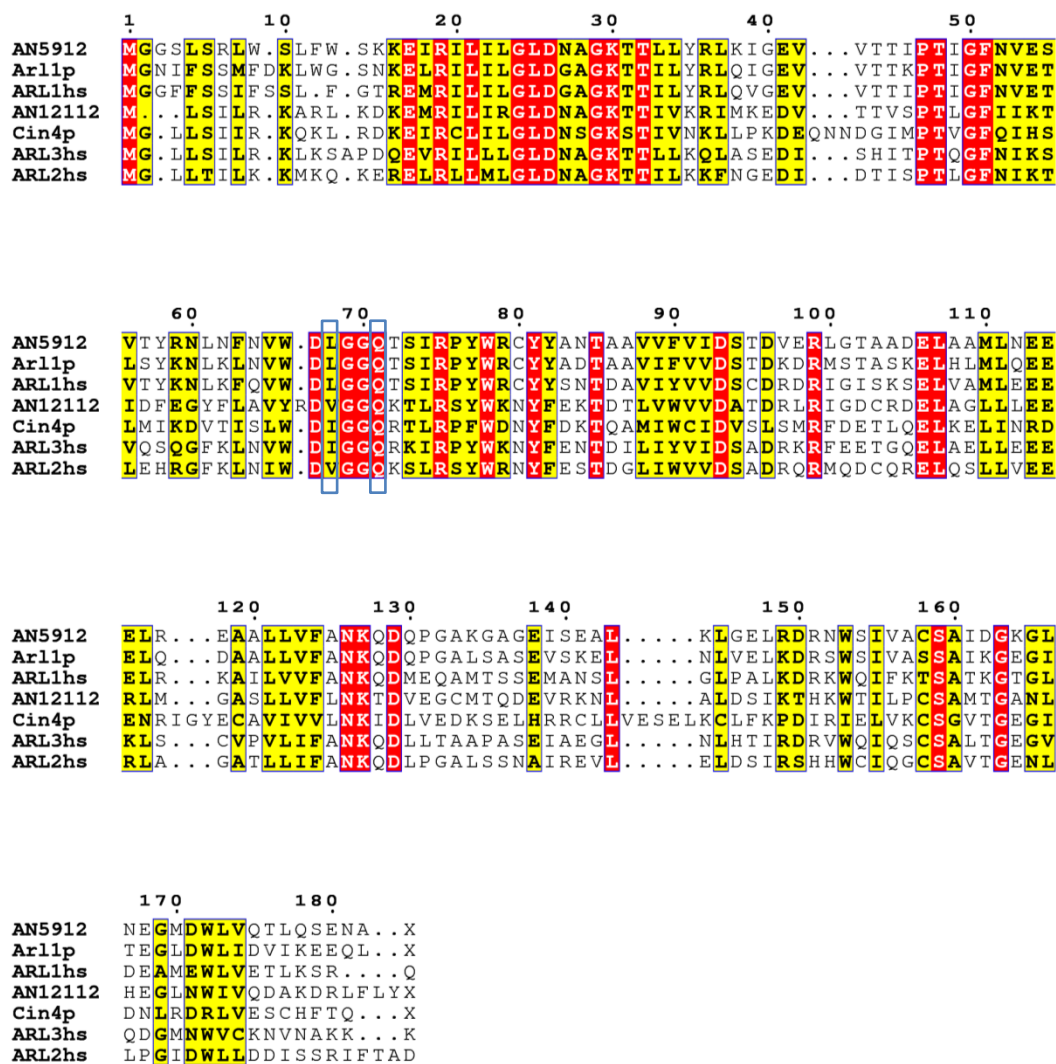
### 4.2.1. Identificación bioinformática de las proteínas de la familia Arf/Sar, de sus GEFs y de sus GAPs

#### 4.2.1.1. Identificación de las GTPasas de la familia Arf/Sar

Dentro de esta familia se encuentran Sar1, que actúa en el retículo endoplasmático (RE), las Arf del aparato de Golgi, las Arl (*Arf like protein*) y las Arf que actúan en la membrana plasmática.

##### Arl1/Arl2

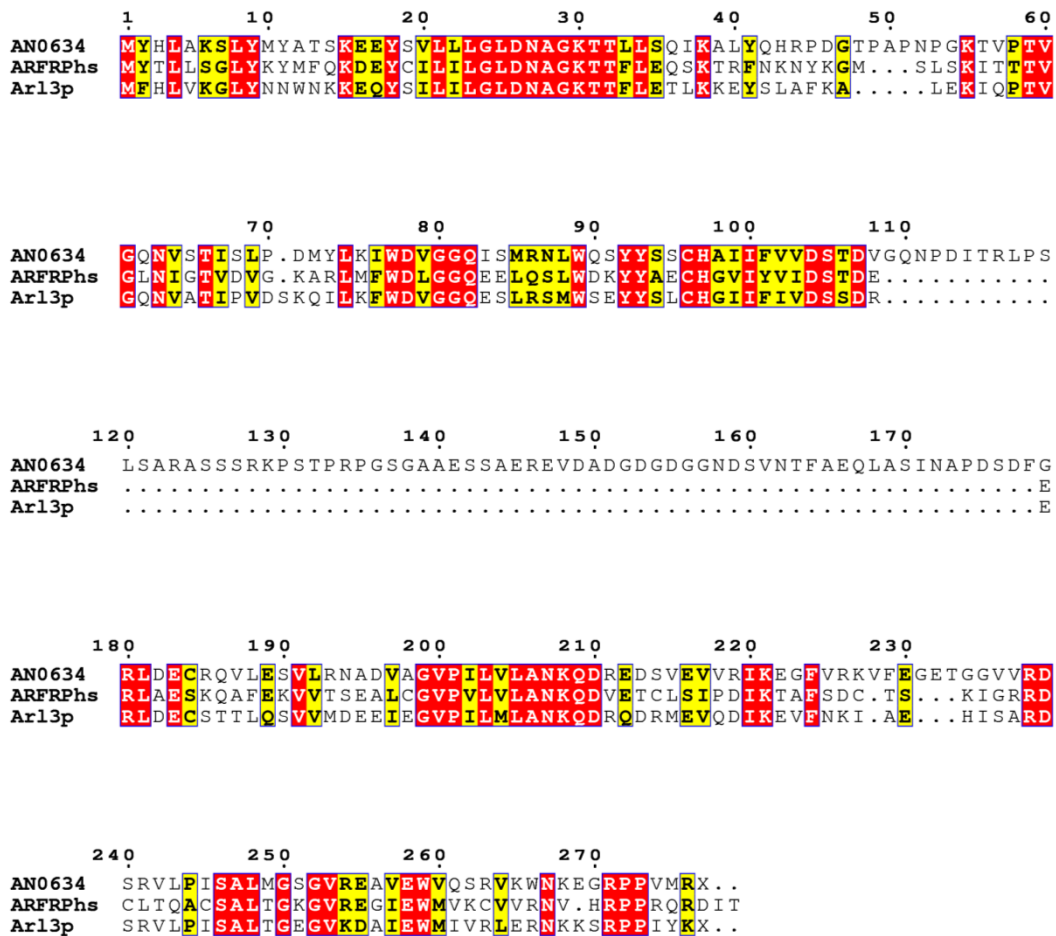
Las proteínas codificadas por AN5912 y AN12112 son homólogas a Arl1p/ARL1 y Cin4p/ARL2 (*S. cerevisiae* / *H. sapiens*), respectivamente (Figura R.13). Estas Arl se caracterizan por presentar un residuo de tirosina alrededor de la posición 77, que se encuentra en el “bolsillo de selectividad” de interacción con el dominio GRIP, un efector específico de Arl1p/ARL1. En el resto de proteínas Arf/Sar, en la posición correspondiente se encuentra un aminoácido distinto, generalmente una leucina. Esta leucina ocupa una gran parte del bolsillo de selectividad [123] para la interacción de Arl1p con el dominio GRIP. Aunque ARL2 y la proteína codificada por AN12112, también presentan dicha Tyr, la posición correspondiente a la esquina opuesta del bolsillo de selectividad está parcialmente ocluída por un residuo, lo que impide la interacción con el dominio GRIP [123]. De esta manera, pudimos diferenciar las proteínas del grupo correspondiente a Arl1p/ARL1 y del grupo de CIN4/ARL2 y sus respectivos homólogos en *A. nidulans* (Figura R.13). Denominamos Arl1 al producto de AN5912 y Arl2 al producto de AN12112.



**Figura R.13. Arl1/Ar2.** Alineamiento múltiple de secuencia. EL color rojo indica residuo invariable y el amarillo similitud de secuencia con un umbral de 0.15 usando la matriz BLOSUM62. Están recuadradas en azul la tirosina conservada en Arl1, Arl2 y sus homólogos en *A. nidulans* y la leucina o isoleucina presente en la esquina opuesta del bolsillo de selectividad para el dominio GRIP. Arl1p y Cin4p son proteínas de *S. cerevisiae* y ARL1, ARL3 y ARL2 de seres humanos.

### Arl3p/ARFRP1

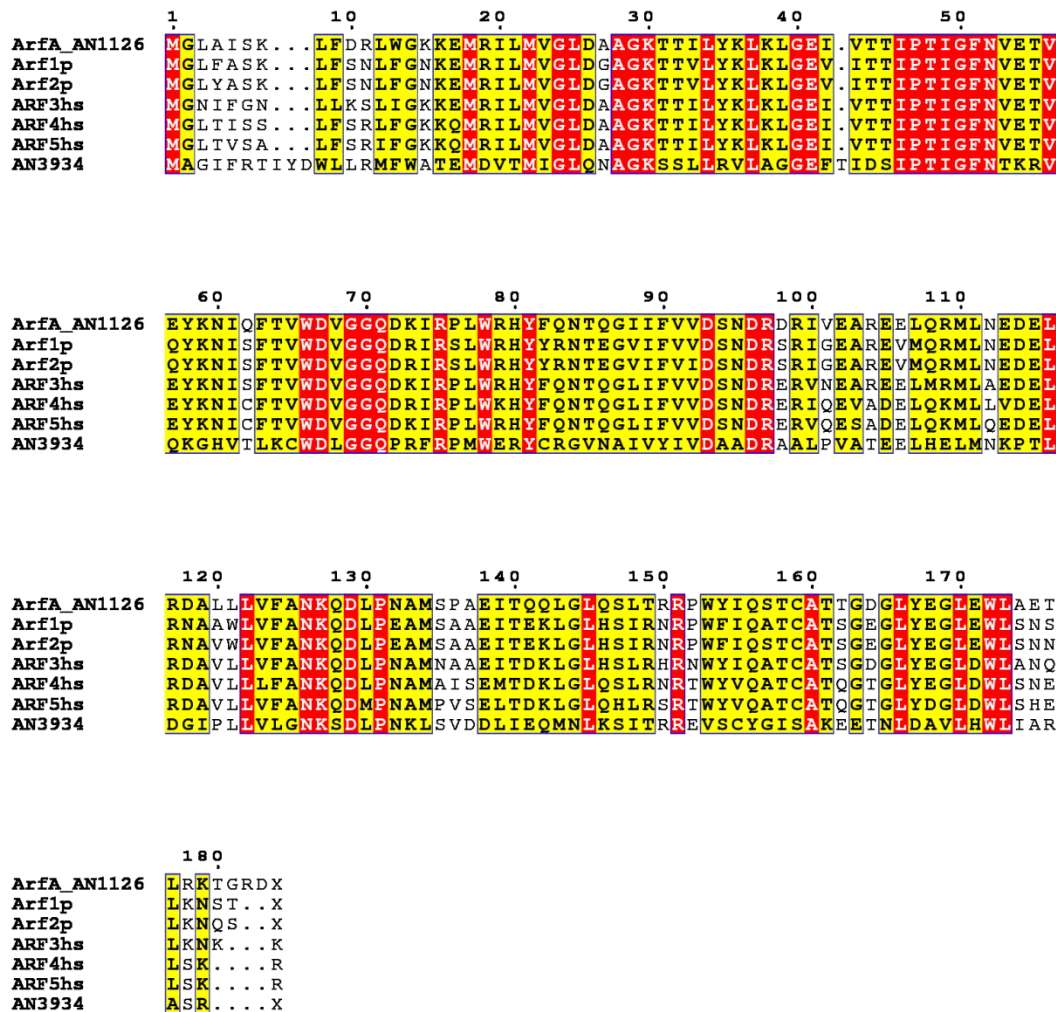
Arl3p/ARFRP1 (*S. cerevisiae*/ *H. sapiens*) es, junto a Sar1p/SAR1 y Cin4p/ARL2, la única Arf/Sar conservada en eucariotas que no presenta diana de miristoilación. La proteína codificada por el gen AN0634 no presenta una diana de miristoilación y tiene gran homología con Arl3p y ARFRP1 (Figura R.14). Denominamos Arl3 a la proteína codificada por AN0634.



**Figura R.14. Arl3p/ARFRP1.** El hueco presente en el alineamiento es, posiblemente, debido a errores en la predicción automática de los intrones del gen AN0634. Arl3p es de *S.cerevisiae* y ARFRPhs de *Homo sapiens*. Ver leyenda de la Figura R.13 para detalles del alineamiento.

Arf1

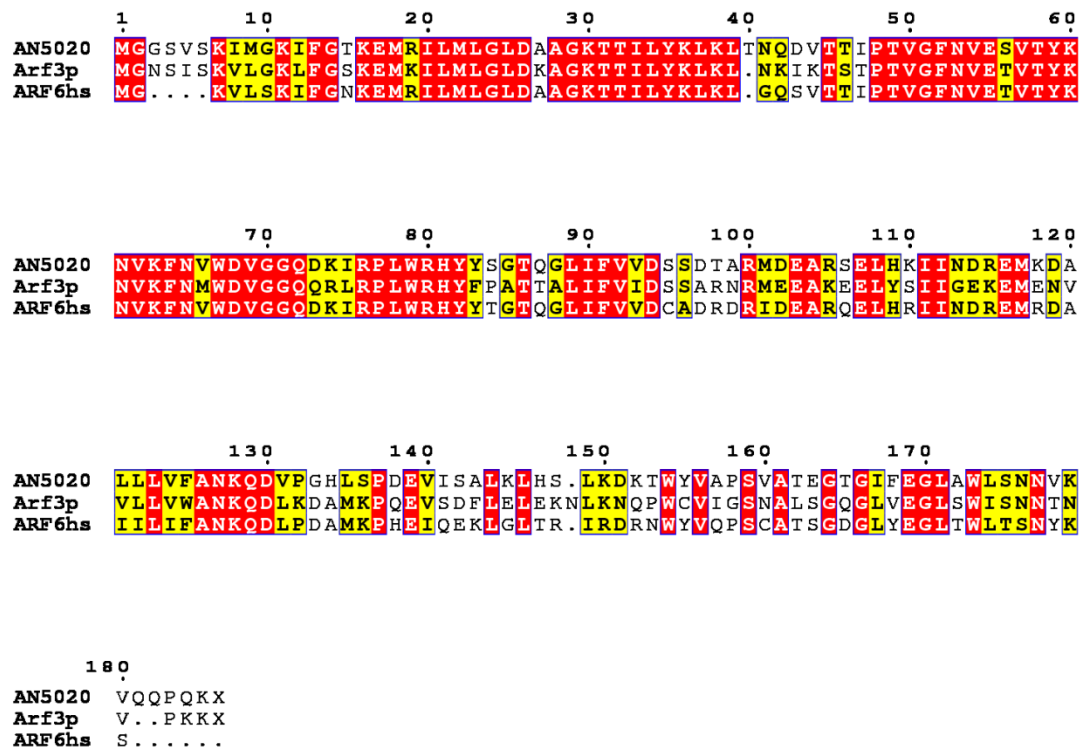
La proteína ortóloga a Arf1p ha sido descrita previamente [165], se denominó ArfA y se localiza en el aparato de Golgi [165]. Como muestra la Figura R.15, ArfA presenta una gran homología con Arf1p y Arf2p de *S. cerevisiae* y las Arf del Golgi de humanos. Por otro lado, existe otro gen en *A. nidulans* (AN3934) que codifica una proteína con gran homología con Arf1p y ArfA, pero que carece de motivo de miristoilación en el extremo N-terminal (Figura R.15), aunque sí contiene una glicina en la tercera posición. A esta GTPasa la hemos nombrado ArfX.



**Figura R.15. Arf1.** Nótese la menor homología de AN3934 (ArfX) con el resto de proteínas. Ver leyenda de la Figura R.13 para detalles del alineamiento.

### Arf3/ARF6

La proteína ortóloga a Arf3p, que ha sido descrita previamente y nombrada ArfB, se localiza principalmente en la membrana plasmática [197, 198]. Como se muestra en la Figura R.16, existe una grandísima homología entre ArfB, Arf3p de *S. cerevisiae* y la ortóloga en humanos, ARF6.



**Figura R.16. Arf3p/ARF6.** AN5020 es ArfB. Ver leyenda de la Figura R.13 para detalles del alineamiento.

Sar1

La caracterización del ortólogo de SAR1 / Sar1p en *A. nidulans* se encuentra en el capítulo I. Está codificada por el gen AN0411 y se ha denominado SarA.

**4.2.1.2. Identificación de las GEFs de las GTPasas de la familia Arf/Sar**

4.2.1.2.1. GEF de SarA: Sec12

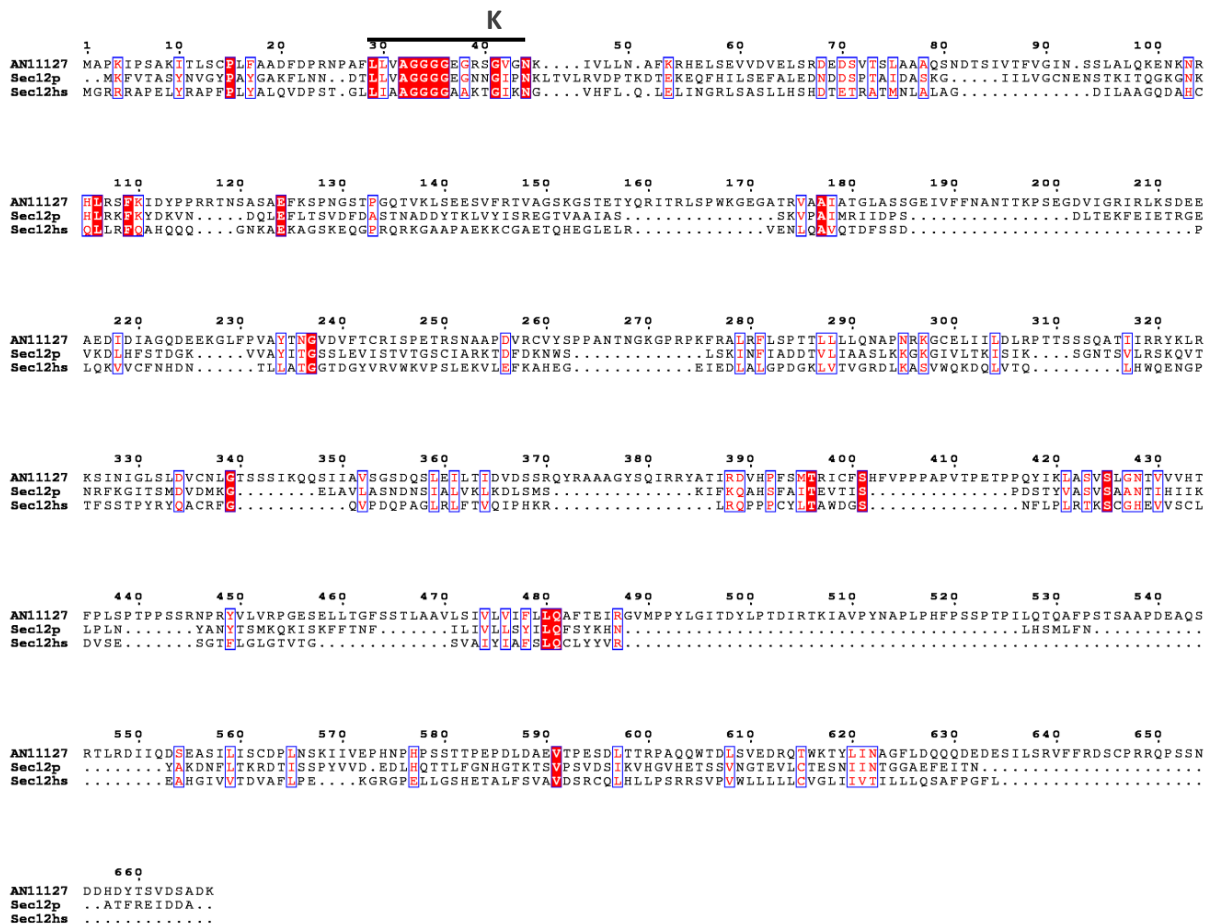
Schlacht y Dacks [192], en un estudio filogenético de los componentes del complejo COPII, habían propuesto que, en *Aspergillus fumigatus*, AFUA\_5G05910 codifica el ortólogo de Sec12. AN11127 de *A. nidulans* codifica una proteína muy parecida a la codificada por AFUA\_5G05910. Mediante un alineamiento intentamos encontrar características comunes con Sec12 de *S. cerevisiae* y Sec12 humano. La Figura R.17 muestra el alineamiento correspondiente. La secuencia no está muy conservada, excepto por una pequeña región (posiciones 29-40 de *S. cerevisiae*), que se encuentra conservada en todos los ortólogos de Sec12 y es esencial para la activación de Sar1 [199]. En la estructura de la proteína, esta región está expuesta al citosol y forma un bucle (denominado *K-loop*), esencial para la interacción con

## Capítulo II

Sar1 [199]. Esta secuencia está conservada en AN11127 de *A. nidulans*, lo que sugiere que la proteína que codifica es ciertamente el ortólogo Sec12.

Por otro lado, la topología de la proteínas coincide: Sec12p es una proteína tipo II con un paso de membrana, con el extremo N-terminal hacia el citosol, al igual que la codificada por AN11127, según el software de predicción *HMMTOP* [200]. Denominamos *sec12* al gen AN11127.

Además, amplificamos y secuenciamos el cDNA de *sec12*, confirmando la predicción de intrones y que el gen se expresa. El trabajo de caracterización de *sec12* ha sido continuado por Ignacio Bravo Plaza, estudiante de doctorado.



**Figura R.17. Sec12.** Alineamiento múltiple de secuencia (CLUSTALW) de la proteína codificada por AN11127 y de Sec12p (*Saccharomyces cerevisiae*) y Sec12 de *Homo sapiens*.

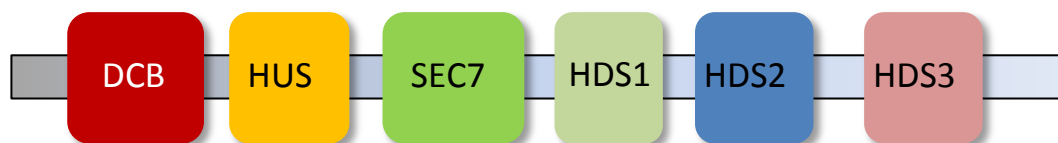
4.2.1.2.1. GEFs de las GTPasas Arf

En el caso de las GEFs de las GTPasas Arf, el dominio catalítico consiste en un módulo de ~200 aminoácidos, denominado dominio Sec7, conservado en todas las GEFs de GTPasas de la familia Arf (ver Introducción). En hongos se han establecido dos subfamilias: la subfamilia GBG (de GBF/BIG GEFs), presente en todos los eucariotas, y la subfamilia SYT1/SYT2 [130].

Subfamilia GBG

La conservación de dominios no catalíticos de la subfamilia GBG permitió encontrar los representantes de esta subfamilia en *Aspergillus nidulans*. En la Figura R.18 se muestra la arquitectura de dominios de las proteínas GBG. Mediante alineamiento de las GBGs de *S. cerevisiae* y de *Homo sapiens* con los homólogos putativos de *A. nidulans*, se pudo determinar que dichos dominios están conservados (Figuras R.19, R.20, R.21 y R.22), inclusive un motivo altamente conservado localizado en el dominio HUS (*Homology Upstream of Sec7*) [N (Y/F) DC (D/N/E)]. La proteína codificada por AN6709 se denomina HypB [25] y es homóloga de Sec7p y BIG1/2. Una segunda proteína, codificada por AN0112 es la única ortóloga de Gea1/2p y GBF. Denominamos a AN0112 *geaA* y a la proteína que codifica GeaA (para la caracterización de GeaA véase el capítulo III).

Con el objetivo de determinar si existen más proteínas de la subfamilia GBG se analizaron todas las proteínas, conocidas o predichas, codificadas en el genoma de *A. nidulans* con la secuencia consenso N (Y/F) DC (D/N/E). Existen 4 proteínas más con esta secuencia, y ninguna de ellas presenta homología significativa con la familia GBG, ni contiene un dominio Sec7.



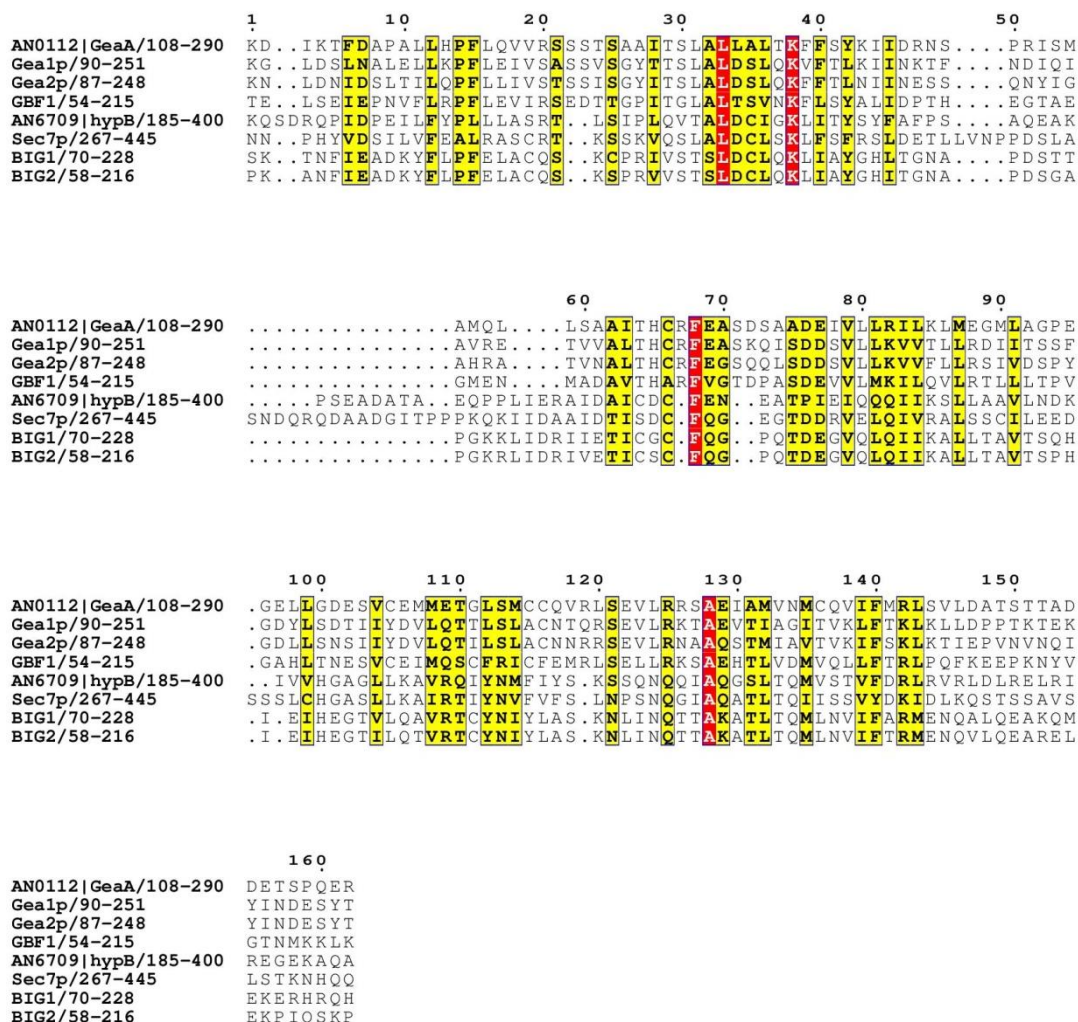
**Figura R.18. Arquitectura de dominios de la subfamilia GBG.** DCB: *Dimerization and Cyclophilin Binding*. HUS: *Homology Upstream of Sec7*. HDS1-3: *Homology Downstream of Sec7* 1-3.

Subfamilia SYT1 / SYT2

Mouratou *et al.* han establecido la existencia de esta subfamilia, que es exclusiva de hongos y está formada en *S. cerevisiae* por Syt1p y Yel1p [130]. Sin embargo, Gillingham y Munro incluyen las proteínas de esta subfamilia en la familia PSD (*PH and Sec7 domain*), ya

## Capítulo II

que contienen, además del dominio Sec7, un dominio de homología a pleckstrina (*Pleckstrin homology*, PH), de interacción con fosfoinosítidos [7]. En *A. nidulans* existen 2 genes (AN6120 y AN3438) que codifican proteínas con un dominio Sec7 y un dominio PH, predicho por InterPro y SMART. Por tanto, las proteínas codificadas por AN6120 (Syt1a) y AN3438 (Syt1b) pertenecen a esta subfamilia.



**Figura R.19. Dominio DCB en la familia GBG.** Alineamiento múltiple de secuencia del dominio DCB conservado en la familia GBG. Rojo indica residuo invariable y amarillo similitud de secuencia con un umbral de 0.15 usando la matriz BLOSUM62.

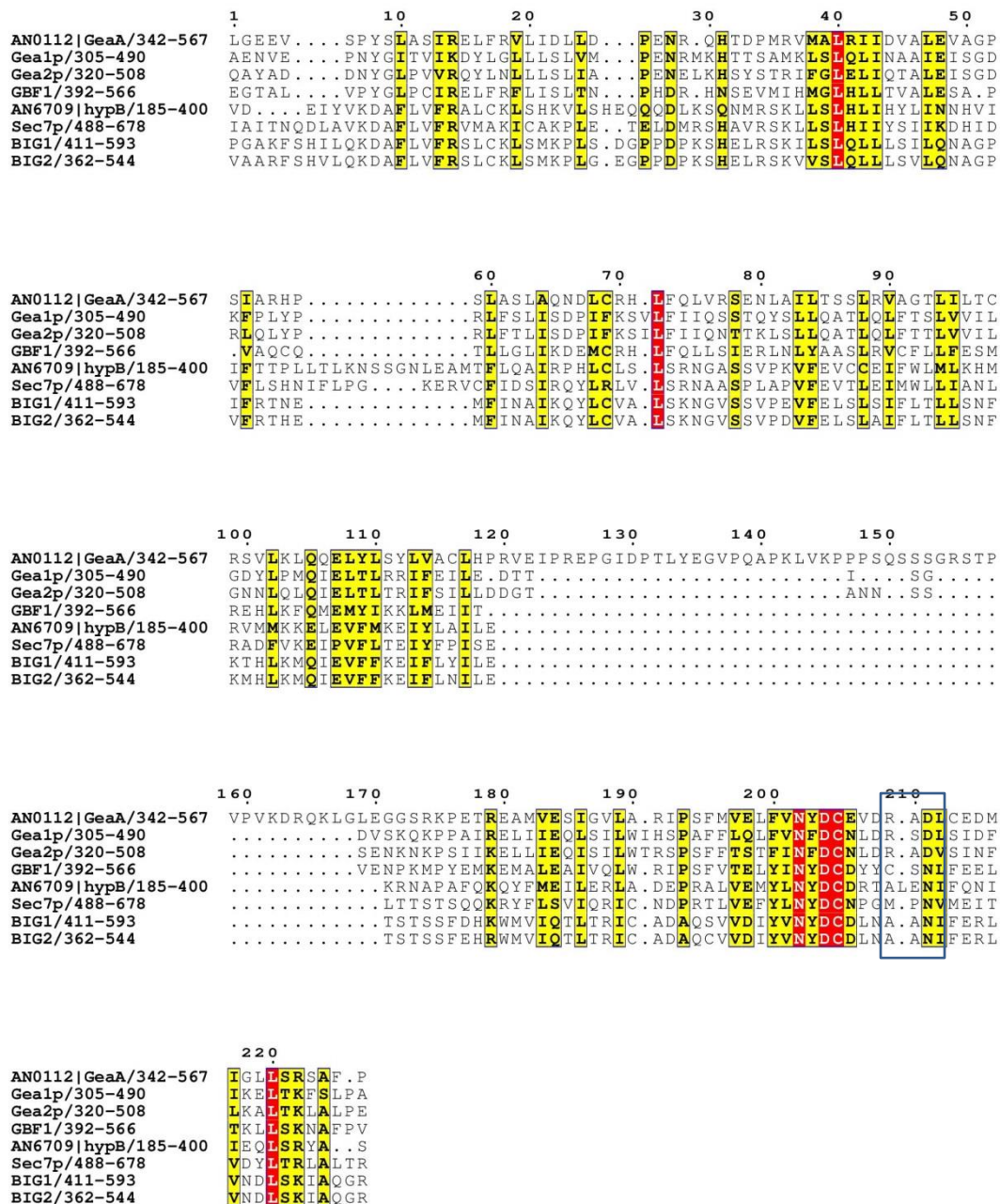
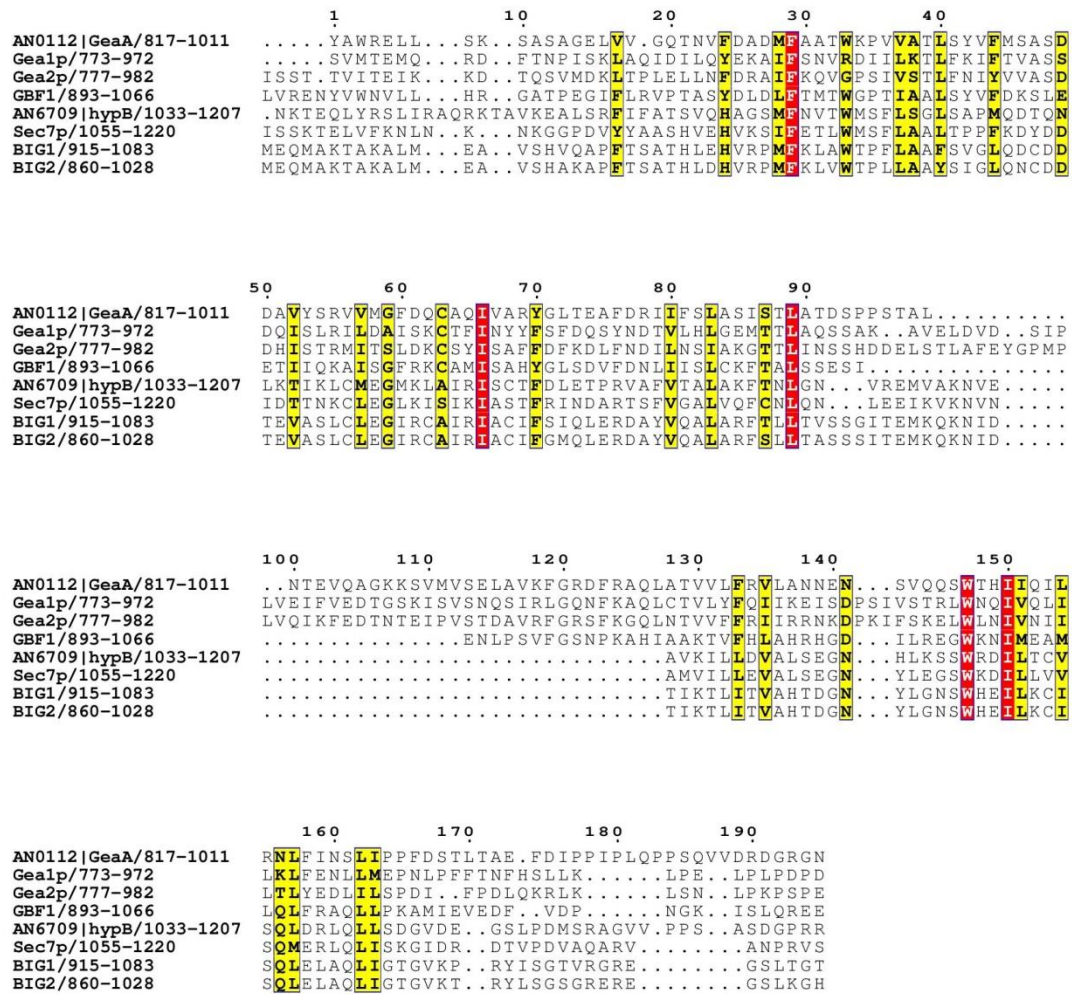


Figura R.20. Dominio HUS en la familia GBG. Está recuadrada en azul la secuencia consenso del motivo N (Y/F) DC (D/N/E), del dominio HUS. Ver leyenda de la Figura R.13 para detalles del alineamiento.

## Capítulo II



**Figura R.21. Dominio HDS1 en la familia GBG.** Ver leyenda de la Figura R.13 para detalles del alineamiento.

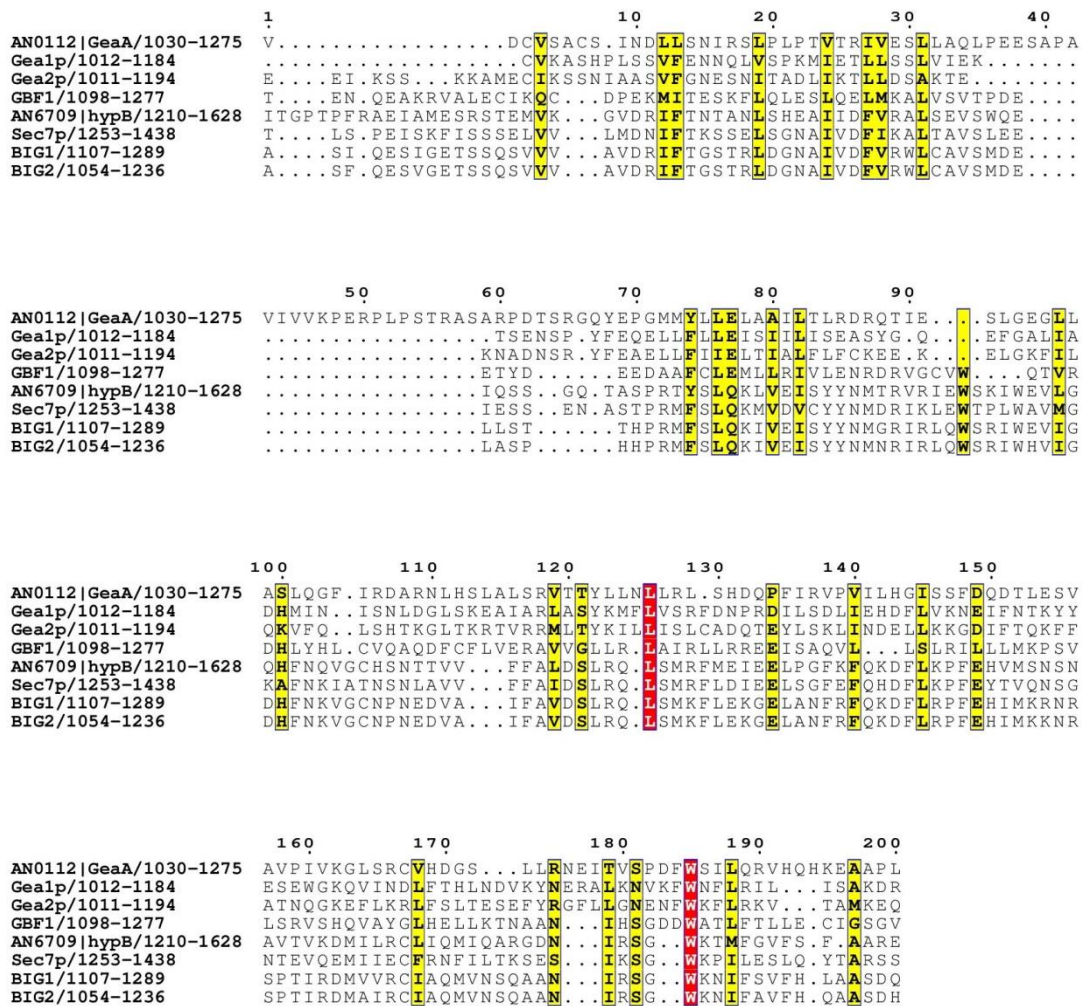


Figura R.22. Dominio HDS2 en la familia GBG. Ver leyenda de la Figura R.13 para detalles del alineamiento.

#### 4.2.1.3. Identificación de las GAPs de las GTPasas de la familia Arf/Sar

Las GAP de Arf promueven la hidrólisis del GTP mediante su característico dominio ArfGAP. La GAP de Sar1 (Sec23p) está identificada en *A. nidulans* [24] y no presenta características comunes con las GAP de Arf.

Dentro de las proteínas ArfGAP existen varias familias [7]. En *S. cerevisiae* existen dos representantes de la familia ArfGAP1 [7]: Gcs1p y Gts1p. Gcs1p contiene, además del dominio ArfGAP, el motivo ALPS (*ArfGAP1 Lipid Packing Sensor*) [98]. La proteína codificada por AN2222 posee una alta homología con Gcs1p (Figura R.23) y contiene, en la región que alinea con el motivo ALPS de Gcs1p, una secuencia de aminoácidos con las características específicas del motivo ALPS: una región rica en serinas y treoninas y con la secuencia *GppG* ó *GpppG*, donde *G* es un aminoácido grande y *p* un residuo pequeño. Por tanto, denominamos a AN2222 *gcs1*.

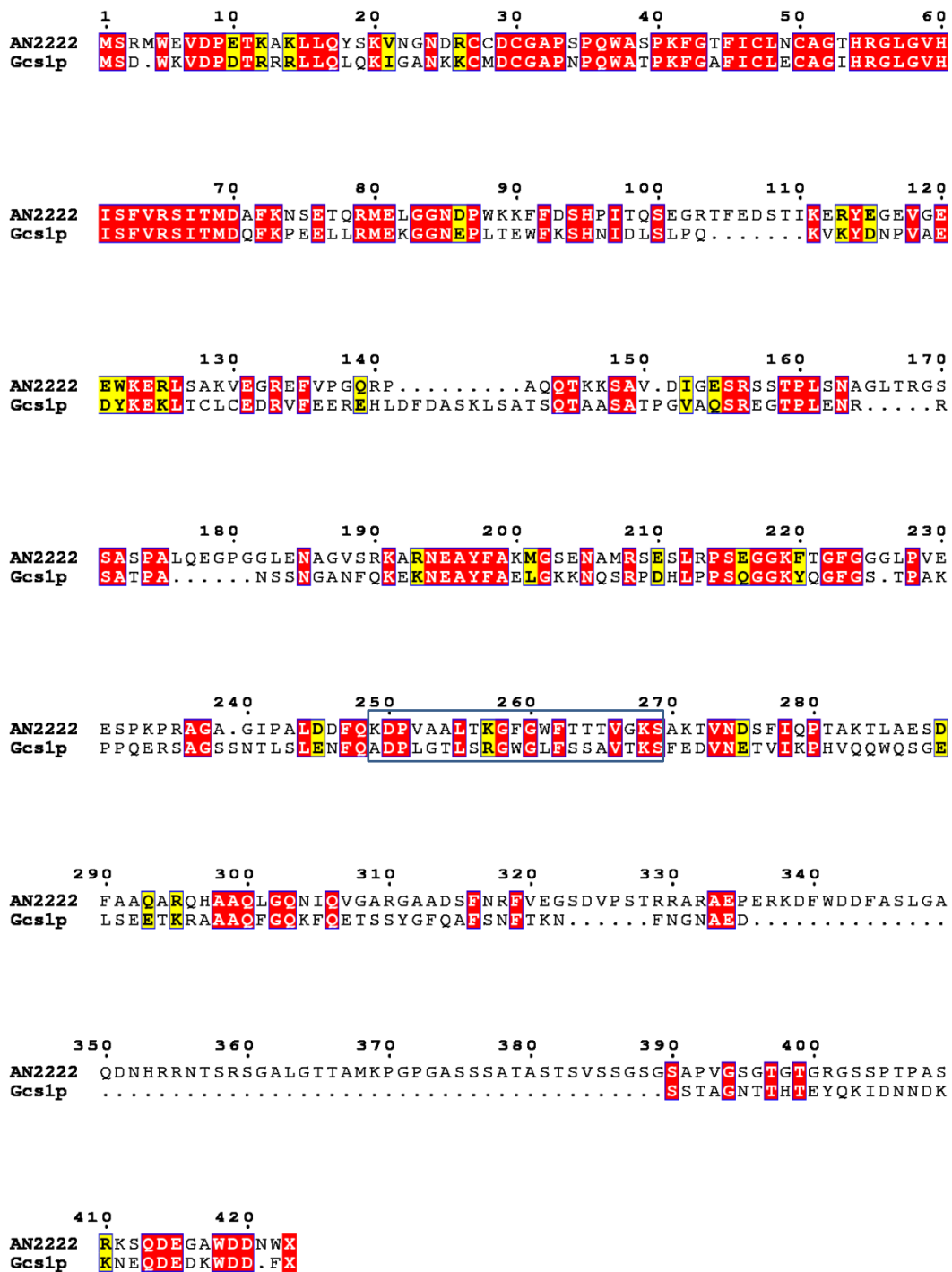
## Capítulo II

---

Gts1p, además de tener un dominio ArfGAP, contiene un motivo UBA (*Ubiquitin-associated*), y una secuencia C-terminal poli (A-Q) y poli Q. Estas características se cumplen en la proteína codificada por AN1629, que denominamos Gts1.

La familia ArfGAP3 está formada únicamente por Glo3p en *S. cerevisiae*. Esta GAP contiene, además del dominio ArfGAP, un motivo ISxxxFG duplicado, donde x es cualquier aminoácido, motivo también presente en las GAP de esta familia en mamíferos. Denominamos *glo3* a AN6033, ya que codifica una proteína con el dominio ArfGAP que además posee dicho motivo ISxxxFG duplicado.

Finalmente Age1p y Age2p son los representantes en *S. cerevisiae* de la familia SMAP1. En mamíferos, esta familia presenta un dominio de unión a clatrina [7]. La proteínas con dominio ArfGAP codificada por AN1931 y AN4274 presenta cierta homología con estas GAP, que denominamos Age1a y Age1b, respectivamente. Sin embargo, la mitad N-terminal de Age1b contiene un dominio de homología con Pleckstrina (PH). Aunque en *S. cerevisiae* no existe ninguna proteína con dominio ArfGAP que contenga un dominio PH, en mamíferos existen varias [7].



**Figura R.23. Gcs1.** El motivo ALPS de Gcs1p está recuadrado en azul. Ver leyenda de la Figura R.13 para detalles del alineamiento.

## Capítulo II

**Tabla R.4. La familia Arf/Sar en *Aspergillus nidulans* y sus proteínas reguladoras.**

| <i>Aspergillus nidulans</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Homo sapiens</i>                                 | Características para identificación  |
|-----------------------------|---------------------------------|---|--|
| <b>Arf/Sar</b>              |                                 |   |  |
| AN0634 Arl3                 | Arl3p                           | ARFRP1  | Sin secuencia de miristoilación /gran similitud de secuencia   |
| AN5912 Arl1                 | Arl1p                           | ARL1  | Residuos específicos para interacción con dominio GRIP / gran similitud de secuencia   |
| AN12112 Arl2                | Cin4p                           | ARL2/ARL3   | Sin secuencia de miristoilación /gran similitud de secuencia   |
| AN3934 ArfX                 |                                 |   | Homología con Arf del aparato de Golgi   |
| AN1126 ArfA                 | Arf1p /Arf2p                    | ARF1/ARF3/<br>ARF4/ARF5                             | Descrita previamente [165]/gran similitud de secuencia   |
| AN0411 SarA                 | Sar1p                           | SAR1A /<br>SAR1B                                    | Estudio mutacional/gran similitud de secuencia   |
| AN5020 ArfB                 | Arf3p                           | ARF6  | Descrita previamente [198]/ Gran similitud de secuencia  |
| <b>GEF de Sar1</b>          |                                 |   |  |
| AN11127 Sec12               | Sec12p                          | SEC12   | K-loop/topología   |
| <b>GEFs de Arf</b>          |                                 |   | <b>Dominio Sec7</b>  |
| AN6709 HypB                 | Sec7p                           | BIG1/BIG2   | Descrita previamente [25]/Dominios funcionales conservados / secuencia consenso N (Y/F) DC (D/N/E)/ similitud de secuencia                             |
| AN0112 GeaA                 | Gea1p/Gea2p                     | GBF1  | Dominios funcionales conservados / secuencia consenso N (Y/F) DC (D/N/E) / similitud de secuencia / mutante supresor de la esencialidad de <i>hypB</i> |
| AN3438 Syt1a                | Syt1p/Yel1p                     |   | Dominio PH   |
| AN6120 Syt1b                | Syt1p/Yel1p                     |   | Dominio PH   |
| <b>GAPs de Arf</b>          |                                 | <b>Dominio ArfGAP</b>                               |  |
| AN2222 Gcs1                 | Gcs1p                           | Motivo ALPS / similitud de secuencia                |  |
| AN1931 Age1a                | Age1p/Age2p                     | similitud de secuencia                              |  |
| AN4274 Age1b                | Age1p/Age2p                     | similitud de secuencia / dominio PH                 |  |
| AN6033 Glo3                 | Glo3p                           | Motivo ISxxxFG duplicado / homología                |  |
| AN1629 Gts1                 | Gts1p                           | Dominio UBA / extremo C-terminal poli (A-Q) y poliQ |  |

#### 4.2.2. Delección sistemática de los genes de la familia ARF, de sus GEFs y de sus GAPs

Para tener una visión general de la importancia la función fisiológica de las diferentes GTPasas de esta familia, procedimos a delecionar los genes que las codifican, así como los correspondientes a sus GEFs y sus GAPs. Para ello, utilizamos el marcador de selección *pyrG<sup>fum</sup>* (gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*) fusionado a regiones 5' y 3' flanqueantes del marco abierto de lectura de cada gen. Con estas casetes transformamos una cepa *pyrG89* de *A. nidulans*, auxótrofa para pirimidinas, para sustituir la región codificante completa de cada gen por *pyrG<sup>fum</sup>*. Estas casetes las obtuvimos normalmente del Fungal Genetics Stock Centre [180] y, en los casos en que no estaban disponibles, las construimos por PCR de fusión. En todas las transformaciones comprobamos, mediante el método de rescate de heterocariontes [187], si las respectivas delecciones eran letales (ver esquema en Figura R.25). En los casos en que la delección de un gen provocase letalidad, comprobamos la presencia de núcleos silvestres y núcleos con el gen delecionado mediante Southern Blot, excepto en el caso de *hypB*, que lo genotipamos por PCR. Por otro lado, cuando la delección no fue letal, comprobamos mediante Southern-blot la correcta delección del gen objetivo y determinamos el fenotipo de la cepa mediante test de crecimiento en placa con diferentes medios y temperaturas de incubación (Figuras R.24, R.25 y R.26).

Las delecciones de los genes que codifican las GTPasas ArfA y ArfB y la GEF HypB, se habían estudiado previamente [25, 165, 197]. Sin embargo, decidimos recomprobar las delecciones de *arfA* y de *hypB* por su importancia en la ruta secretora y en el trabajo que íbamos a acometer a continuación.

##### 4.2.2.1. Las GTPasas SarA, ArfA y Arl2 son esenciales

Del total de siete genes que codifican GTPasas de la familia Arf/Sar, tres de ellos resultaron ser esenciales para el crecimiento (Figura R.24). Entre ellos está *sarA*, que se requiere para el tráfico del RE al aparato de Golgi y está implicada en la biogénesis de dicho orgánulo (ver capítulo I para detalles de la delección de *sarA*). El segundo gen esencial es *arfA*. ArfA es crítico (previsiblemente) para la función del Golgi. De hecho la delección simultánea de los dos ortólogos de *S. cerevisiae* (*ARF1* y *ARF2*) es letal [201]. La tercera GTPasa esencial es Arl2 (codificada por AN12112). Sin embargo, su ortólogo en *S. cerevisiae*, Cin4p no es esencial para el crecimiento.

Además de estos tres “casos esenciales”, la delección de *arfB* provocó la formación de microcolonias que, pese a su crecimiento tan enfermo, fueron capaces de reproducirse tanto asexual como sexualmente. ArfB se requiere para la endocitosis [158]. La delección de las otras tres GTPasas restantes (*arl1*, *arl3* y *arfX*) no provocó ningún defecto de crecimiento ni en

## Capítulo II

---

medio mínimo ni en medio completo a 25°C, 30°C, 37°C y 42°C (Figura R.24). La delección de *ARL1* y *ARL3* en *S. cerevisiae* tampoco altera el crecimiento silvestre [202].

### 4.2.2.2. *Sec12*, *HypB* y *GeaA* son GEFs de *Arf/Sar* esenciales

*HypB* y *GeaA* son las GEF putativas de *ArfA* en el aparato de Golgi. Ambas son esenciales para el crecimiento (Figura R.25). En concordancia con estos resultados la delección simultánea de *GEA1* y *GEA2* en *S. cerevisiae* es letal [77], al igual que la delección de *SEC7* [203]. Por otro lado la delección de *sec12* (AN1127), la posible GEF de *sarA*, fue letal (Figura R.25). Por tanto, las GEF de proteínas G esenciales son también esenciales para el crecimiento.

Finalmente, mientras que la delección de *syt1a* (AN3438) no alteró el crecimiento, la cepa *syt1bΔ* (AN6120Δ) tiene un defecto claro en la esporulación. Este defecto en esporulación es termosensible (Figura R.25).

### 4.2.2.3. *Age1a* es la única GAP de *Arf* esencial en *Aspergillus nidulans*

De las 5 GAPs identificadas, solamente *Age1a* (codificada por AN1931) es prácticamente indispensable para el crecimiento. La delección de *age1a* provoca letalidad a 30°C y 37°C; sin embargo, permite la formación de microcolonias a 42°C (Figura R.26). Esto demuestra un menor requerimiento de esta proteína a 42°C. El resto de delecciones no afectan al crecimiento en los medios ensayados, con la excepción de *glo3Δ* (AN6033Δ), que crece menos que una cepa silvestre a 42°C (Figura R.26).

### 4.2.2.4. Estudio preliminar de *gcs1Δ*

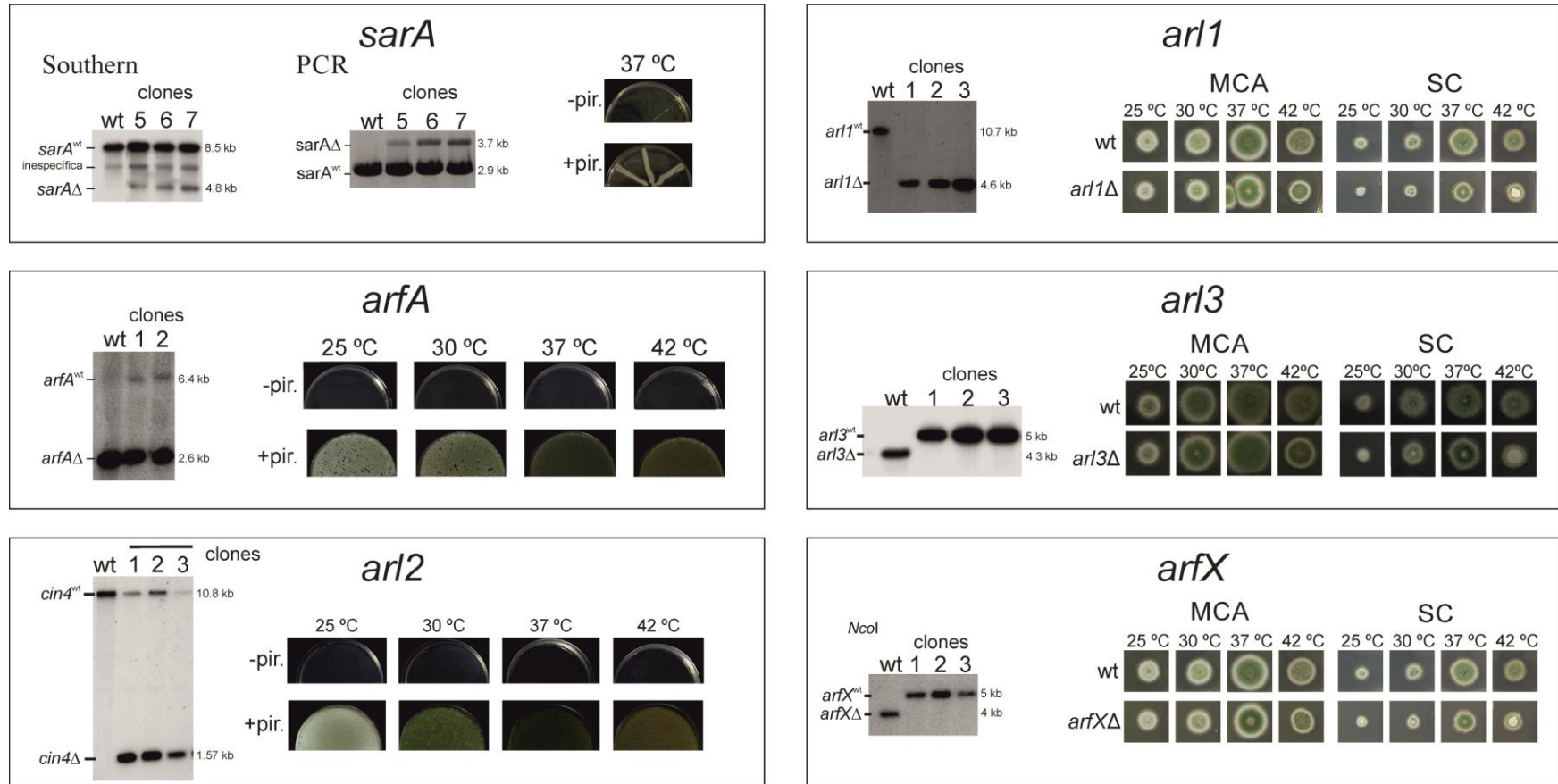
Dado que en este trabajo estábamos interesados en estudiar el tráfico de salida de *cargo* desde el aparato de Golgi decidimos investigar la función de *Gcs1*. Esta proteína contiene un motivo ALPS, sensor de curvatura [98]. Este motivo hipotéticamente permitiría el reclutamiento de *Gcs1* a membranas donde se estuviese formando una vesícula de secreción. Este reclutamiento inactivaría la GTPasa *Arf* que estuviese mediando el proceso, completándose la formación de la vesícula y liberándose dicha GTPasa —se ha relacionado *Gcs1* de manera específica con *Arl1* [202]—. Por otro lado, *age1b* (AN4274) codifica una GAP con un dominio PH, de interacción con lípidos. Pese a las investigaciones ya hechas, se sabe poco sobre requerimiento de proteínas sensoras de lípidos o de curvatura en el proceso de salida de *carriers* del aparato de Golgi. *Gcs1p* y *Age1b* son las dos únicas GAP de *Arf* con un dominio sensor de lípidos. Con la hipótesis de que, al menos se necesitaría una GAP de *Arf* con sensor de curvatura para la salida de *cargo* del Golgi, construimos el doble mutante *gcs1Δ age1bΔ*. Sin embargo, el crecimiento de esta cepa doble mutante fue indistinguible al de una cepa wt (Figura

R.27). Por lo tanto, rechazamos nuestra hipótesis de que la doble delección de *gcs1* y *age1b* (AN4274) sería muy nociva. Por otro lado determinamos la localización de SynA, como marcador de exocitosis, en una cepa *gcs1Δ*. En esta cepa, GFP-SynA se localiza como en una cepa wt (Figura R.27).

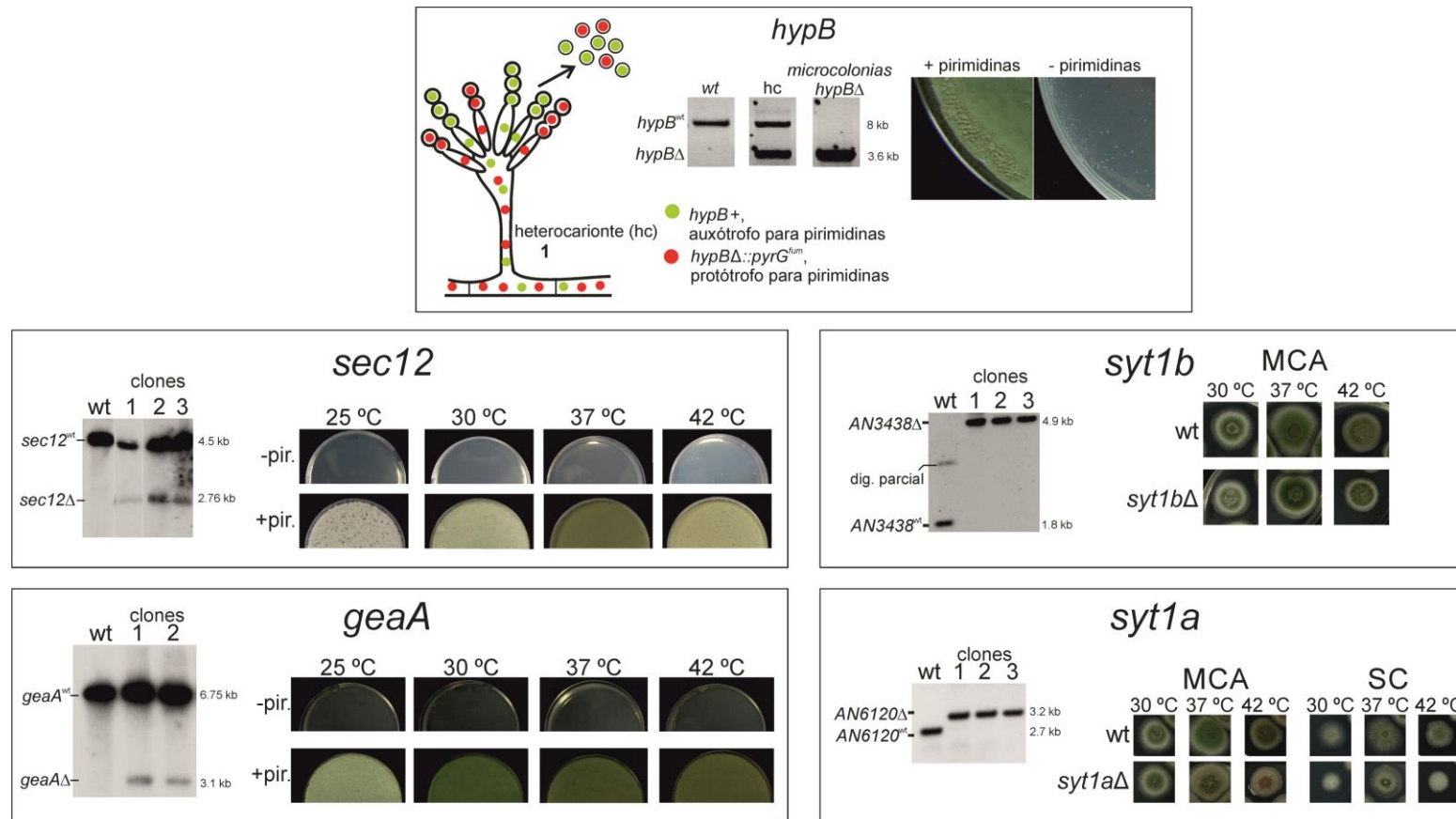
Finalmente, para abordar mediante interacciones sintéticas la posibilidad de que Gcs1 en tuviese un papel en la exocitosis, construimos los dobles mutantes *gcs1Δ rabDΔ*, *gcs1Δ synAΔ* y *gcs1Δ rabCΔ*. La cepa doble mutante *gcs1Δ rabDΔ* crece peor que los mutantes simples *gcs1Δ* y *rabDΔ*. Por lo tanto, ambas delecciones presentan una interacción sintética negativa. RabD (Sec4p en *S. cerevisiae*) está implicado en la fusión de las vesículas de exocitosis con la membrana plasmática. Por lo tanto, este resultado sugiere que Gcs1 está implicada en una ruta alternativa de transporte de *cargo* a la membrana plasmática, quizá al nivel de la salida del Golgi. El resto de mutaciones no mostraron un efecto sintético.

**Tabla R.5. Delección de los genes de la familia Arf/Sar y sus proteínas reguladoras.**

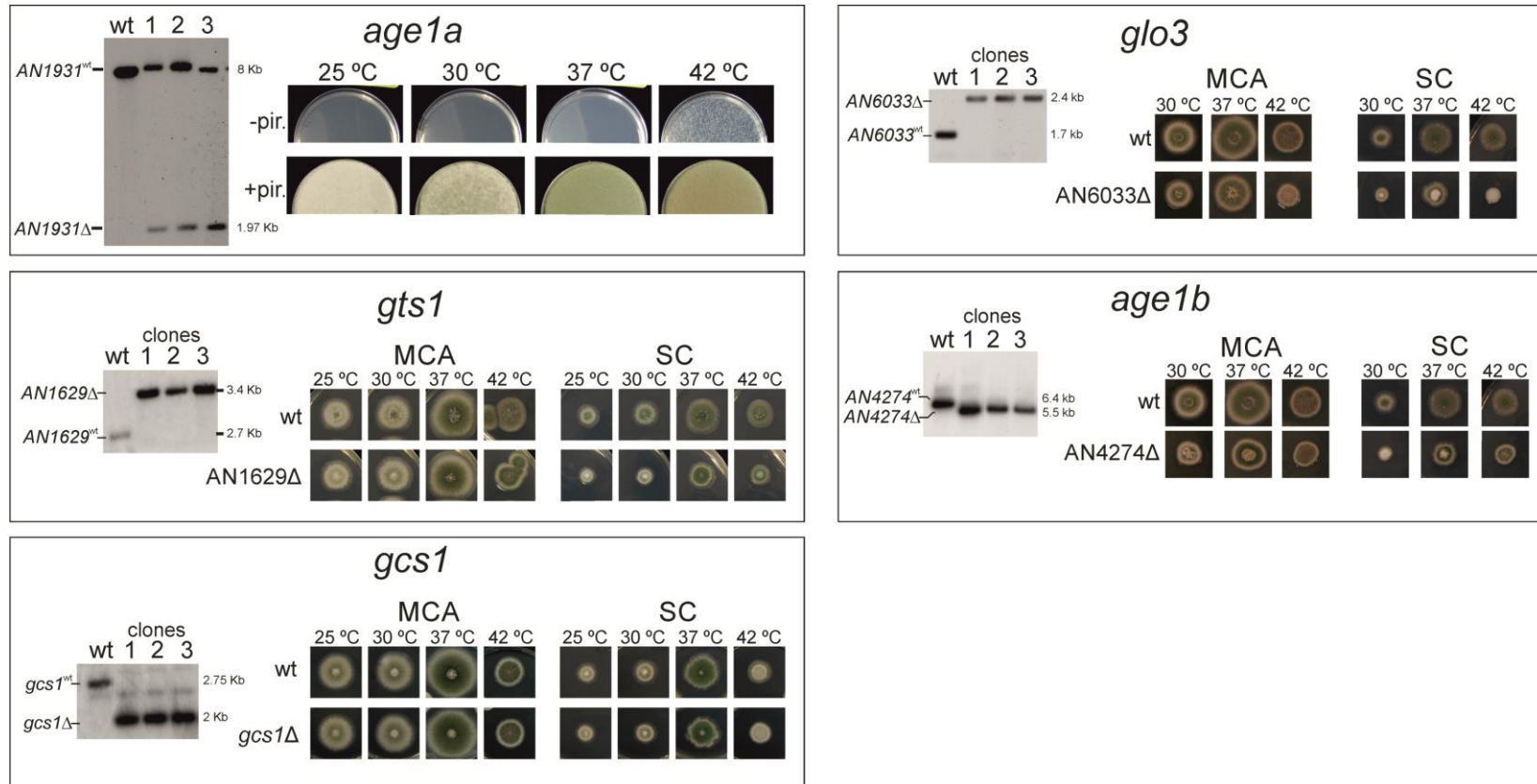
| <i>Aspergillus nidulans</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Fenotipo de la cepa knockout                          |
|-----------------------------|---------------------------------|---|
| <b>Arf/Sar</b>              |                                 |   |
| AN0634 Arl3                 | <i>ARL3</i>                     | Silvestre   |
| AN5912 Arl1                 | <i>ARL1</i>                     | Silvestre   |
| AN12112 Arl2                | <i>CIN4</i>                     | Letal   |
| AN3934 ArfX                 |                                 | Silvestre   |
| AN1126 ArfA                 | <i>ARF1/ARF2</i>                | Letal   |
| AN0411 SarA                 | <i>SAR1</i>                     | Letal   |
| AN5020 ArfB                 | <i>ARF3</i>                     | Microcolonias   |
| <b>GEF de Sar1</b>          |                                 |   |
| AN11127 Sec12               | Sec12p                          | Letal   |
| <b>GEFs de Arf</b>          |                                 |   |
| AN6709 HypB                 | Sec7p                           | Letal   |
| AN0112 GeaA                 | Gea1p/Gea2p                     | Letal   |
| AN3438 Syt1a                | Syt1p/Yel1p                     | Silvestre   |
| AN6120 Syt1b                | Syt1p/Yel1p                     | Esporulación reducida a 37°C, casi inexistente a 42°C |
| <b>GAPs de Arf</b>          |                                 |   |
| AN2222 Gcs1                 | Gcs1p                           | Silvestre   |
| AN4274 Age1b                | Age1p/Age2p                     | Silvestre   |
| AN1931 Age1a                | Age1p/Age2p                     | Letal a 30°C y 37°C; microcolonias a 42°C             |
| AN6033 Glo3                 | Glo3p                           | Silvestre a 30°C y 37°C, ligeramente afectado a 42°C. |
| AN1629 Gts1                 | Gts1p                           | Silvestre   |



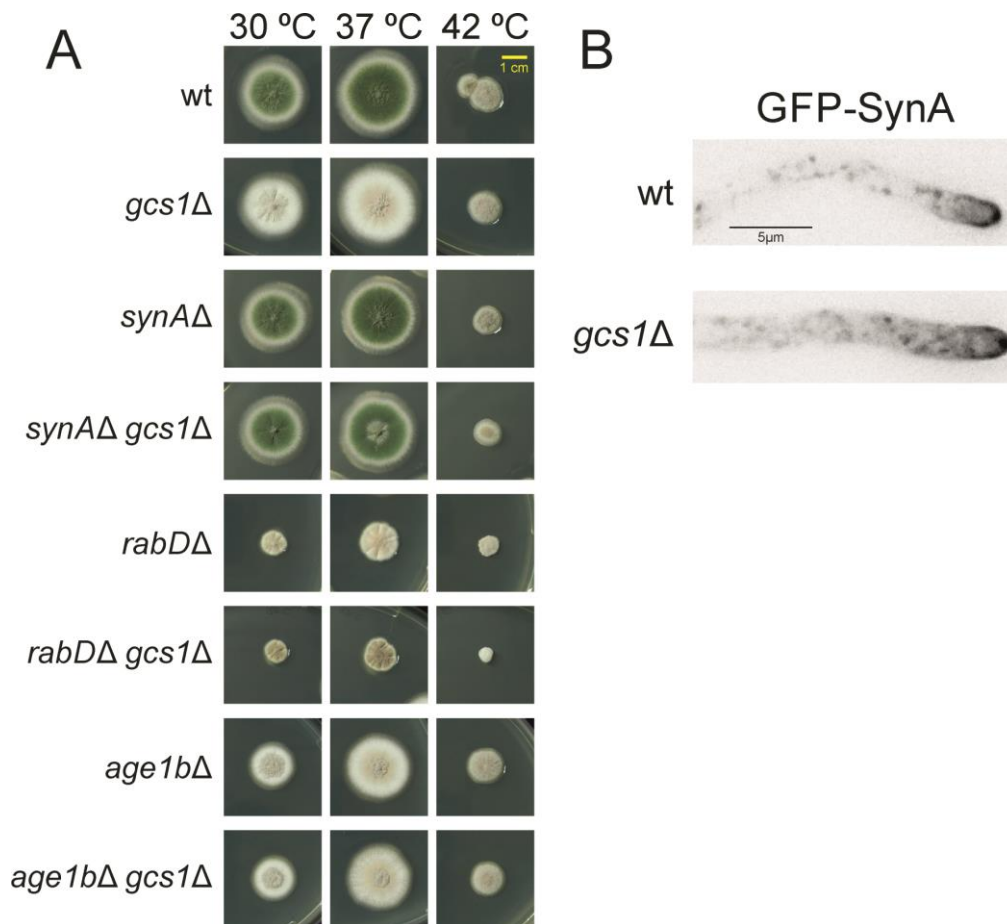
**Figura R.24. Delección de las GTPasas de la familia Arf/Sar.** En cada panel se muestra el genotipado por Southern blot (izquierda), excepto en el caso de *sarA* que también se genotipó por PCR con oligonucleótidos del locus de *sarA* externos a la construcción. En todos los Southern-blots la sonda hibrida en el locus mutado, tanto si el alelo es wt como si es nulo y las digestiones se diseñaron para visualizar bandas de distinto tamaño para cada uno de los dos alelos. A la derecha se muestra un test de crecimiento. En el caso de que la delección fuese letal se muestra el crecimiento de una solución de esporas procedente de las colonias heterocariontes  $\Delta$ /wt crecidas en medio con y sin pirimidinas (pir.), excepto en el caso de *sarA*, donde sólo se comprobó el crecimiento a 37°C por estriación. *sarA*, *arfA* y *arl2* son genes esenciales.



**Figura R.25. Delección de las GEF de GTPasas de la familia Arf/Sar.** Similar a la Figura R.24. *hypB*, *sec12* y *geaA* son genes esenciales. Se muestra una representación esquemática del análisis de los transformantes heterocariontes *hypBΔ::pyrG<sup>fum</sup>*; *hypB*<sup>+</sup>, aplicable al resto de deleciones letales. Los transformantes heterocariontes, que contienen núcleos transformados y no transformados producen esporas uninucleadas. Las esporas *hypB*<sup>+</sup> no crecen en medio sin pirimidinas, lo que permite comprobar el crecimiento de las esporas *hypBΔ::pyrG<sup>fum</sup>*, que forman microcolonias aconidiales a 30 y 37 °C. Excepcionalmente, fuimos capaces de extraer DNA de las microcolonias que forma *hypBΔ*, y genotiparlas mediante PCR.



**Figura R.26. Delección de las GAP de GTPasas de la familia Arf/Sar.** Similar a la Figura R.24. *age1a* es un gen esencial, con la excepción de que, a 42°C, es capaz de formar microcolonias.



**Figura R.27. Caracterización de *gcs1Δ*.** A. Las diferentes estirpes fueron sembradas en una misma placa para cada temperatura. El medio de cultivo era MCA y fueron crecidas durante 3 días. Este test muestra que *gcs1Δ* presenta interacción sintética negativa con *rabDΔ*, pero no con el resto de deleciones. Nótese que las cepas *gcs1Δ*, *rabDΔ*, *rabDΔ gcs1Δ*, *age1bΔ* y *gcs1Δ age1bΔ* tienen, además, la mutación wA4 que provoca la formación de conidiosporas blancas. *age1b* es AN4274. B. La localización de GFP-SynA no se altera por la deleción de *gcs1*.

# Capítulo III

### 4.3. Capítulo III. Supresión de la letalidad de *hypB*Δ (*SEC7*Δ)

*hypB* codifica una GEF de Arf, denominada HypB o Sec7, que pertenece a la subfamilia BIG/Sec7 [25, 130] y que se localiza específicamente en las cisternas del TGN [24]. La delección de *hypB* es prácticamente letal (ver capítulo II); de hecho, determinamos que el fenotipo “terminal” de *hypB*Δ es de microcolonias aconidiales (Figura R.28). *hypB5* es un alelo termosensible de *hypB* que permite un crecimiento normal a 30°C y lo impide a 42°C [204, 205] (Figura R.28). Este mutante codifica una proteína HypB con la sustitución Ala180Pro en el dominio catalítico de la GEF, denominado dominio Sec7, que inactivaría su función GEF a la temperatura restrictiva. De hecho, cuando se incrementa la temperatura de cultivo de las células *hypB5* de 28°C a 37°C se detiene la extensión apical y deslocaliza la SNARE exocítica SynA del domo apical a estructuras intracelulares [18, 36]. Nos propusimos utilizar el mutante termosensible *hypB5* para buscar mutaciones supresoras del papel esencial de *hypB*.

#### 4.3.1. Caracterización de *geaA1*, un supresor extragénico de *hypB*Δ (*sec7*)

Mediante mutagénesis con ultravioleta de una cepa *hypB5* seleccionamos un total de 40 colonias capaces de crecer a 42°C. De estos 40 clones, 39 contenían mutaciones supresoras intragénicas en *hypB5*, mientras que uno tenía el alelo *hypB5* original, sin cambios en su secuencia (Tabla R.6). La mutación supresora que esta última estirpe debía contener fue denominada *suA1hypB5*.

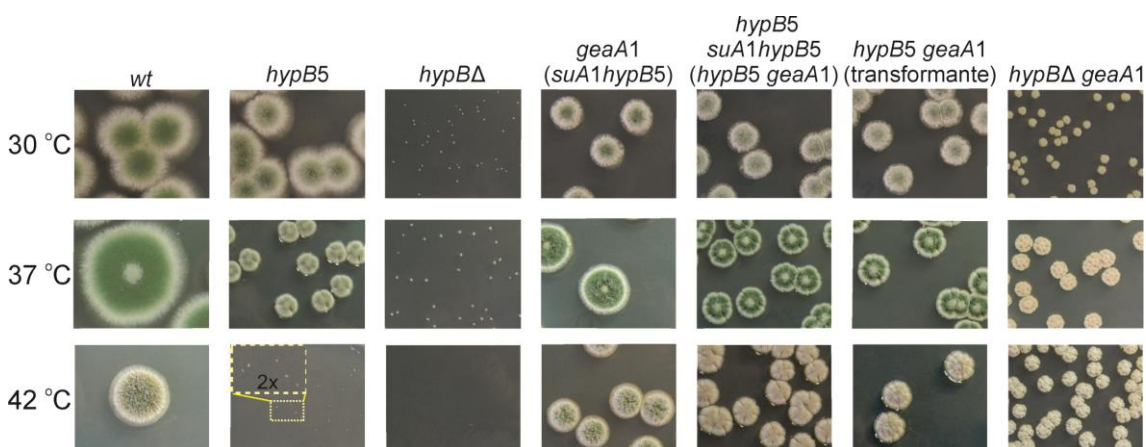
**Tabla R.6. Revertientes del fenotipo termosensible de *hypB5*.**

| Cepa                                      | Secuencia proteica de HvpB |                   |
|---|----------------------------|-------------------|
| <i>hypB5</i>                              | A881P                      |                   |
| Tipo de revertiente                       | Veces obtenido             |                   |
| <b>Intragénico</b>                        | 39                         |                   |
| Reversión directa                         | 1                          | A881              |
| Reversión equivalente (S)                 | 19                         | A881S             |
| Reversión equivalente (L)                 | 12                         | A881L             |
| Reversión equivalente (T)                 | 2                          | A881T             |
| Reversión equivalente (T) y segundo sitio | 1                          | D880G A881T       |
| Segundo sitio                             | 2                          | T863I A881P       |
| Segundo sitio                             | 1                          | A881P N956L       |
| Segundo sitio                             | 1                          | ΔG854 ΔE855 A881P |
| <b>Extragénico</b>                        | 1                          | A881P             |
|   | Total = 40                 |                   |

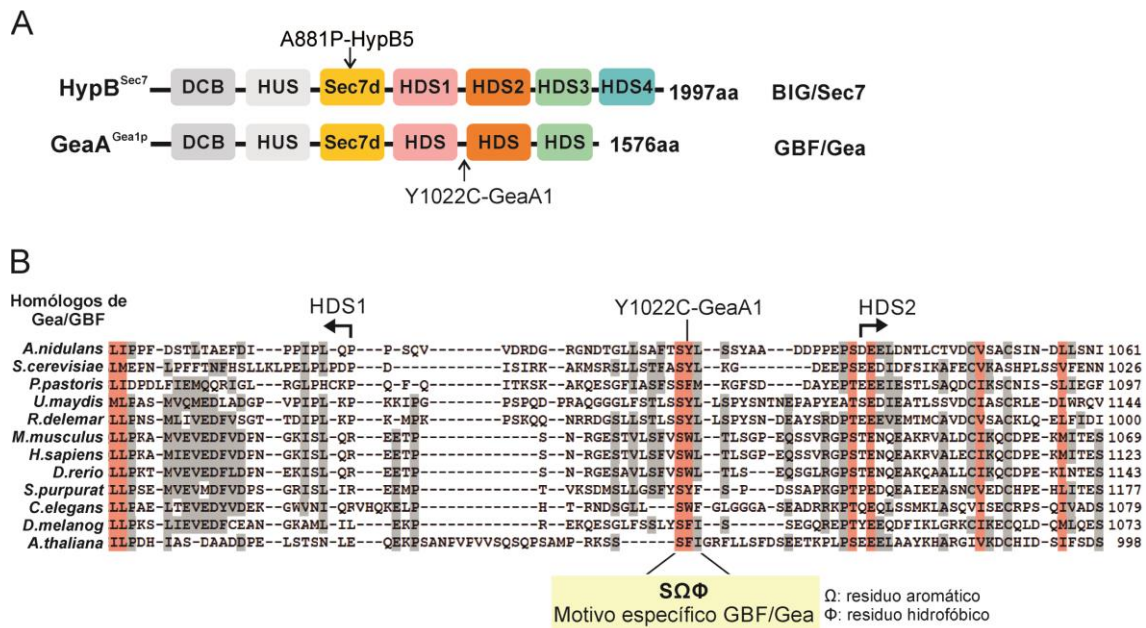
## Capítulo III

Mediante mapeo genético, con ayuda del Profesor Herbert N. Arst, determinamos que el fenotipo de supresión segregaba mendelianamente y se encontraba ligado al cromosoma VIII, entre los genes AN0118 (*nudA*) y AN0098 (*nirA*). El gen AN0112, que se encuentra en esta región cromosómica, codifica la putativa GEF de Arf1 en el Golgi temprano, denominada *Gea1/2p* en *S. cerevisiae* y *GeaA* en *A. nidulans*. Esta GEF es esencial para el crecimiento del hongo (ver capítulo II). Mediante secuenciación del gen AN0012 del mutante revertiente descubrimos la mutación de cambio de sentido A3065G, que provoca la sustitución Tyr1022Cys. A este alelo mutante de *geaA* lo denominamos *geaA1*. Para determinar si la mutación encontrada en *geaA1* era la causante de la supresión, transformamos un mutante *hypB5* con un fragmento de DNA del alelo *geaA1* que contenía la mutación. Los transformantes se seleccionaron a 42°C, temperatura a la que *hypB5* no crece. Aparecieron colonias en las placas de transformación, mientras que no crecieron colonias en el control sin transformar. Mediante purificación y secuenciación de estas colonias comprobamos que contenían la mutación de *geaA1* (g.A3065G) y eran idénticas fenotípicamente a la cepa revertiente *hypB5 suA1hypB5* original (Figura R.28). Así, confirmamos que *geaA1* suprime la termosensibilidad de *hypB5* y, por tanto, que *geaA1* es *suA1hypB5*.

Con el fin de averiguar si *geaA1* suprime también la letalidad resultante de *hypBΔ*, deletionamos *hypB* en una cepa *geaA1*, mediante transformación con una casete de delección con el marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*. Pudimos recuperar mutantes *hypBΔ geaA1* en homocariosis (ver test de crecimiento en la Figura R.28), lo que demuestra que *geaA1* no sólo suprime la termosensibilidad de *hypB5*, sino también rescata la letalidad de *hypBΔ*. Por tanto, en un fondo genético *geaA1*, el gen *hypB* no es estrictamente necesario para el crecimiento de *A. nidulans*.



**Figura R.28. Supresión de *hypB5* y *hypBΔ* por *geaA1*.** Test de crecimiento en MCA de los diferentes mutantes utilizados. *geaA1* suprime el requerimiento de *hypB* y la termosensibilidad de *hypB5*. A 42°C, *hypB5* forma microcolonias aconidiales, mientras que en presencia de *geaA1* forma colonias mayores, con conidiosporas. *geaA1* también rescata el crecimiento *hypBΔ* a 30°C, 37°C y 42°C.



**Figura R.29. Regiones conservadas en BIG/Sec7 y GBF/Gea. A.** Esquema de los dominios conservados en BIG/Sec7 y GBF/Gea. La mutación de *hypB5* afecta a un residuo conservado en el dominio catalítico Sec7d. La sustitución de GeaA1 (Y1022C) se encuentra entre los dominios HDS1 y HDS2. **B.** Alineamiento múltiple de homólogos de GBF/Gea en la región entre los dominios HDS1 y HDS2. Primero, buscamos una gran homología de HDS1 y HDS2. Después inspeccionamos y ajustamos manualmente la región entre HDS1 y HDS2, que se encuentra menos conservada. Específicamente, las secuencias utilizadas son: *A. nidulans* XP\_657716, *Saccharomyces cerevisiae* CAA89558, *Pichia pastoris* XP\_002490563, *Ustilago maydis* XP\_757309, *Rhizopus delemar* EIE78027, *Mus musculus* BAD32197, *Homo sapiens* NP\_004184, *Danio rerio* XP\_694714, *Strongylocentrotus purpuratus* XP\_003728128, *Caenorhabditis elegans* NP\_001255140, *Drosophila melanogaster* NP\_610761, *Arabidopsis thaliana* NP\_198766.

La tirosina 1022 de GeaA, sustituida por una cisteína en la cepa *geaA1*, se encuentra entre los dominios HDS1 y HDS2 (ver capítulo II). Mediante alineamiento múltiple, descubrimos que esta tirosina pertenece a un motivo conservado en la subfamilia Gea/GBF (Figura R.29). Estudiamos los homólogos de Gea/GBF de 11 *Aspergillus* diferentes y comprobamos que contienen serina, tirosina (Tyr1022 en GeaA), leucina (SYL) en la región entre HDS1 y HDS2. En otras 27 secuencias fúngicas, que incluyen basidiomicetos, zigomicetos y ascomicetos, el motivo conservado es SY(L/I/V), con pocas excepciones (*Pichia pastoris*: SFM, *Candida albicans*: SFL). Revisamos más de 30 secuencias de vertebrados (incluyendo mamíferos, pez ceba y xenopus) y comprobamos que contienen la secuencia SFVSWL, correspondiente a una duplicación del motivo. Los equinodermos tienen SYF. En los ecdisozoos, *Drosophila melanogaster* tiene SFI, *Ceratitidis capitata* y *Bombyx mori* SYL/I y *C. elegans* SWF. Concluimos que el motivo serina-residuo aromático-residuo hidrofóbico está conservado en las proteínas GBF/Gea en opistocontos. En resumen, existe un motivo conservado S-Ω-φ, donde Ω es un residuo aromático y φ un aminoácido hidrofóbico (Figura R.29). El motivo consenso en

hongos es SYL. Es importante remarcar que HypB y sus ortólogos (las proteínas BIG/Sec7) no contienen este motivo conservado. La sustitución Tyr1022Cys en este motivo conservado de GeaA soslaya el requerimiento esencial de HypB / Sec7.

### 4.3.2. La sustitución Tyr1022Cys altera la localización subcelular de GeaA

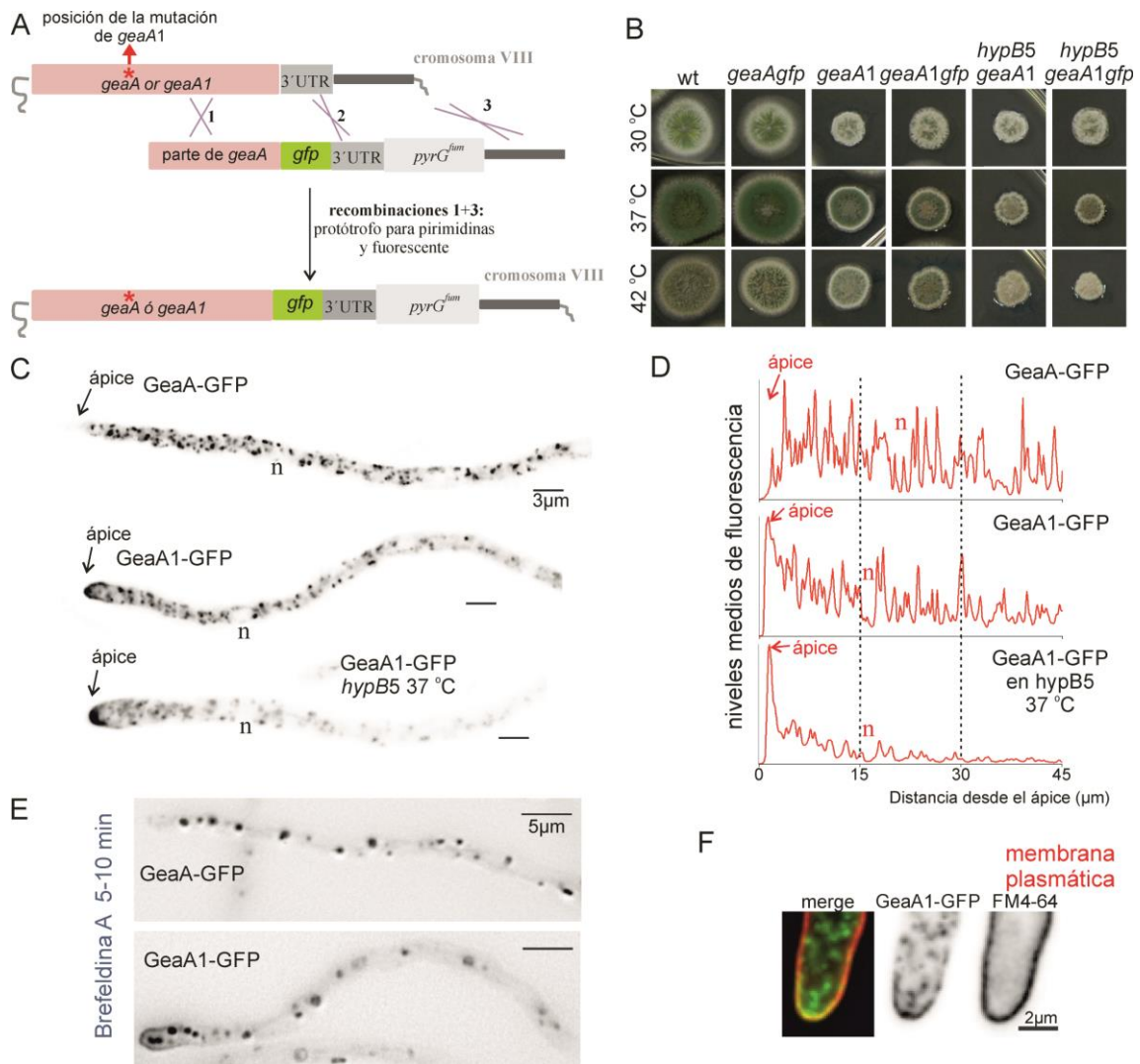
Una posible explicación para el mecanismo de supresión es que la sustitución en GeaA1 provoque que la proteína se desplace hacia las cisternas del TGN, donde sustituiría a HypB en la activación de ArfA.

Dado que no conocíamos la localización subcelular de GeaA en *A. nidulans* reemplazamos el alelo silvestre *geaA* por un alelo *geaA-gfp* (Figura R.30A). La cepa *geaA-gfp* presentó un crecimiento silvestre (Figura R.30B). GeaA-GFP marca estructuras similares a las cisternas del aparato de Golgi (Figura R.30C). Algunas de estas cisternas se encuentran cerca del ápice, como es característico del Golgi temprano (las cisternas del TGN están excluidas de la región apico-proximal) [24]. GeaA-GFP también es parcialmente citosólica, como se deduce de que los núcleos tienen menos fluorescencia que el resto del interior celular.

Una vez determinada la localización de GeaA, estudiamos la localización de GeaA1. Marcamos el alelo mutante *geaA1* con *gfp*, de tal manera que fuese la única copia de *geaA* en el genoma. La cepa *geaA1-gfp* mostró un fenotipo de crecimiento indistinguible a *geaA1*. De hecho, *geaA1-gfp* suprime la termosensibilidad de *hypB5* de manera similar a *geaA1* (Figura R.30B). Por lo tanto, el marcaje con GFP aparentemente no afectó a la función alterada de GeaA1. La localización de GeaA1-GFP se muestra en la Figura R.30C-F. Como GeaA-GFP, ésta se localiza en estructuras intracelulares similares a cisternas del Golgi. Sorprendentemente, GeaA1-GFP también se localiza asociado a la membrana plasmática en la región apico-proximal, donde su distribución recuerda las de la v-SNARE SynA [12] y la enzima ChsB (ver capítulo V). Ésta es la una región en la que predomina la exocitosis en los hongos filamentosos. GeaA1-GFP también se localiza en el Spitzenkörper, donde las vesículas exocíticas se acumulan antes de fusionarse con la membrana plasmática (Figura R.30C).

Para comprobar la asociación de GeaA1-GFP con la membrana apical, utilizamos el fluoróforo lipofílico FM4-64 [162]. Como se muestra en la Figura R.30F, GeaA1-GFP colocaliza con FM4-64 en la membrana plasmática. Por lo tanto, GeaA1-GFP se encuentra en la membrana plasmática o íntimamente asociado a ella. Tratamos *A. nidulans* con Brefeldina A para determinar el grado de asociación de GeaA y GeaA1 con el Golgi. Brefeldina A es una droga que, en *A. nidulans*, provoca la agregación de las cisternas del Golgi, formándose agregados específicos y distintos (*brefeldin bodies*) para el Golgi temprano y para el TGN [24].

Comprobamos que tanto GeaA-GFP como GeaA1-GFP se encuentran en agregados intracelulares tras el tratamiento (Figura R.30E).



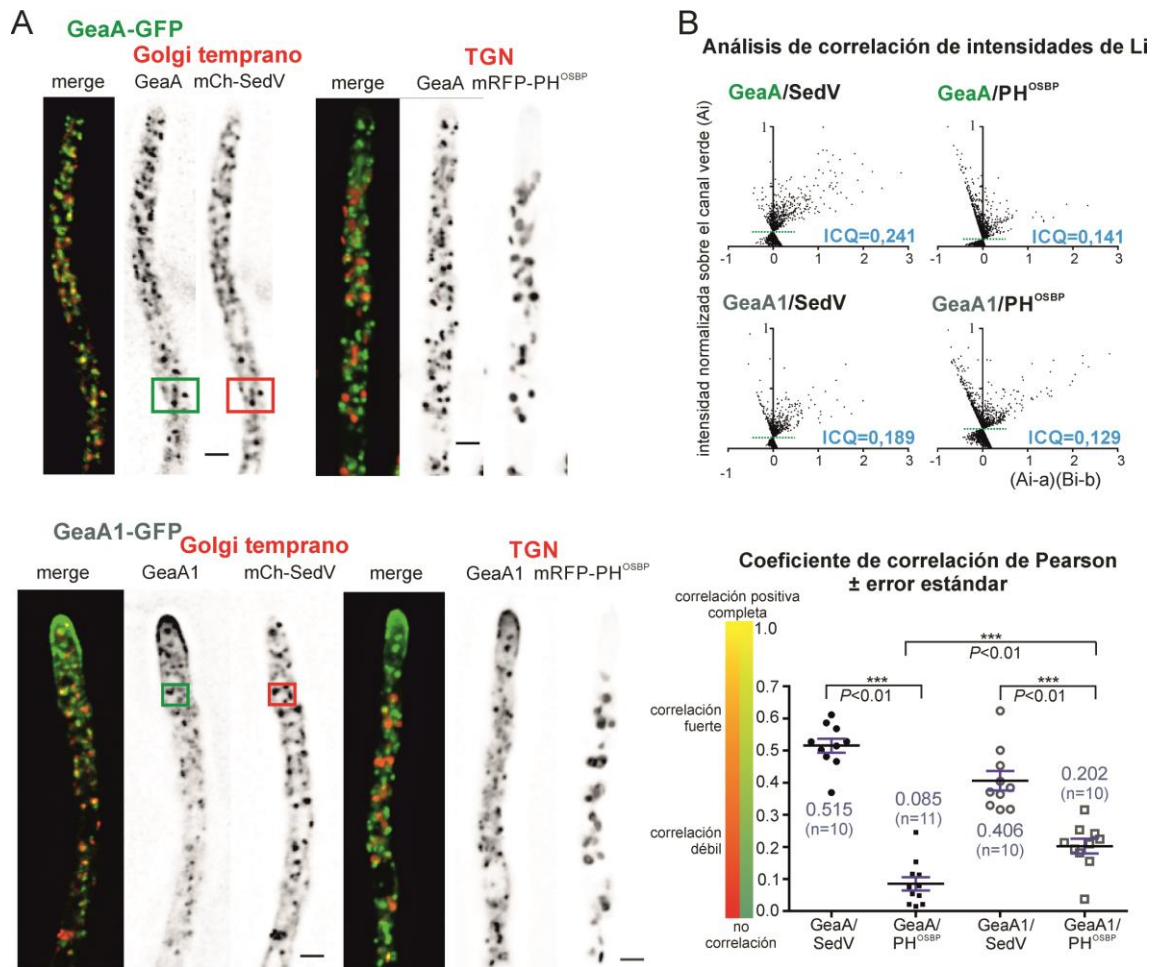
**Figura R.30. Distribución intracelular de GeaA-GFP y GeaA1-GFP.** **A.** Marcaje C-terminal de GeaA o GeaA1 con GFP por integración in locus mediante transformación con el casete lineal del esquema, obteniéndose transformantes con una copia única de *geaA* o *geaA1* marcados con *gfp*. **B.** Test de crecimiento, donde se muestra que las proteínas GeaA y GeaA1 marcadas con GFP son funcionales. Nótese que GeaA1-GFP suprime la termosensibilidad de *hypB5* del mismo modo que *geaA1*. **C.** Proyecciones de intensidades máximas de series z sometidas a deconvolución. GeaA-GFP se localiza en las cisternas del Golgi. GeaA1-GFP, además del Golgi, marca la superficie apical. La localización apical se mantiene al cambiar un cultivo *hypB5* durante 40 minutos (n: núcleo). **D.** Perfiles de intensidad de fluorescencia a lo largo de la hifas de **C**. Nótese el desplazamiento hacia el ápice de GeaA1-GFP. **E.** Hifas tratadas con brefeldina A, lo que no altera la localización apical de GeaA1-GFP. **F.** Tinción de la membrana plasmática con FM4-64 en una cepa *geaA1-gfp*, lo que demuestra que GeaA1-GFP se encuentra en la membrana plasmática o muy íntimamente asociada a ella.

## Capítulo III

---

Mediante co-visualización de GeaA-GFP y mCherry-SedV, comprobamos que ambos marcadores colocalizan (Figura R.31A). Por el contrario, GeaA-GFP y mRFP-PH<sup>OSBP</sup> no colocalizan (Figura R.31A). Mediante el cálculo de los coeficientes de Li y de Pearson, confirmamos cuantitativamente la colocalización de GeaA-GFP con mCherry-SedV en las cisternas del Golgi temprano y la ausencia de colocalización de GeaA-GFP con mRFP-PH<sup>OSBP</sup> (Figura R.31B). Estos resultados concuerdan con otros trabajos que describen la localización en el Golgi temprano de los ortólogos de GeaA (ver, por ejemplo, [206]). Posteriormente, para averiguar en qué parte del Golgi se encuentra GeaA1, covisualizamos GeaA1-GFP con los marcadores del Golgi (mCherry-SedV y mRFP-PH<sup>OSBP</sup>). Determinamos que GeaA1-GFP se encuentra en las cisternas del Golgi temprano (Figura R.31A), colocalizando con mCherry-SedV y, aunque no se encuentra principalmente en el TGN, presentó un mayor coeficiente de correlación de Pearson (es decir un mayor grado de colocalización) con PH<sup>OSBP</sup> que GeaA silvestre. Posteriormente, al analizar la localización de los agregados de GeaA y GeaA1 formados tras el tratamiento con Brefeldina A, encontramos que, pese a localizarse en su mayoría en los agregados del Golgi temprano, se detectaba una mayor proporción de agregados del TGN que contenían una señal detectable de GeaA1-GFP (87%) que en el caso de GeaA-GFP (44%). Esto sugiere que GeaA1 se encuentra asociado al TGN en mayor medida que GeaA.

La sustitución Tyr1022Cys suprime la termosensibilidad de *hypB5* y la esencialidad de *hypB*. Además, dicha sustitución cambia la localización de GeaA. Por lo tanto, era posible que la localización de GeaA1, en un fondo genético *hypB5*, estuviese alterada respecto la que presenta en un fondo genético silvestre. Para determinar el efecto de *hypB5* en la localización de GeaA1, obtuvimos una cepa GeaA1-GFP *hypB5*. GeaA1-GFP presenta la misma localización en la cepa *hypB5* a 28°C que en una cepa silvestre. Realizamos un cambio de temperatura a 37°C, usando como control una cepa *hypB5 geaA<sup>wt</sup>*. El incremento de temperatura detuvo el crecimiento de las hifas *hypB5*, mientras que las células *geaA1-gfp hypB5* continuaron creciendo. La localización de GeaA1-GFP se mantuvo como a 28°C, con su característica localización en cisternas intracelulares y en la membrana apical (Figura R.30C). Este resultado sugiere que estos cambios en la localización están implicados en, o son un reflejo de la supresión.



**Figura R.31. Localización intra-Golgi de GeaA-GFP y GeaA1-GFP.** **A.** Arriba, proyecciones de intensidades máximas de una serie *z* de GeaA-GFP y mCherry-SedV (izquierda) o mRFP-PH<sup>OSBP</sup> (derecha), que muestran la colocalización de GeaA con el marcador del Golgi temprano (SedV) y su baja colocalización con mRFP-PH<sup>OSBP</sup>. La barra corresponde a 2  $\mu$ m. Abajo, igual pero con una cepa *geaA1-gfp*. **C.** Abajo, análisis de correlación de intensidades de Li en el canal verde. Abajo, gráfico que muestra la dispersión y los valores medios del coeficiente de correlación de Pearson. Las barras azules indican el error estándar. Tanto GeaA-GFP como GeaA1-GFP predominan en el Golgi temprano. La caída en la colocalización entre GeaA1 y SedV comparado con GeaA/SedV correlaciona con el desplazamiento de GeaA1 hacia la membrana plasmática apical. También existe mayor correlación en GeaA1/PH<sup>OSBP</sup> que en GeaA/PH<sup>OSBP</sup>, aunque ésta es, aun así, baja.

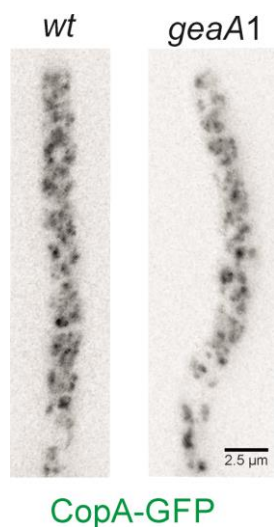
#### 4.3.3. La mutación *geaA1* no altera el reclutamiento de CopA

En *S. cerevisiae* Gea1p, a diferencia de Sec7p, interacciona con Sec21p, una subunidad de COPI. Esta interacción concuerda con las observaciones que describen que los miembros de la subfamilia Gea/GBF se localizan en el Golgi temprano, donde también se localiza COPI (ver capítulo IV) [207, 208].

Nos preguntamos si la localización de GeaA1 en la membrana plasmática provocaría el reclutamiento a ésta de sus interactores, como por ejemplo COPI. Para contestar esta pregunta,

## Capítulo III

determinamos la localización de CopA-GFP (ver capítulo IV) en la cepa mutante *geaA1*. Como se muestra en la Figura R.32, CopA en el fondo genético *geaA1* presenta una localización en cisternas intracelulares que es indistinguible de una cepa silvestre. Tras cuantificar la intensidad de fluorescencia media de 4 células (región de 10 x 1.5 µm por célula), así como la intensidad máxima y la mínima, no encontramos diferencias significativas en ninguno de estos valores, ni tampoco en la polarización de las cisternas. En otras palabras, la relocalización de GeaA1 no provoca una relocalización de COPI ni altera su reclutamiento a las cisternas del Golgi.



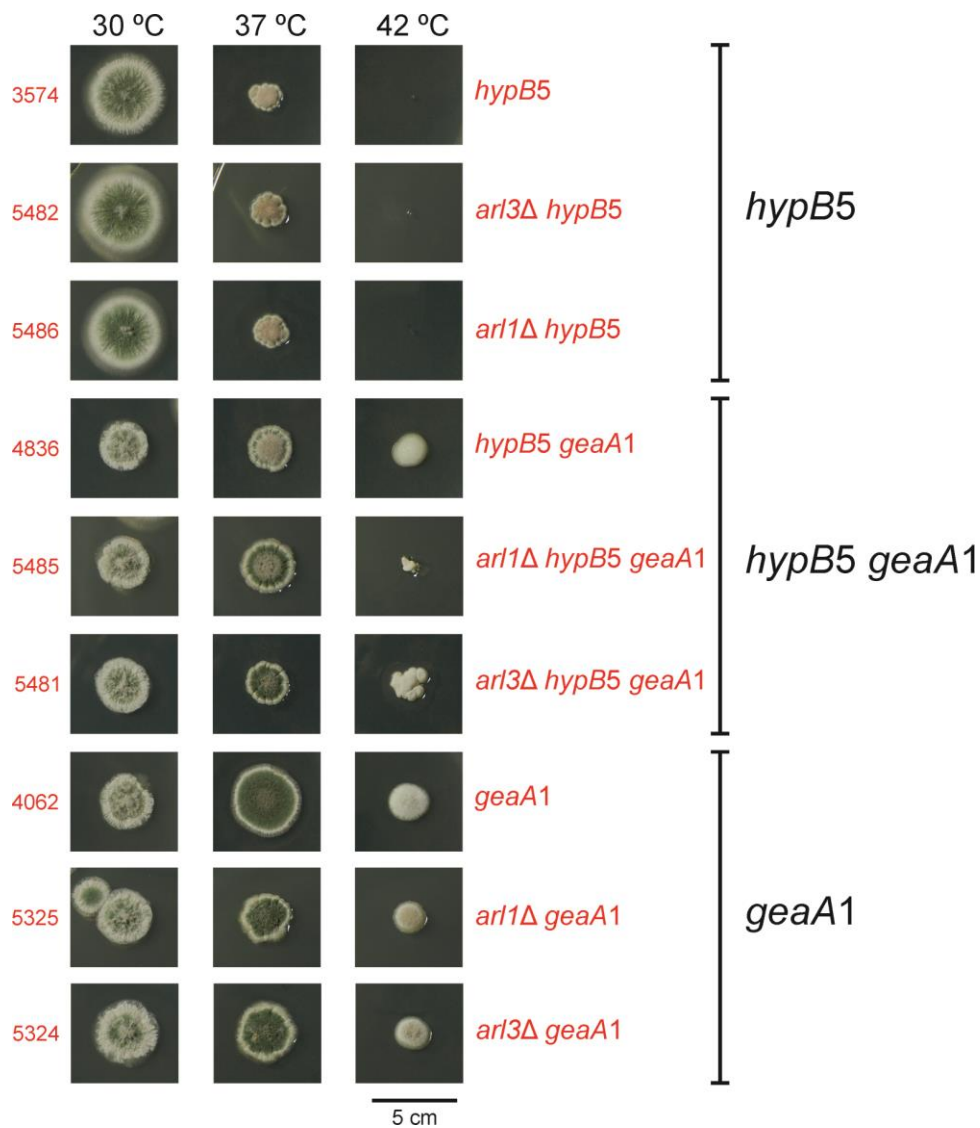
**Figura R.32. Reclutamiento de CopA-GFP a estructuras intracelulares en una cepa *geaA1*.** CopA-GFP se recluta eficientemente a estructuras intracelulares tanto en una cepa wt como en el mutante *geaA1*.

### 4.3.4. Implicación de *arl1* y *arl3* en la supresión de *hypB5* por *geaA1*

Los resultados arriba expuestos indicaron que *geaA1* parecía soslayar la necesidad de *hypB* mediante una actuación en el TGN. Existe evidencia de la interacción de Gea2p de *S. cerevisiae* con Arl1p y la flipasa Drs2p [124]. Además, dicha interacción se requiere para el reclutamiento de proteínas específicas al TGN [124], donde se localizan Arl1p y Drs2p.

Como hemos descrito, GeaA1 no se localiza mayoritariamente en el TGN; sin embargo su mayor presencia en el TGN podría ser la causa de la supresión. Hipotetizamos que, si ese fuese el caso, el mecanismo de supresión de *geaA1* podría requerir un reclutamiento inicial de GeaA1 a las membranas del TGN. La eficiencia de dicho reclutamiento podría aumental por interacción con Arl1. Esto significaría que Arl1 estaría implicado en el mecanismo de supresión. Por otro lado, Arl3p se requiere para el reclutamiento de Arl1p al TGN [209]. Esto significaría que Arl3 también se necesitaría para la supresión mediada por *geaA1*. Para probar dichas hipótesis, aprovechamos la colección de mutantes de delección que obtuvimos en el capítulo II. Mediante cruces obtuvimos una cepa *geaA1 arl1Δ* y un mutante triple *hypB5 geaA1 arl1Δ*. También, obtuvimos las cepas correspondientes con el mutante *arl3Δ*: *geaA1 arl3Δ* y *hypB5 geaA1 arl3Δ*. El crecimiento de las cepas analizadas se muestra en la Figura R.33. La delección de *arl1* o de *arl3* altera ligeramente el crecimiento de la cepa *geaA1* a 37°C. También, comprobamos que los triples mutantes *hypB5 geaA1 arl1Δ* y *hypB5 geaA1 arl3Δ* crecen de un

modo similar al doble mutante *hypB5* *geaA1* a 30°C y 37°C. Por el contrario, a 42°C los triples mutantes crecen considerablemente peor que el mutante doble *hypB5* *geaA1*, de manera que *arl1*Δ, y en menor grado *arl3*Δ, impiden en cierta medida la supresión llevada a cabo por *geaA1*. De estos resultados se deduce que, tanto *arl1* como *arl3* juegan un cierto papel para que el mecanismo de supresión funcione completamente. Una posible explicación sería, como se indica más arriba, que Arl1 aumentase la estabilidad de GeaA1 en el TGN.



**Figura R.33. Interacciones genéticas entre *arl1*Δ, *arl3*Δ, *geaA1* y *hypB5*.** Se muestra un test de crecimiento de las cepas indicadas en MCA a 30°C, 37°C y 42°C. Como se puede apreciar los triples mutantes *arl1*Δ *hypB5* *geaA1* y *arl3*Δ *hypB5* *geaA1* crecen peor que el mutante doble *hypB5* *geaA1*.

# Capítulo IV

## 4.4. Capítulo IV. Localización subcelular y caracterización de CopA, una subunidad esencial de COPI

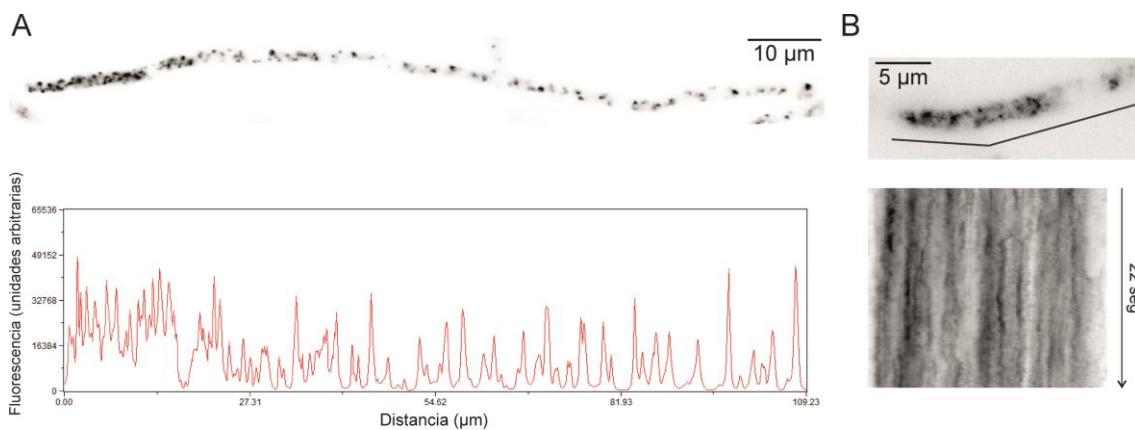
COPI es posiblemente el principal complejo multiproteico formador de cubiertas en el aparato de Golgi. Sin embargo, su localización específica no se había determinado en *Aspergillus nidulans*. Otros investigadores habían visualizado CopA (subunidad de COPI), utilizando una cepa que sobre-expresa CopA-GFP y mantiene la copia endógena del gen [26], sin establecer si se localizaba en el Golgi temprano, en el TGN o en ambos. Para entender la organización del aparato de Golgi, consideramos que era importante conocer la localización precisa de COPI.

### 4.4.1. La construcción *copA-gfp* es funcional

En *A. nidulans*, la delección de *copA* (AN3026) —también llamado *sod(VI)C*— es letal [172]. *sod(VI)C1* es una mutación termosensible de CopA, que impide el crecimiento a 42°C [210], lo que confirma el papel esencial de la proteína. Para expresar una fusión CopA-GFP a niveles fisiológicos reemplazamos el gen *copA* residente por una variante que codifica la proteína de fusión CopA-GFP, que representa la única fuente de CopA en la cepa manipulada. El reemplazamiento génico de *copA* por la fusión *copA-gfp* no causó defecto en el crecimiento en las condiciones utilizadas para microscopía, indicando que CopA-GFP es funcional. Genotipamos los transformantes con oligonucleótidos externos a la construcción y comprobamos que el reemplazamiento génico había ocurrido fielmente.

### 4.4.2. CopA-GFP se localiza en estructuras citosólicas dinámicas polarizadas hacia el ápice

Estudiamos CopA-GFP mediante microscopía *in vivo*. CopA-GFP se localiza en estructuras polarizadas (Figura R.34A) hacia el ápice de la hifa, que mostraban formas anulares, esféricas, elipsoidales, elongadas o tubulares (Figura R.34A). Mediante la adquisición de series de imágenes con una resolución temporal de 10 fotogramas por segundo observamos movimientos a grandes distancias de una pequeña proporción de estas estructuras. Sin embargo, la mayoría de ellas no presentaban estos movimientos (Figura R.34B). Las estructuras CopA-GFP cambian su forma constantemente, observándose esferas que se elipsoidizan, para finalmente dar lugar a formas anulares o elongadas. En ocasiones, estas estructuras coalescían y se volvían a separar, dando la impresión de intercambio de material. Estas formas y esta dinámica son características de las cisternas del aparato de Golgi [24].



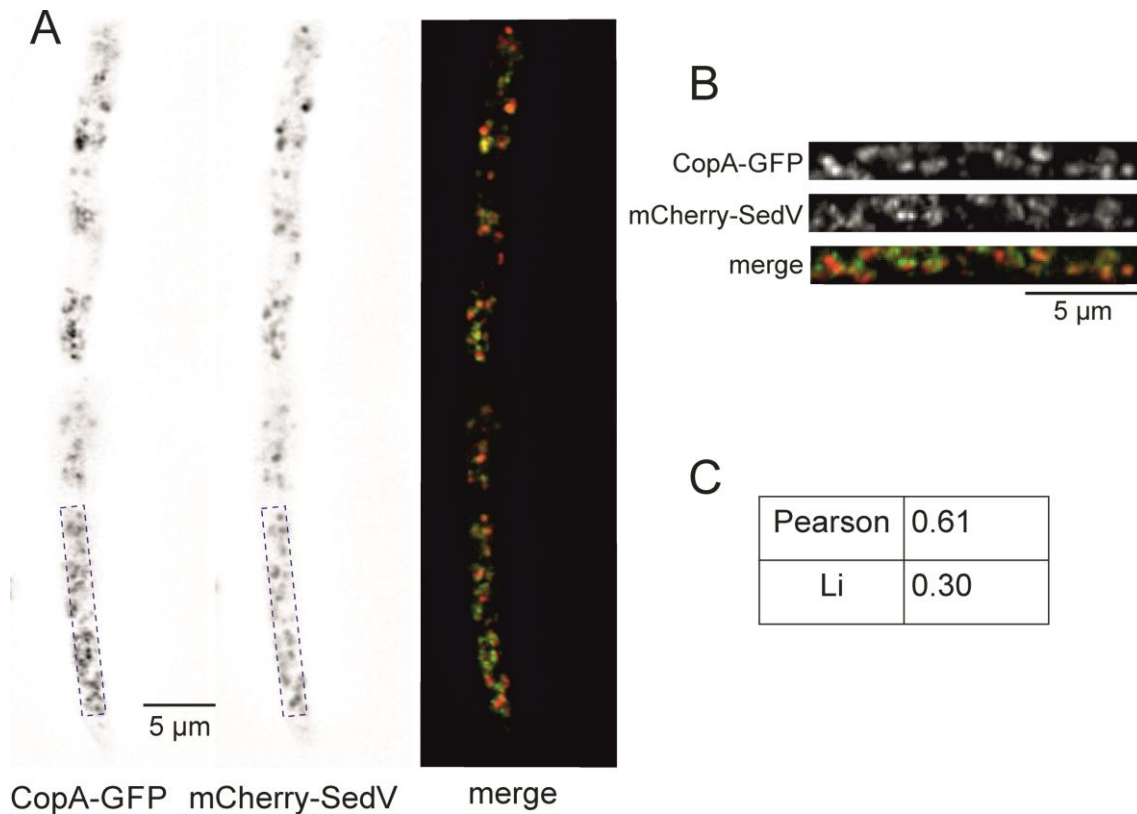
**Figura R.34. Localización de CopA-GFP en *A. nidulans*.** **A.** La imagen es una proyección de máxima intensidad de una serie de planos en el eje Z, mejorada mediante un algoritmo de deconvolución. La polarización se muestra en el gráfico inferior, que representa la intensidad de la señal a lo largo de la hifa de la imagen. **B.** Dinámica de CopA-GFP. La imagen corresponde a una serie de imágenes en el tiempo (*time-lapse*). El quimógrafa inferior corresponde a la línea azul de la imagen y muestra el cambio en intensidad a lo largo de los 22 segundos del *time-lapse* mostrando que, en general, CopA-GFP no realiza movimientos a grandes distancias.

### 4.4.3. CopA-GFP se localiza mayoritariamente en el Golgi temprano, donde colocaliza con SedV

SedV es un marcador del Golgi temprano bien caracterizado [38]. Generamos una estirpe con ambos marcadores para determinar la localización relativa de CopA-GFP y mCherry-SedV. Utilizando un microscopio acoplado a un *beam splitter*, que permite adquirir imágenes simultáneamente en los canales GFP y mCherry/RFP, determinamos la localización relativa de ambas proteínas. Para estudiar la colocalización: (1) inspeccionamos las imágenes adquiridas visualmente; (2) realizamos un análisis de correlación de intensidad de Li [182]; y (3) calculamos el coeficiente de correlación de Pearson [182]. Del análisis de Li se obtiene un cociente de correlación de intensidad (ICQ) o cociente de Li, que es una medida de la proporción de píxeles que presentan una intensidad alta o baja tanto en el canal rojo como en el verde (es decir, cierta correlación en las intensidades de los dos canales). Un valor de  $-0.5$  indica exclusión y  $+0.5$  indica colocalización total; se considera que existe una colocalización significativa cuando el valor del ICQ es mayor que  $0.2$ . Del análisis de Pearson se obtiene un coeficiente que indica la correlación existente entre ambos canales de fluorescencia. Un valor de  $1$  indica correlación perfecta positiva y valores cercanos a  $1$  indican correlación positiva.

Mediante inspección visual, observamos que, en su gran mayoría, las cisternas que contienen mCherry-SedV también contienen CopA-GFP y viceversa (Figura R.35A). Filmamos estas cisternas y comprobamos que esta coincidencia de ambos marcadores se mantenía a lo largo del tiempo, dado que se movían conjuntamente en *xy*. Para los cálculos de colocalización de Li y de Pearson adquirimos un conjunto de planos en el eje Z, cubriendo el ancho total de la hifa. Los tres planos centrales fueron procesados mediante deconvolución y, posteriormente,

obtuvimos una imagen que es la proyección de intensidades máximas de los tres planos. Seleccionamos regiones que incluyesen únicamente espacio intracelular, evitando las regiones nucleares. Medimos regiones de un total de 11 células. Los valores de Pearson y de Li (Tabla R.7 y Figura R.35B-C) indicaron que existe colocalización entre SedV y CopA, con un coeficiente de Pearson medio de 0.72 y un cociente de Li de 0.30.



**Figura R.35. Colocalización de CopA-GFP y mCherry-SedV.** **A.** Imagen de canal dual de CopA-GFP y mCherry-SedV. Los rectángulos muestran la región utilizada para el análisis de colocalización. **B.** Región utilizada para el análisis. **C.** Cociente de correlación de intensidad de Li y coeficiente de Pearson de las regiones de B.

#### 4.4.4. CopA-GFP no colocaliza con mRFP-PH<sup>OSBP</sup> (TGN)

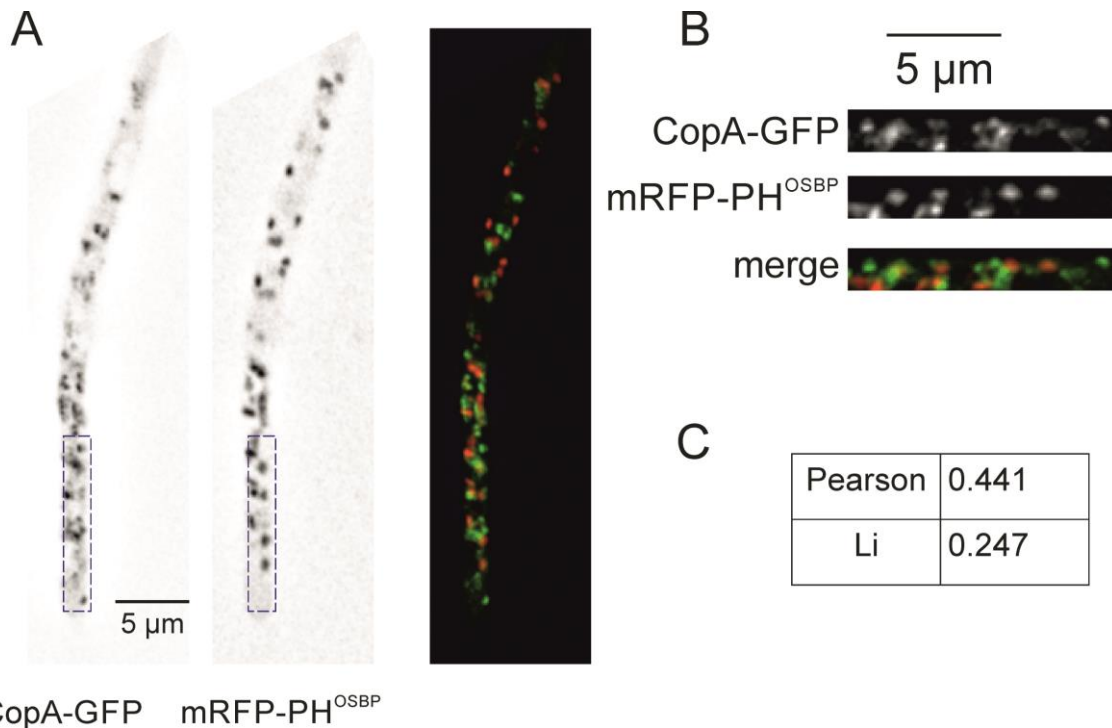
El marcador del TGN mRFP-PH<sup>OSBP</sup> [24] se recluta a la cara citosólica de las membranas del TGN por detección por coincidencia de PtdIns4P y la GTPasa del Golgi Arf1 [168]. Basándonos en el resultado previo de que CopA-GFP colocaliza casi totalmente con SedV, predijimos que CopA no se encontraría en el TGN. Mediante vídeos y proyecciones en el eje Z comprobamos que las estructuras CopA-GFP no colocalizan con mRFP-PH<sup>OSBP</sup> (Figura R.36A). El análisis de colocalización, mediante el cálculo del cociente de Li y el coeficiente de Pearson, se hizo de manera idéntica al apartado anterior. Ni los valores de Pearson ni de Li mostraron alta correlación (Pearson=0.30; Li=0.16), con lo que concluimos que CopA no colocaliza con PH<sup>OSBP</sup> y, por tanto, no se encuentra en el TGN (Tabla R.7 y Figura R.36B-C).

## Capítulo IV

La Figura R.37 muestra que existen diferencias significativas entre los coeficientes de Pearson correspondientes a CopA/SedV y CopA/ mRFP-PH<sup>OSBP</sup>.

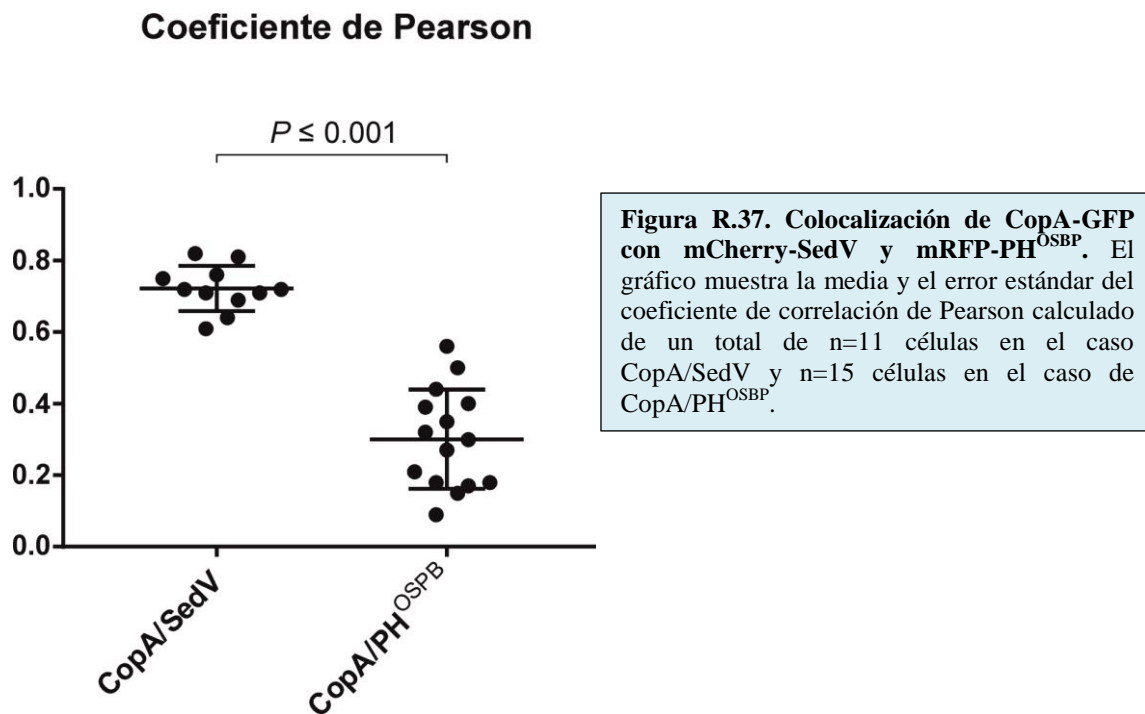
**Tabla R.7. Cocientes de Li y coeficientes de Pearson de cada región (célula) analizada.**

| SedV/CopA         |                    | PH <sup>OSBP</sup> /CopA |                    |
|-------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| Pearson           | Li                 | Pearson                  | Li                 |
| 0.61              | 0.30               | 0.44                     | 0.25               |
| 0.81              | 0.33               | 0.56                     | 0.28               |
| 0.75              | 0.26               | 0.21                     | 0.12               |
| 0.72              | 0.33               | 0.17                     | 0.11               |
| 0.64              | 0.36               | 0.18                     | 0.11               |
| 0.82              | 0.36               | 0.50                     | 0.23               |
| 0.76              | 0.27               | 0.39                     | 0.20               |
| 0.69              | 0.28               | 0.09                     | 0.08               |
| 0.72              | 0.26               | 0.35                     | 0.10               |
| 0.71              | 0.29               | 0.30                     | 0.12               |
| 0.71              | 0.32               | 0.32                     | 0.16               |
|                   |                    | 0.18                     | 0.09               |
|                   |                    | 0.15                     | 0.19               |
|                   |                    | 0.40                     | 0.17               |
|                   |                    | 0.27                     | 0.21               |
| $\bar{x}(P)=0.72$ | $\bar{x}(Li)=0.30$ | $\bar{x}(P)=0.30$        | $\bar{x}(Li)=0.16$ |



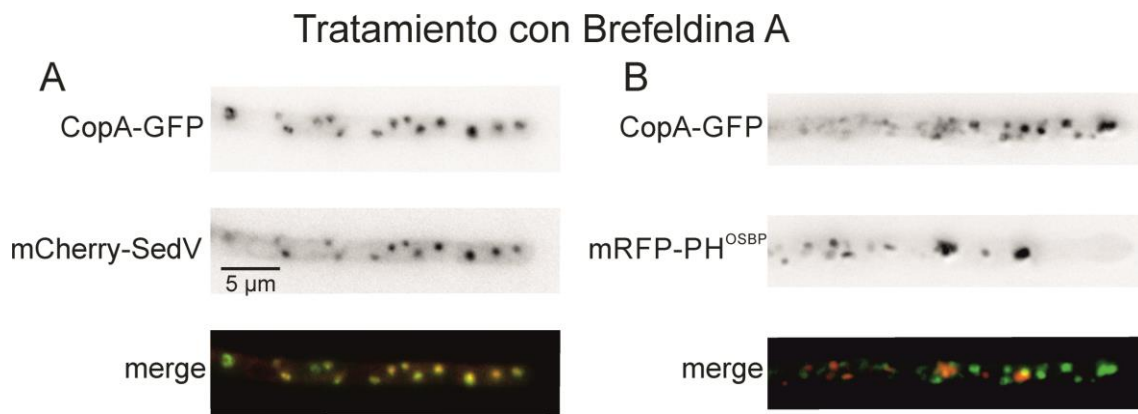
CopA-GFP mRFP-PH<sup>OSBP</sup>

**Figura R.36. Colocalización de CopA-GFP y mRFP-PH<sup>OSBP</sup>.** **A.** Imagen de canal dual de CopA-GFP y mRFP-PH<sup>OSBP</sup>. Los rectángulos muestran la región utilizada para el análisis de colocalización. **B.** Región utilizada para el análisis. **C.** Cociente de correlación de intensidad de Li y coeficiente de Pearson de las regiones de B.



#### 4.4.5. CopA-GFP se acumula en los agregados de Golgi temprano tras el tratamiento con Brefeldina A

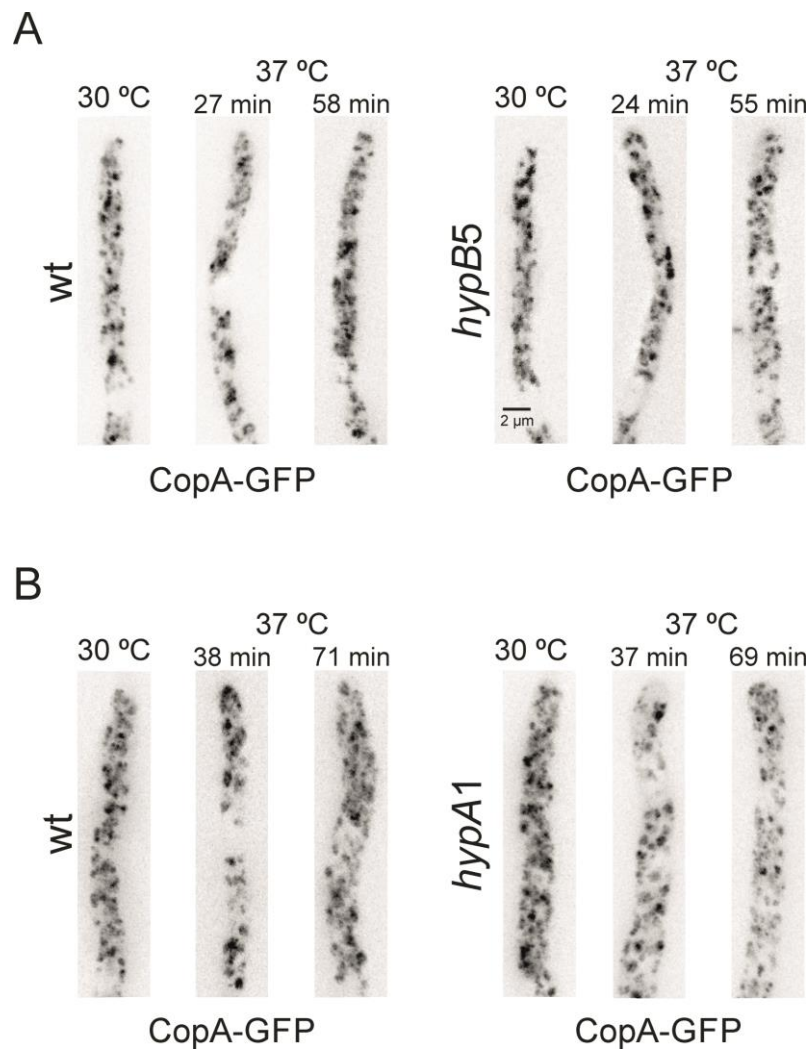
En *A. nidulans* [24], al igual que en mamíferos [46] y otros hongos [211], la droga Brefeldina A (BFA) provoca una alteración del aparato de Golgi, dando lugar en este caso, como ya se ha mencionado, a la formación de agregados específicos de Golgi temprano y TGN. En mamíferos, tras el tratamiento con BFA, COPI se vuelve rápidamente citosólico [212]. Tras añadir BFA, las estructuras CopA-GFP se reorganizaron rápidamente (1-2 min), perdiendo parte de su distribución polarizada y formándose un pequeño número de estructuras grandes y muy fluorescentes. En la cepa CopA-GFP/ mCherry- SedV ambos marcadores colocalizaron totalmente en los agregados, mostrando que CopA-GFP queda capturado en los agregados de Golgi temprano (Figura R.38A). mCherry-SedV se encontró, además de en los agregados, rodeando los núcleos (la envoltura nuclear es un dominio del retículo endoplasmático), localización que no presentó CopA-GFP. Por el contrario, tras el tratamiento con BFA de la cepa *copA-gfp mRFP-PH<sup>OSBP</sup>* los agregados que secuestran mRFP-PH<sup>OSBP</sup> eran diferentes a los formados por CopA-GFP (Figura R.38B), mostrando que CopA no se acumula en los agregados de TGN. Estos resultados subrayan que en el estado estacionario CopA predomina en el Golgi temprano.



**Figura R.38. Efecto de la droga Brefeldina A en CopA-GFP.** **A.** Las imágenes corresponden a un plano, en canal dual, de células *copA-gfp mCherry-sedV*, tratadas con Brefeldina A (BFA) 4 minutos antes de tomar la imagen. **B.** Igual que en A, pero con células *copA-gfp mRFP-PH<sup>OSBP</sup>*, tras 9 minutos de tratamiento con BFA.

#### 4.4.6. CopA se deslocaliza al alterar la organización del Golgi temprano, pero no al alterar el TGN

Dado que CopA se localiza en el Golgi temprano, quisimos averiguar si el funcionamiento normal del TGN y del Golgi temprano eran necesarios para el reclutamiento de CopA. Para alterar el TGN utilizamos los mutantes termosensibles *hypB5* y *hypA1*. HypB (Sec7) se encuentra específicamente en las cisternas del TGN, donde debe activar a ArfA. HypA (Trs120), por su parte, es la GEF de RabE y su función es necesaria para la salida de tráfico del TGN, con destino exocítico [36, 37]. Ninguna de las dos mutaciones afectó a la localización de CopA a 30°C o a 37°C después de > 50 min (Figura R.39). En ambos mutantes, CopA marcó, como como en una cepa silvestre, cisternas intracelulares. Por el contrario, la desorganización general del aparato de Golgi mediada por *sarA6* alteró drásticamente la localización de CopA (ver capítulo I), de acuerdo con la conclusión de que el Golgi se mantiene dinámicamente sólo si existe un flujo continuo de membranas desde el RE.



**Figura R.39. Localización de CopA-GFP después de la inactivación de HypB y Trs120. A.** La mutación termosensible *hypB5* no afecta a la localización de CopA-GFP. **B.** La inactivación de Trs120 mediante *hypA1* tampoco altera la localización de CopA. Las imágenes son proyecciones máximas de varios planos en el eje z.

# Capítulo V

## 4.5. Capítulo V. Implicación del reciclaje endocítico en el mantenimiento de la polaridad de ChsB

ChsB es una quitina sintasa específica de hongos filamentosos que es crucial para el crecimiento [28, 213]. Se localiza en el ápice de las hifas, al igual que la sinaptobrevina SynA [28, 214], donde probablemente contribuye, mediante la síntesis de quitina, al proceso de construcción de nueva pared celular. Contiene un dominio citosólico de 543 residuos y una región con siete hélices transmembrana (Figura R.40A). En este capítulo elegimos la proteína ChsB como modelo para estudiar el mecanismo por el cual ciertas proteínas transmembrana presentan una localización polarizada en el casquete apical de las hifas.

### 4.5.1. La enzima ChsB es esencial

En primer lugar, revisamos el fenotipo de un mutante nulo *chsB* $\Delta$  [213]. Delecionamos el gen *chsB*, reemplazándolo por el marcador de selección *pyrG<sup>fum</sup>* y comprobamos que la ausencia de *chsB* permite el crecimiento más allá de la formación de microcolonias incapaces de esporular (Figura R.40B). Por lo tanto, la delección de *chsB* es virtualmente letal. Este resultado concuerda con lo descrito previamente [213]. Fuimos incapaces de rescatar colonias *chsB* $\Delta$  viables utilizando sorbitol como estabilizador osmótico o probando diferentes temperaturas de cultivo. Concluimos que ChsB es una enzima clave para la supervivencia de *Aspergillus nidulans*, por lo que alteraciones en su localización fisiológica se traducirían en defectos de crecimiento y/o morfogénesis.

### 4.5.2. Localización subcelular de ChsB: membrana apical, vesículas de secreción, estructuras citosólicas y septos

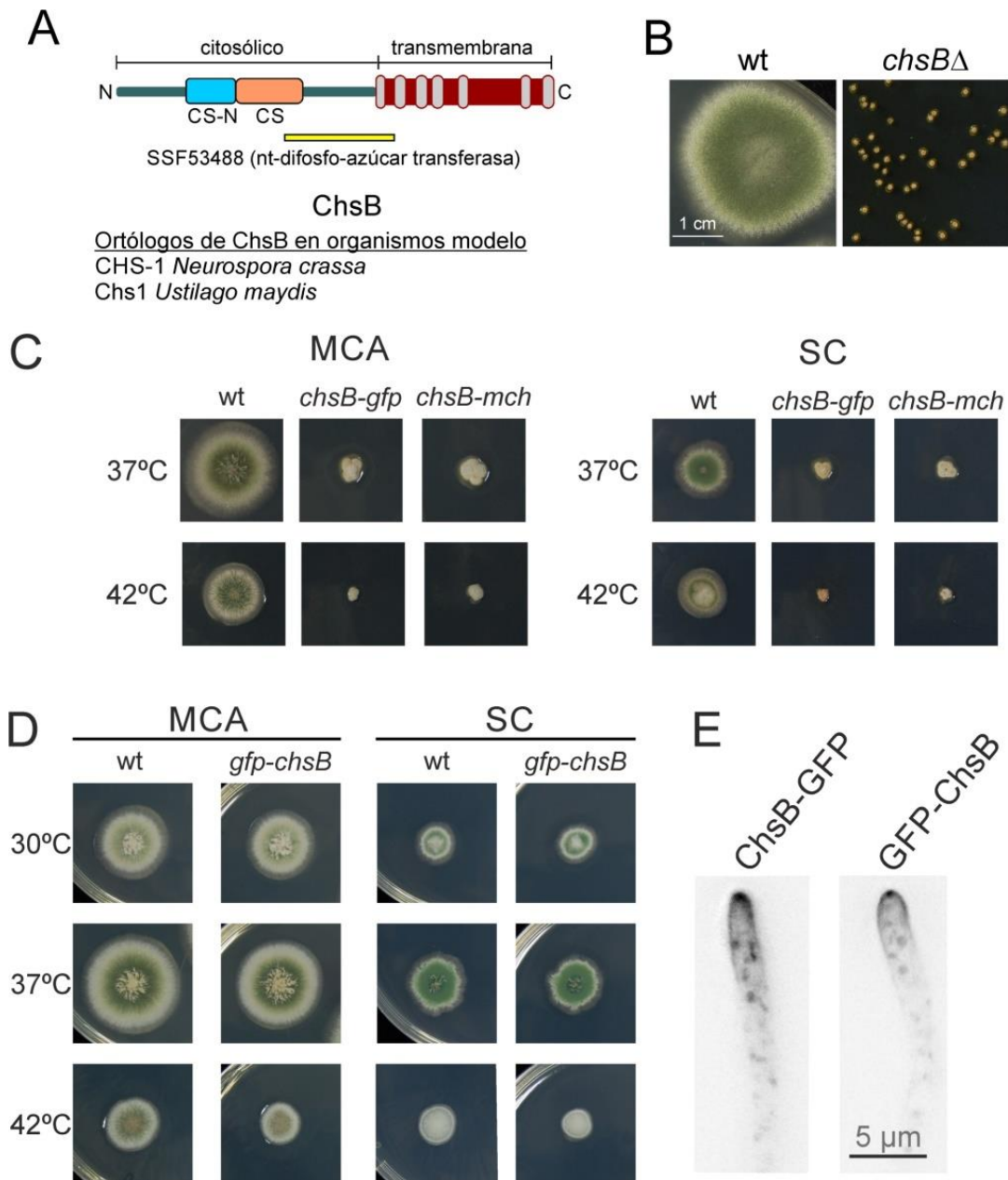
Un estudio previo de la localización de ChsB [214] utilizó un transgén integrado ectópicamente que expresaba ChsB marcada con EGFP y conservaba el gen *chsB* silvestre. Para comprobar la funcionalidad de la proteína de fusión GFP-ChsB, diseñaron un sistema para reprimir la expresión del gen *chsB* silvestre con un promotor regulable. Para evitar posibles artefactos producidos por esta estrategia y para determinar con certeza la funcionalidad normal de ChsB con marcajes fluorescentes, decidimos reemplazar, en cada caso, el gen *chsB* silvestre con los distintos transgenes.

Específicamente, construimos las siguientes cepas:

1. Marcaje en C-terminal: reemplazamos el gen endógeno *chsB* por genes quiméricos *chsB-gfp* o *chsB-mCherry*, es decir, con la proteína fluorescente en C-terminal. Comprobamos que estos derivados de ChsB no eran completamente funcionales, ya que las estirpes

## Capítulo V

correspondientes, pese a ser viables, presentaron un crecimiento muy reducido y una esporulación muy deficiente (Figura R.40C). En segundo lugar, para tener la copia wt además de la fusión fluorescente, construimos cepas con *chsB-gfp* o *chsB-mCherry* como segunda copia, integradas en tándem después del gen wt *chsB*. Estas nuevas cepas no presentaban defectos de crecimiento, lo que demuestra que el efecto fenotípico nocivo de la fusión en C-terminal con GFP o mCherry es recesivo. Finalmente, construimos otra cepa con el transgén



**Figura R.40. Caracterización básica y marcaje fluorescente de ChsB.** **A.** Representación esquemática de ChsB. **B.** Test de crecimiento en medio completo (MCA) que muestra las microcolonias del mutante *chsBΔ* después de 7 días de crecimiento a 37°C. **C.** Test de crecimiento que muestra la gran afectación de las cepas construidas para expresar ChsB marcado con GFP o mCherry en el extremo C-terminal. **D.** Localización de las proteínas de fusión ChsB-GFP y GFP-ChsB. **E.** Test de crecimiento donde se aprecia que el crecimiento de una cepa *gfp-chsB* es similar al de una cepa silvestre.

*chsB-gfp* que se expresa bajo el control del promotor natural de *chsB*, sustituyendo al gen *wA*. La integración de transgenes en el locus *wA* se usa frecuentemente en *A. nidulans* ya que las cepas resultantes únicamente tienen un defecto en la pigmentación de las esporas, que en los mutantes *wAΔ* son blancas en vez de verdes (wt) [152]. De este modo, se facilita el seguimiento de la segregación del transgén en la progenie de cruces meióticos, ya que los descendientes que contienen el transgén introducido en *wA* son blancos.

2. Marcaje en N-terminal: al contrario que con *chsB-gfp*, la expresión de *gfp-chsB* o *mcherry-chsB* como única fuente de ChsB permitió un crecimiento indistinguible al de una cepa wt a varias temperaturas (Figura R.40D). Por tanto, la proteína de fusión es suficientemente funcional como para permitir un crecimiento similar al wt. También construimos una cepa con mCherry-chsB y otra con *gfp-chsB* integrados en el locus *wA*, que presentaron crecimiento silvestre. La localización subcelular de ChsB marcada con GFP en N o en C-terminal (funcional y afuncional, respectivamente) era ligeramente diferente. ChsB-GFP se localiza en una región más amplia de la membrana apical que GFP-ChsB y el citosol de la región subapical con la primera es ligeramente más fluorescente que con la segunda (Figura R.40E). Dados estos resultados, decidimos utilizar para todas las observaciones microscópicas y el resto de los experimentos los transgenes *gfp-chsB* y *mCherry-chsB* integrados como copia única en el locus *chsB* y, por tanto, las proteínas quiméricas expresadas bajo el control de su propio promotor representaban la única fuente de ChsB.

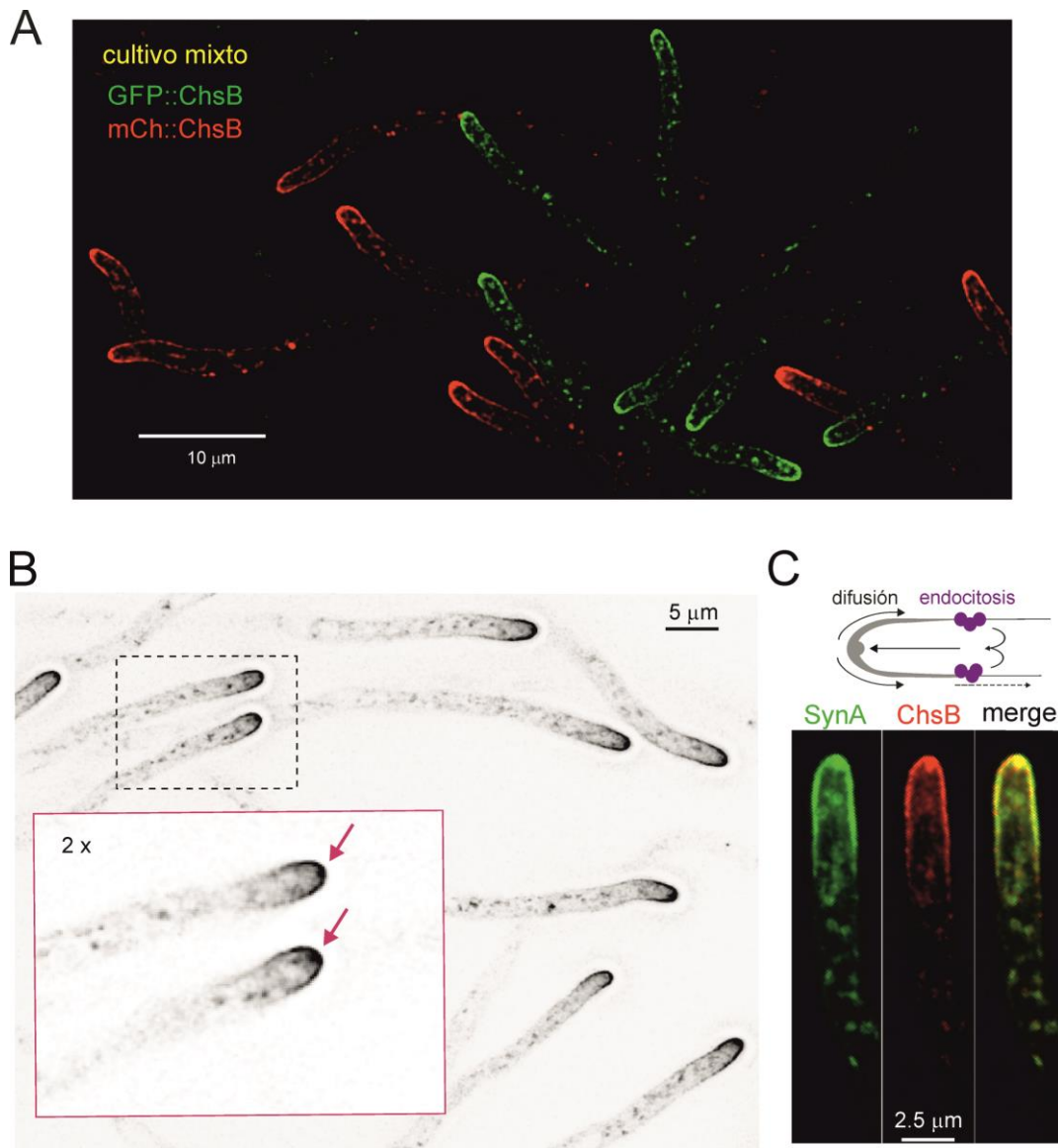
Ambas proteínas (mCherry-ChsB y GFP-ChsB) presentaron una localización subcelular idéntica (Figura R.41A).

ChsB reside en cuatro regiones subcelulares diferentes (Figura R.41B):

- 1) Estructuras citosólicas**, polarizadas hacia el ápice de la hifa (para su caracterización ver más adelante).
- 2) Algunos septos.** (En otros estudios se ha propuesto que se localiza únicamente en los septos en formación [28]).
- 3) Acumulación apical de vesículas secretoras.** Dicha estructura característica de hongos filamentosos se denomina Spitzenkörper. El Spitzenkörper consiste en una acumulación de vesículas con identidad exocítica, a la espera de fusionarse con la membrana plasmática del ápice [12].
- 4) Membrana apico-proximal**, formando un casquete semiesférico en la punta de cada hifa que se extiende unos 3-4 μm desde el ápice propiamente dicho. Esta localización es similar a la de la sinaptobrevina SynA [12]. Covisualizamos ChsB y SynA en una cepa doble fluorescente y confirmamos que ambas proteínas colocalizan tanto en la membrana plasmática como en el Spitzenkörper (Figura R.41C). El hecho de que ambas proteínas presenten la misma

## Capítulo V

localización sugiere que utilizan rutas de transporte similares. La localización de ChsB en el casquete apical sugiere que, una vez la enzima llega a la membrana en vesículas secretoras, difunde alejándose del ápice; también sugiere que esta difusión está de algún modo restringida. La restricción se produciría por endocitosis de ChsB en las regiones subapicales de la membrana plasmática (Figura R.41C). Previamente, nuestro laboratorio había propuesto que la localización polarizada de SynA se mantiene por reciclaje endocítico (Figura R.41C) [12, 156].



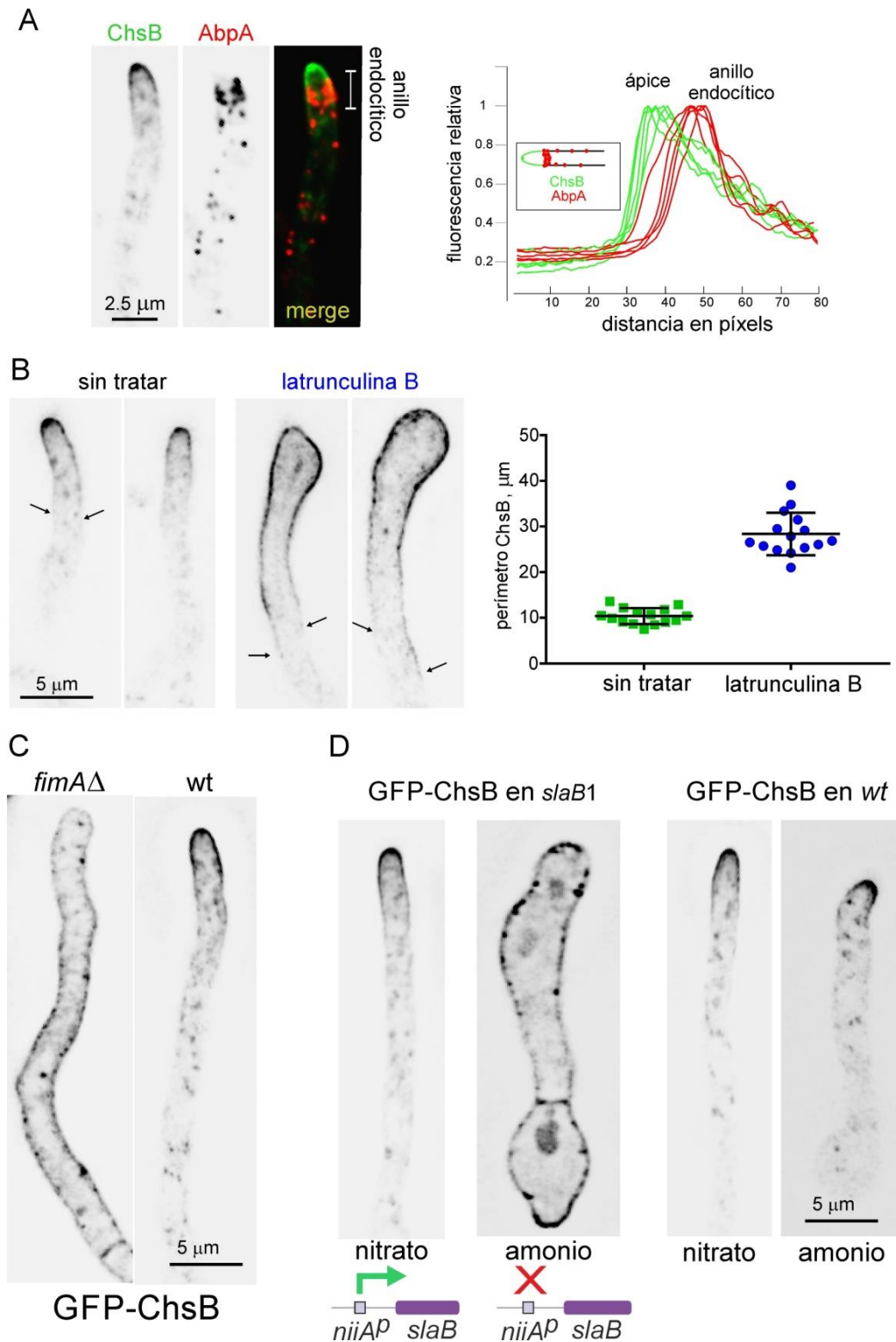
**Figura R.41. Localización subcelular de ChsB** **A.** Cultivo mixto de dos cepas que expresan GFP-ChsB y mCherry-ChsB, respectivamente. La imagen se trata de una proyección máxima de imágenes en el eje-z, sometidas a deconvolución. **B.** Localización de GFP-ChsB expresada en su locus bajo su propio promotor, como única fuente de ChsB. Presenta una localización altamente polarizada hacia los ápices de las hifas. Se localiza en la membrana apical, en el Spitzenkörper y en estructuras intracelulares. **C.** GFP-SynA y mCherry-ChsB presentan una localización muy parecida, posiblemente porque siguen rutas similares. Estas rutas podrían implicar reciclaje endocítico mediado por un anillo de endocitosis subapical. Se trata de proyecciones máximas de varios planos en el eje z, sometidas previamente a un proceso de deconvolución.

### 4.5.3. La localización polarizada de ChsB en la membrana plasmática se mantiene por endocitosis

En este apartado demostraremos, utilizando múltiples abordajes, que la polaridad de ChsB en la membrana plasmática requiere de su endocitosis en un anillo subapical especializado.

En *A. nidulans*, la endocitosis juega un papel importante en el mantenimiento de la polaridad de proteínas como SynA [12, 38, 156]. La maquinaria de endocitosis, formada por parches de actina y sus proteínas accesorias, se concentra en un anillo subapical en las hifas [177], anillo donde se concentran los parches de actina y se produciría la endocitosis de las proteínas polarizadas, impidiendo su difusión más allá de esta barrera [12]. Un componente de esta maquinaria de endocitosis es la proteína AbpA [177], que se une a F-actina. Para determinar la localización relativa del casquete polar de ChsB y del collar endocítico covisualizamos GFP-ChsB y AbpA-mRFP. Como se aprecia en la Figura R.42A, la localización de ChsB en la membrana plasmática coincide con la porción de membrana situada en posición apico-proximal al anillo de endocitosis marcado con AbpA. De hecho, en películas en las que visualizamos el crecimiento de las hifas, quedó patente que la extensión apical estaba coordinada con la localización de AbpA-mRFP a una distancia constante del ápice, y con la restricción en la localización de ChsB a la región anterior al anillo de endocitosis. Para confirmar estas observaciones cuantificamos la fluorescencia relativa de GFP-ChsB y mRFP-AbpA a lo largo de la membrana plasmática del casquete apical de 8 células (Figura R.42A). Esta cuantificación mostró que la reducción de la intensidad GFP-ChsB en la membrana coincide espacialmente con la aparición de la señal de mRFP-AbpA. Estos resultados sugerían que ChsB mantiene la polaridad en la membrana por un mecanismo en el que se requiere la endocitosis mediada por parches de actina.

La droga latrunculina B (latB) provoca la despolimerización del citoesqueleto de actina [215], desensamblando tanto los cables de actina como los parches endocíticos [177]. Esta droga se ha utilizado para estudiar el bloqueo de la endocitosis en *A. nidulans* [158]. Tratamos con latB (100  $\mu$ M) hifas en cultivo y determinamos el efecto en la localización de GFP-ChsB. El tratamiento con latB provocó una despolarización de la fracción de ChsB residente en la membrana plasmática, lo que se manifiesta en un significativo incremento del perímetro del casquete apical ocupado por ChsB (Figura R.42B). Este resultado involucra claramente a la endocitosis en la restricción de la localización de ChsB al casquete polar. Como control de actividad normal de la droga, visualizamos, en un cultivo en paralelo, GFP-RabE, comprobando el característico cambio en localización que esta proteína sufre como resultado de la eliminación de los cables de actina [36].



**Figura R.42. Endocitosis y la polarización de ChsB en la membrana apical. A.** Localización relativa de GFP-ChsB y AbpA-mRFP y cuantificación de  $n=5$  células, que demuestra que ChsB se localiza, en la membrana plasmática (MP), en la región anterior al anillo endocítico. **B.** El tratamiento con Latrunculina B, que inhibe la endocitosis mediante la despolimerización de actina, provoca una pérdida de polarización de ChsB en la MP; cuantificación de  $n=15$  células tratadas con la droga y  $n=15$  células sin tratar. **C.** El mutante *fimA* $\Delta$  presenta una pérdida total de polarización de ChsB. **D.** La inhibición de la expresión de SlaB provoca un efecto similar al causado por *fimA* $\Delta$ . (Para detalles sobre las cuantificaciones ver Materiales y Métodos).

Para confirmar la conclusión de que la endocitosis mantiene la polaridad de ChsB en la membrana plasmática, utilizamos dos mutantes: *fimAΔ* y *slaB1*. *fimA* codifica la proteína fimbrina (Sac6p en *S. cerevisiae*), cuya función es agrupar entre sí los filamentos de actina [216, 217]. Su delección retrasa el establecimiento de la polaridad durante la germinación y afecta severamente a la endocitosis [158, 218]. En las células *fimAΔ*, que presentan una morfología alterada, ChsB, lejos de encontrarse polarizado, se distribuye homogéneamente en la membrana plasmática (Figura R.42C). Por otro lado, *slaB1* es un alelo de expresión condicional de SlaB, una proteína esencial para el crecimiento de *A. nidulans* necesaria para la endocitosis [157]. Su ortólogo en *S. cerevisiae*, Sla2p, regula la función de Arp2/3 durante el proceso de endocitosis [219]. El alelo *slaB1* dirige la expresión de SlaB bajo el control del promotor regulable *niiA<sup>P</sup>* [157], que se induce con nitrato y se reprime con amonio. Por lo tanto, en presencia de amonio como fuente de nitrógeno la endocitosis se bloquea y el crecimiento se detiene [157]. Cultivamos conidiosporas *slaB1* en medio con amonio o nitrato. Las esporas provenían de colonias cultivadas en medio con nitrato y, por lo tanto, contenían una carga inicial de SlaB que permite su crecimiento, aunque limitado hasta que se “agota” la proteína, en amonio. En estas condiciones (con amonio), donde la expresión de SlaB está reprimida, ChsB se encontraba distribuida por toda la membrana plasmática (Figura R.42D). Por el contrario, en nitrato la morfología celular fue normal y ChsB presentó localización polarizada (Figura R.42D). Estos resultados, junto con la localización relativa de ChsB y AbpA y el efecto de la droga Latrunculina B, nos permiten concluir que la endocitosis de ChsB en el anillo subapical de parches de actina es necesaria para su polarización.

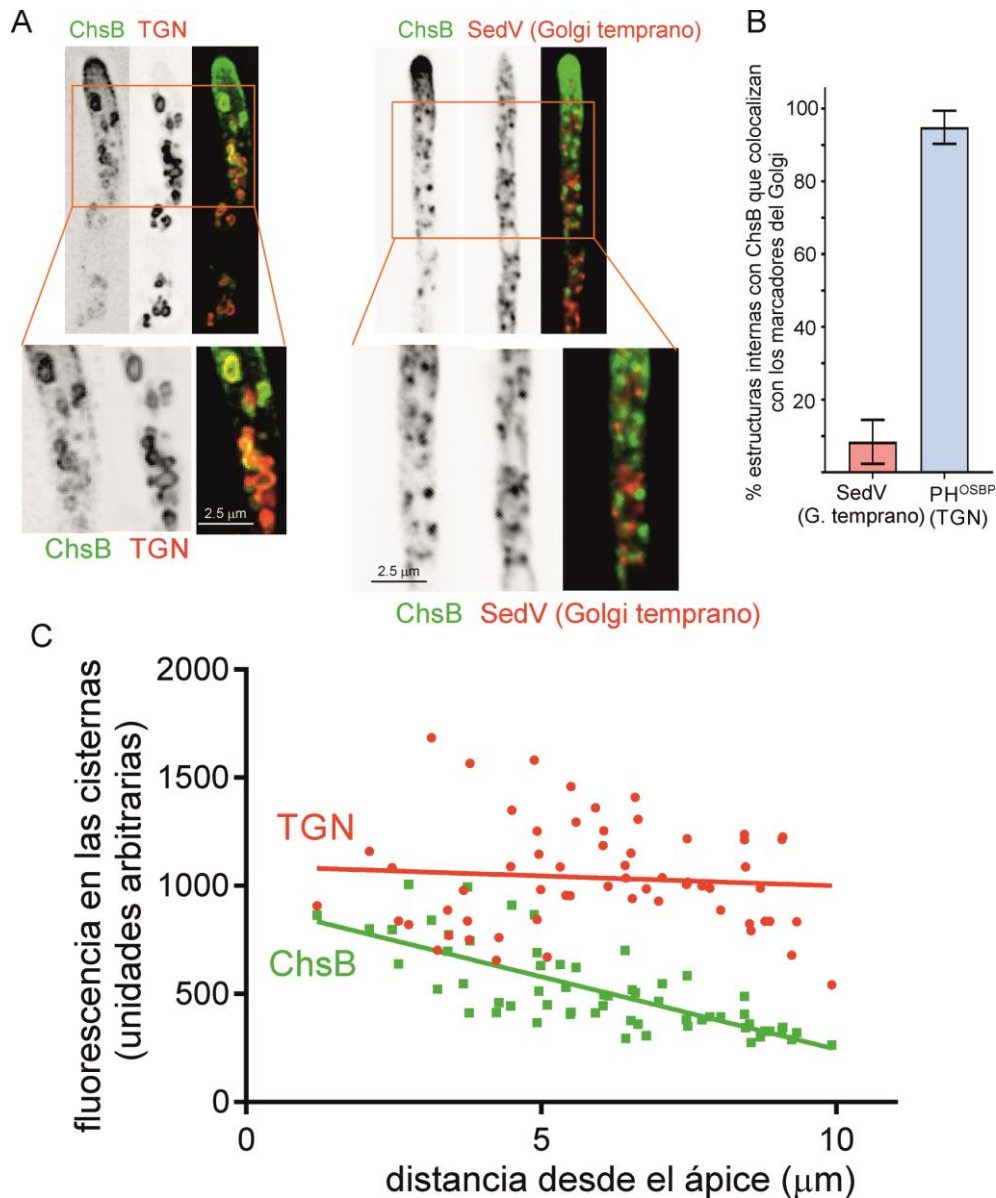
#### 4.5.4. La ChsB intracelular se localiza en las cisternas más apicales del *trans*-Golgi

mRFP-PH<sup>OSBP</sup> se localiza en las cisternas del TGN, también llamado Golgi tardío [24]. Mediante la visualización simultánea de GFP-ChsB y mRFP-PH<sup>OSBP</sup> (Figura R.43A), determinamos que los puntos citosólicos de ChsB colocalizan con las cisternas marcadas con mRFP-PH<sup>OSBP</sup>. Por tanto, ChsB se encuentra aparentemente en las cisternas del TGN y no en el Golgi temprano. Para confirmarlo, co-visualizamos mCherry-SedV y GFP-ChsB. SedV es una proteína SNARE y un marcador prototípico del Golgi temprano [18]. Construimos una cepa que expresaba GFP-ChsB y mCherry-SedV. Como muestra la Figura R.43A, las cisternas con ChsB no se corresponden con las cisternas del Golgi temprano, marcadas con mCherry-SedV.

Para confirmar estas observaciones, cuantificamos la localización de ChsB tanto en el TGN como en el Golgi temprano. Por una parte, determinamos que la proporción de cisternas con PH<sup>OSBP</sup> marcadas también con ChsB era del 95% (179 cisternas de n = 10 células); además determinamos el porcentaje de cisternas ChsB-positivas que también contenían PH<sup>OSBP</sup>, que fue también del 95%. Por otra parte, hicimos lo mismo para SedV: la proporción de cisternas SedV-

## Capítulo V

positivas con señal de ChsB fue del 8% (231 cisternas,  $n = 10$  células) y la de cisternas ChsB que tuviesen SedV fue del 13%. Parte de los resultados se muestran en la Figura R.43B. De este análisis se concluye que ChsB se encuentra muy mayoritariamente en el TGN. Téngase en cuenta que una pequeña proporción de cisternas con SedV contiene marcadores del TGN y que, de igual manera, una pequeña parte de las cisternas PH<sup>OSBP</sup> contiene proteína de Golgi temprano, debido a que se encuentran en un estadio intermedio del proceso de maduración [18].



**Figura R.43. Localización subcelular de ChsB en las cisternas del Golgi.** **A.** Izquierda, covisualización de GFP-ChsB y mRFP-PH<sup>OSBP</sup>, marcador del TGN, donde se aprecia que ambas proteínas colocalizan. Existe una mayor abundancia relativa de GFP-ChsB en las cisternas más apicales del TGN. Derecha, localización relativa de GFP-ChsB y mCherry-SedV; ambas proteínas no colocalizan. **B.** Cuantificación de la proporción de estructuras con ChsB y los marcadores del Golgi (para detalle ver texto). ChsB se localiza mayoritariamente en las cisternas del TGN. **C.** Eje y: intensidad de fluorescencia de GFP-ChsB (verde) y mRFP-PH<sup>OSBP</sup> en las mismas cisternas del TGN. Eje x: distancia de dichas cisternas al ápice celular. Existe una correlación negativa altamente significativa entre la intensidad de ChsB y la distancia al ápice, correlación que no existe en el caso de PH<sup>OSBP</sup>.

Tras determinar que ChsB se localiza en el TGN, observamos que su distribución no era homogénea y que existía mayor señal fluorescente en las cisternas más apicales (Figura R.43A). Realizamos una cuantificación de la fluorescencia de GFP-ChsB y mRFP-PH<sup>OSBP</sup> en 60 cisternas del TGN, localizadas en las 10  $\mu\text{m}$  más apicales de un total de 6 células (Figura R.43C). Mediante el análisis estadístico de correlación de Pearson [220], confirmamos que la intensidad de GFP-ChsB en las cisternas del TGN correlaciona negativamente con la distancia apical ( $P < 0.0001$ ,  $r = -0.75$ ,  $n = 60$ ), correlación que no existe en el caso de mRFP-PH<sup>OSBP</sup> ( $P = 0.536$ ,  $n = 60$ ). Por tanto, cuanto más apical es una cisterna del TGN más ChsB contiene; en otras palabras, las cisternas apicales del TGN están enriquecidas con ChsB. Estos resultados sugieren que aquellas cisternas más cercanas al anillo endocítico acumulan más ChsB, probablemente porque recibirían más enzima proveniente de endocitosis, dado que los compartimentos endosomales por los que ChsB circularía se formarían cerca del anillo de endocitosis, en la región subapical, y por tanto se fusionarían preferentemente con las cisternas más cercanas y “accesibles”. Estos datos indicaban que ChsB se recicla a la membrana plasmática a través del TGN, en lugar de directamente desde un endosoma de reciclaje.

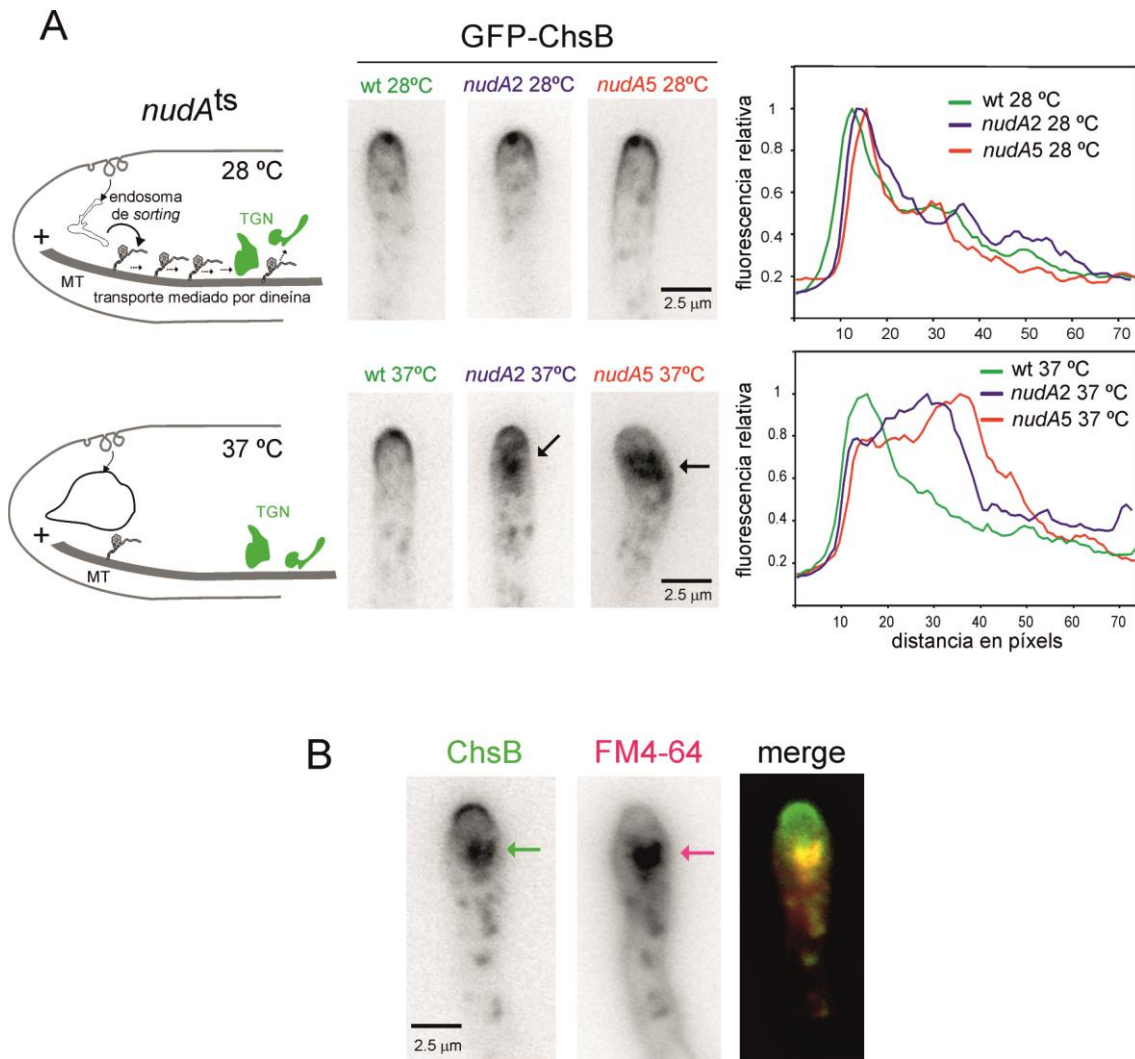
#### 4.5.5. El transporte basípeta de ChsB requiere la función de la dineína

A la vista de la distribución desigual de ChsB en el TGN hipotetizamos que era posible que existiese un paso de transporte en dirección basípeta que enviase ChsB desde un compartimento endosomal —que recibiría tráfico del anillo de endocitosis— al TGN. En *A. nidulans* los microtúbulos se disponen con su extremo (+) hacia el ápice de la hifa. Por lo tanto, en el caso de depender de microtúbulos, el supuesto transporte basípeta de ChsB debería estar mediado por la dineína citoplásmática, dado que es el único motor que viaja hacia el extremo (-) de los microtúbulos.

Para investigar si se requiere dineína para el tráfico de ChsB desde un compartimento endosomal a las cisternas del TGN utilizamos *nudA2* y *nudA5*, dos mutantes termosensibles de *nudA*, que codifica la cadena pesada de la dineína [15]. Como muestra la Figura R.44A, la distribución de ChsB fue normal a 28°C en *nudA2* y *nudA5*. Sin embargo, cuando la temperatura del cultivo se incrementó (lo que no afectó a la localización de ChsB en la cepa wt) ChsB se deslocalizó progresivamente del casquete apical y marcó una estructura en la región citoplasmática apical, aparentemente a expensas de la ChsB de la membrana plasmática. Este compartimento es similar al compartimento donde se acumula SynA en situación de déficit de dineína [156]. Con *nudA2*, demostramos que este compartimento en el que ChsB se acumula es rápidamente accesible al marcador endocítico FM4-64. FM4-64 es un fluoróforo lipofílico que se ha utilizado para seguir la internalización de membranas por endocitosis y su transporte a las vacuolas, ya que tiñe, en pasos sucesivos, los diferentes compartimentos de la ruta endocítica

## Capítulo V

[162]. En tan sólo 5 minutos desde la “carga” de FM4-64, éste accedió al “compartimento *nudA2*” que contenía ChsB (Figura R.44B). Este resultado confirmó que el compartimento anormal donde se acumula ChsB posee origen endocítico. Para descartar que dicho compartimento tuviese identidad de endosoma tardío utilizamos el marcador CMAC (7-amino-4-clorometil coumarin), que tiñe endosomas y vacuolas que ya han recibido el tráfico biosintético de enzimas hidrolíticas del TGN [156]. Al contrario que el FM4-64, el CMAC no marcó el compartimento donde se acumula ChsB, lo que demuestra que no tiene identidad de endosoma tardío / vacuola.

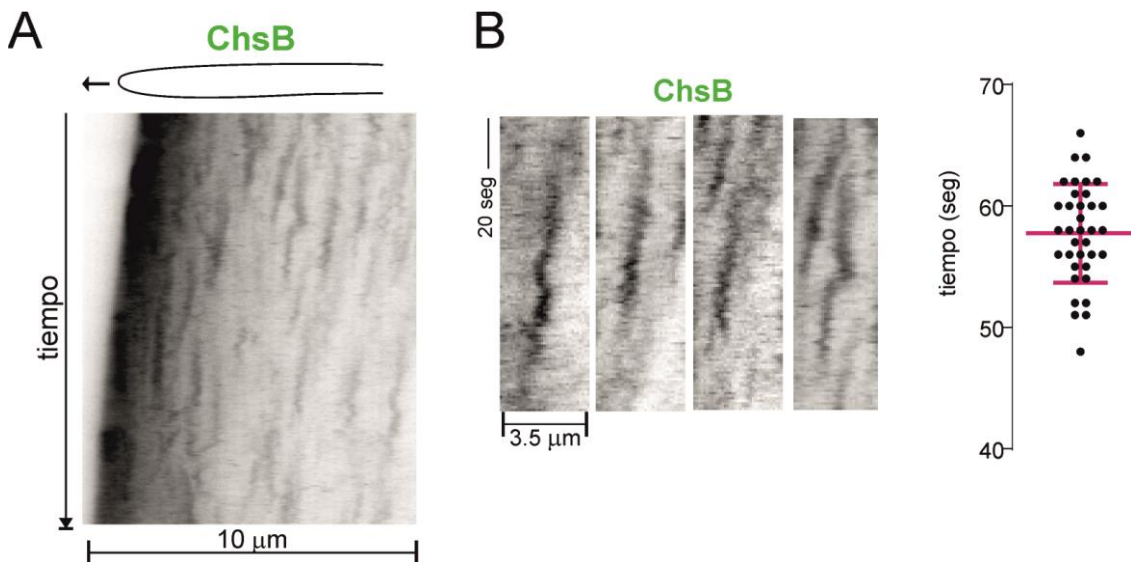


**Figura R.44. La dineína media el transporte basípeto de ChsB. A.** A la izquierda, hipotético modelo del transporte basípeto mediado por dineína y el efecto de su inactivación. La inactivación de NudA por incremento de la temperatura de cultivo de los mutantes termosensibles *nudA2* y *nudA5* provoca una relocalización de GFP-ChsB desde la membrana apical a un compartimento subapical. A la derecha se muestra la medida de intensidad de fluorescencia a lo largo de la hifa (linescan) de las células mostradas. **B.** El compartimento donde se acumula ChsB al inactivarse NudA tiene naturaleza endocítica, dado que se marca con FM4-64 en muy poco tiempo (la imagen corresponde a 14 minutos después de la adición del colorante fluorescente).

En su conjunto, los resultados arriba explicados indican que ChsB es endocitada en el anillo subapical de endocitosis y que viaja desde compartimentos endosomales al TGN, en un proceso de reciclaje endocítico en el que participa la dineína.

#### 4.5.6. ChsB reside en el TGN de manera transitoria

Una vez establecido que ChsB se localiza en las cisternas apicales del TGN, nos propusimos averiguar su comportamiento a lo largo del tiempo. Realizando microscopía *time-lapse*, con una resolución temporal de 1-2 imágenes por segundo, determinamos que GFP-ChsB se localiza en las cisternas del TGN de manera transitoria. Mediante quimógrafos, derivados de regiones de interés trazadas a través del eje longitudinal, en los que el eje *y* representa tiempo y el eje *x* distancia, estudiamos la dinámica de ChsB. Las líneas verticales (Figura R.45A) reflejan las cisternas del TGN a lo largo del tiempo de manera que la longitud de dichas líneas refleja el tiempo de residencia de ChsB en dichas cisternas. El tiempo medio de residencia, basado en 36 eventos observados en un total de 20 células, fue de  $58 \pm 4$  segundos (desviación estándar) (Figura R.45B). Este tiempo medio representa más o menos la mitad de los 2 minutos de vida media que previamente se había determinado para las cisternas del TGN [36]. Por tanto, este resultado sugiere que el tiempo de residencia de ChsB en el TGN vendría delimitado por su llegada a una cisterna preexistente y su salida en vesículas secretoras hacia la membrana plasmática. Intentamos visualizar el tráfico de GFP-ChsB desde las cisternas del TGN a la membrana plasmática. Sin embargo, la baja relación señal/ruido debida al gran predominio de ChsB en la región del ápice nos impidió visualizar de manera directa este transporte.



**Figura R.45. Presencia transitoria de ChsB en el TGN.** **A.** Quimógrafo de una célula que expresa GFP-ChsB. Se aprecian múltiples trazas con origen y final que corresponden a cisternas del TGN marcadas con GFP-ChsB. **B.** Algunas trazas ampliadas que evidencian la presencia transitoria de ChsB en el TGN. Se muestra la medición del tiempo de estancia de ChsB en un total de 36 cisternas.

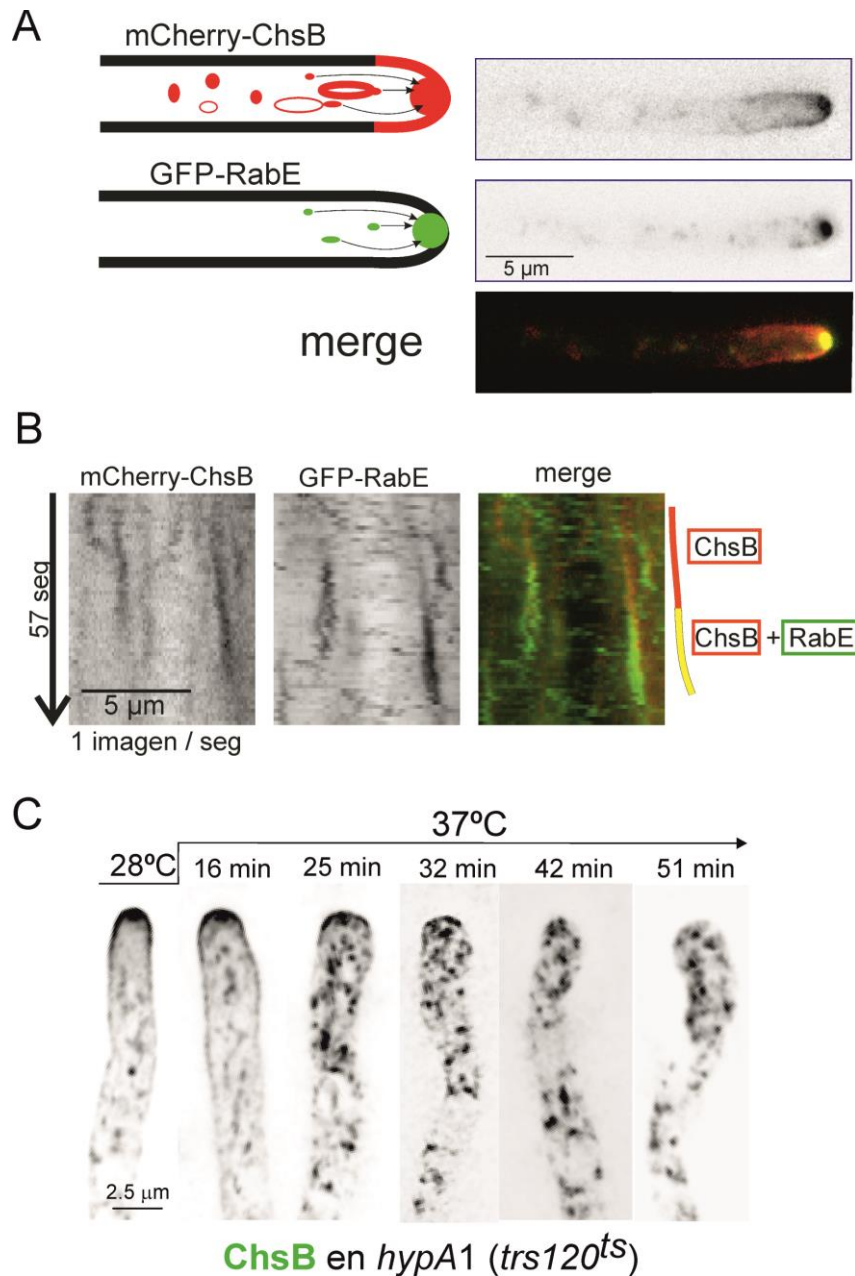
En *A. nidulans*, las cisternas del TGN, maduran a *carriers* exocíticos al adquirir la GTPasa RabE, tras lo cual estos *carriers* viajan inmediatamente al ápice para su exocitosis [36]. En este proceso, las cisternas sufren cambios en su composición por los que pierden gradualmente la identidad del Golgi, a medida que adquieren RabE [36]. Hipotetizamos que ChsB utilizaría esta ruta y por tanto que la salida de ChsB del TGN coincidiría con el reclutamiento de RabE. Para intentar averiguarlo, co-visualizamos mCherry-ChsB y GFP-RabE. ChsB y RabE presentan poca colocalización, al igual que RabE y PH<sup>OSBP</sup> (Figura R.46A) [36]. Cofilmamos ChsB y RabE tomando una imagen por segundo, durante series temporales de 2 minutos. De este modo, visualizamos procesos aislados en que RabE se recluta al final de un ciclo de mCherry-ChsB (Figura R.46B), sin embargo estos experimentos no fueron completamente concluyentes debido a que la fotoinactivación de mCherry-ChsB hizo inviable el acumular un número suficiente de estos eventos para realizar el necesario análisis cuantitativo.

En conclusión, ChsB se localiza en las cisternas del TGN de manera transitoria, con un tiempo medio de estancia menor que el tiempo de vida de la cisterna, lo que indica que la estancia de ChsB en el TGN es sólo temporal, en su viaje a la membrana plasmática.

### 4.5.7. La función de TRAPPII es necesaria para el tráfico de ChsB

Dada la dificultad técnica de co-visualizar RabE<sup>RAB11</sup> y ChsB durante la salida de las vesículas secretoras del TGN nos centramos en un abordaje genético. La activación de RabE en el TGN la realiza TRAPPII, que actúa como su GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) [37]. *hypA* es un gen esencial que codifica Trs120, una de las subunidades específicas de TRAPPII necesaria para la activación de RabE [37]. A temperatura restrictiva la mutación termosensible *hypA1* impide la activación de RabE, imposibilitando su reclutamiento a membranas [37]. Para determinar el efecto de la inactivación de TRAPPII en el tráfico de ChsB, estudiamos por microscopía la dinámica de GFP-ChsB en el mutante termosensible *hypA1*.

A 28°C, la cepa *hypA1* crece como una cepa silvestre y RabE presenta también una localización wt [37]. *hypA1* no afectó a la localización de ChsB a 28°C (Figura R.46C). Por el contrario, tras 25 minutos de subir la temperatura del cultivo a 37°C ChsB desapareció de la membrana plasmática y, más tarde, del Spitzenkörper en el mutante *hypA1* —pero permaneció “normal” en una cepa wt —, acumulándose en estructuras intracelulares (Figura R.46C). Este resultado indica que RabE ciertamente se requiere para el tráfico de ChsB a la membrana plasmática.



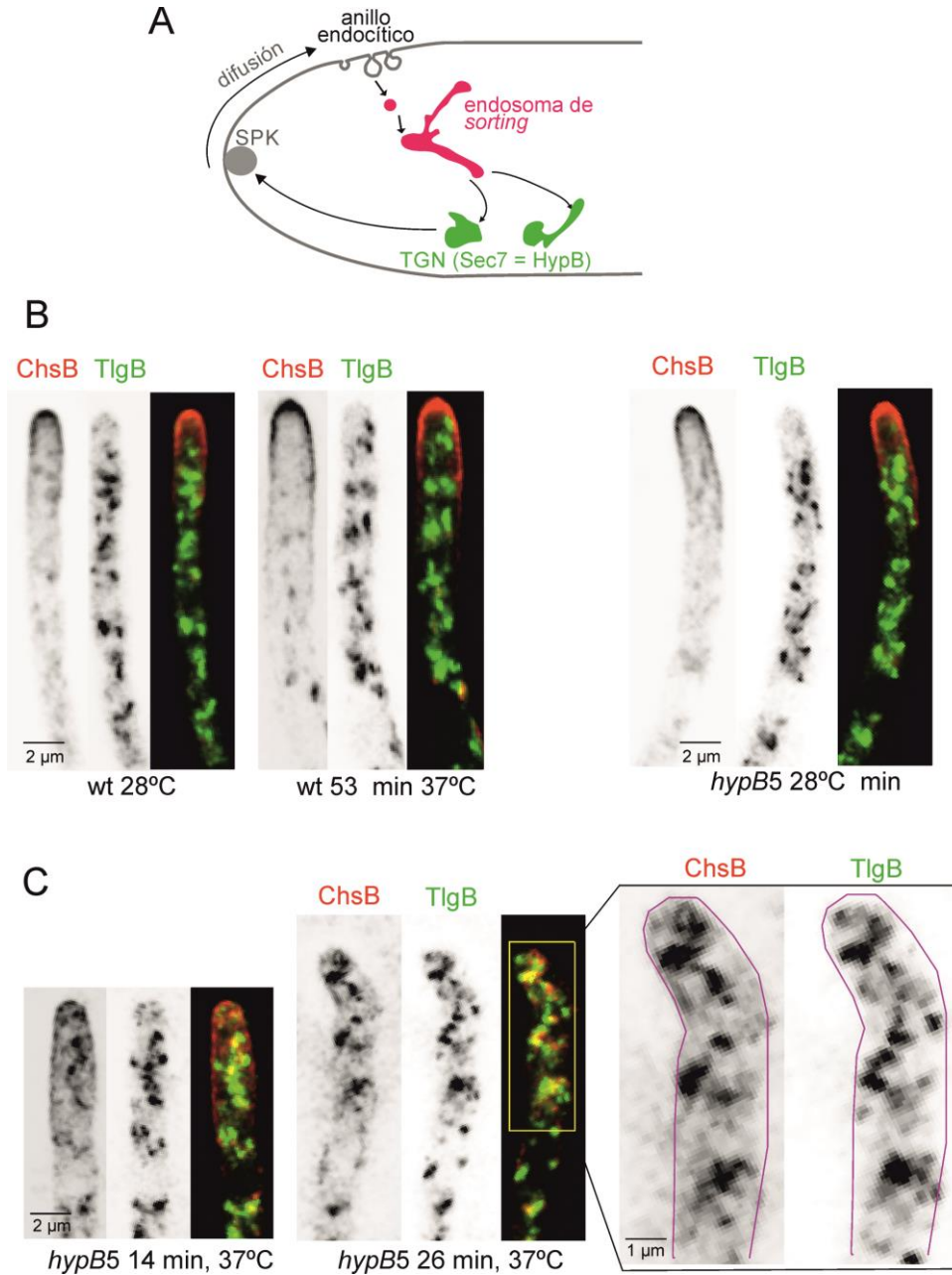
**Figura R.46. Estudio de la relación de RabE y ChsB.** **A.** Localización relativa de GFP-RabE y mCherry-ChsB que muestra la que ambas proteínas colocalizan en el Spitzenkörper. **B.** Procesos aislados en que cisternas marcadas con mCherry-ChsB adquieren GFP-RabE, nunca hemos visualizado el proceso contrario. **C.** Se muestra la deslocalización de GFP-ChsB de la membrana plasmática por efecto de la inactivación de la subunidad Trs120 del complejo TRAPP11.

#### 4.5.8. ChsB se acumula en el TGN por inactivación de Sec7

Snc1, El ortólogo de SynA en *S. cerevisiae*, viaja desde los endosomas al Golgi, para después volver a la membrana plasmática [221]. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que existe otra ruta de reciclaje endocítico que no pasa por el aparato de Golgi, en la que la exocitosis ocurre directamente desde los endosomas tempranos [41]. El *cargo* que viaja por esta ruta directa no se acumula en el TGN en célula mutantes *sec7-1* (Sec7 es la GEF de Arf1 en el

## Capítulo V

TGN). Dado que nuestros resultados sugerían que ChsB está sujeto a un reciclaje endocítico a través del TGN (Figura R.47A) utilizamos *hypB5*, una mutación termosensible en el gen que codifica Sec7 (HypB) de *A. nidulans* [24]. *hypB5* provoca, a temperatura restrictiva, la parada de la secreción apical [18].



**Figura R.47. Bloqueo de ChsB en el TGN por inactivación de Sec7/HypB.** **A.** Modelo de trabajo de la ruta de reciclaje endocítico seguida por ChsB y otras enzimas modificadoras de la pared celular. **B.** Localización de mCherry-ChsB y el marcador del TGN GFP-TlgB en una cepa wt y en *hypB5* a 28°C. No existen diferencias apreciables entre ambas cepas a esta temperatura. Al incrementar la temperatura a 37°C en la cepa wt la localización de ambas proteínas permanece inalterada. **C.** En el mutante *hypB5*, después de un cambio de temperatura a 37°C, en poco tiempo mCherry-ChsB se acumula en estructuras intracelulares que corresponden a las cisternas del TGN marcadas con GFP-TlgB. En la ampliación se aprecia el alto grado de colocalización entre mCherry-ChsB y GFP-TlgB. (Todas las imágenes corresponden a proyecciones máximas de planos en el eje z después de haber sido procesadas mediante deconvolución).

ChsB presentó una localización normal en el mutante *hypB5* a 28°C (Figura R.47B). Sin embargo, al incrementar la temperatura a 37°C, ChsB se deslocalizó en un tiempo de tan sólo 15 minutos del casquete apical y del Spk y pasó a estructuras intracelulares (Figura R.47C). Mediante covisualización de ChsB y TlgB confirmamos que las estructuras intracelulares donde se acumula ChsB corresponden a membranas del TGN, ya que también contienen TlgB (Figura R.47C). Como control se confirmó que en una cepa wt el cambio de temperatura de 28°C a 37°C no altera la localización ni de ChsB ni de TlgB (Figura R.47B).

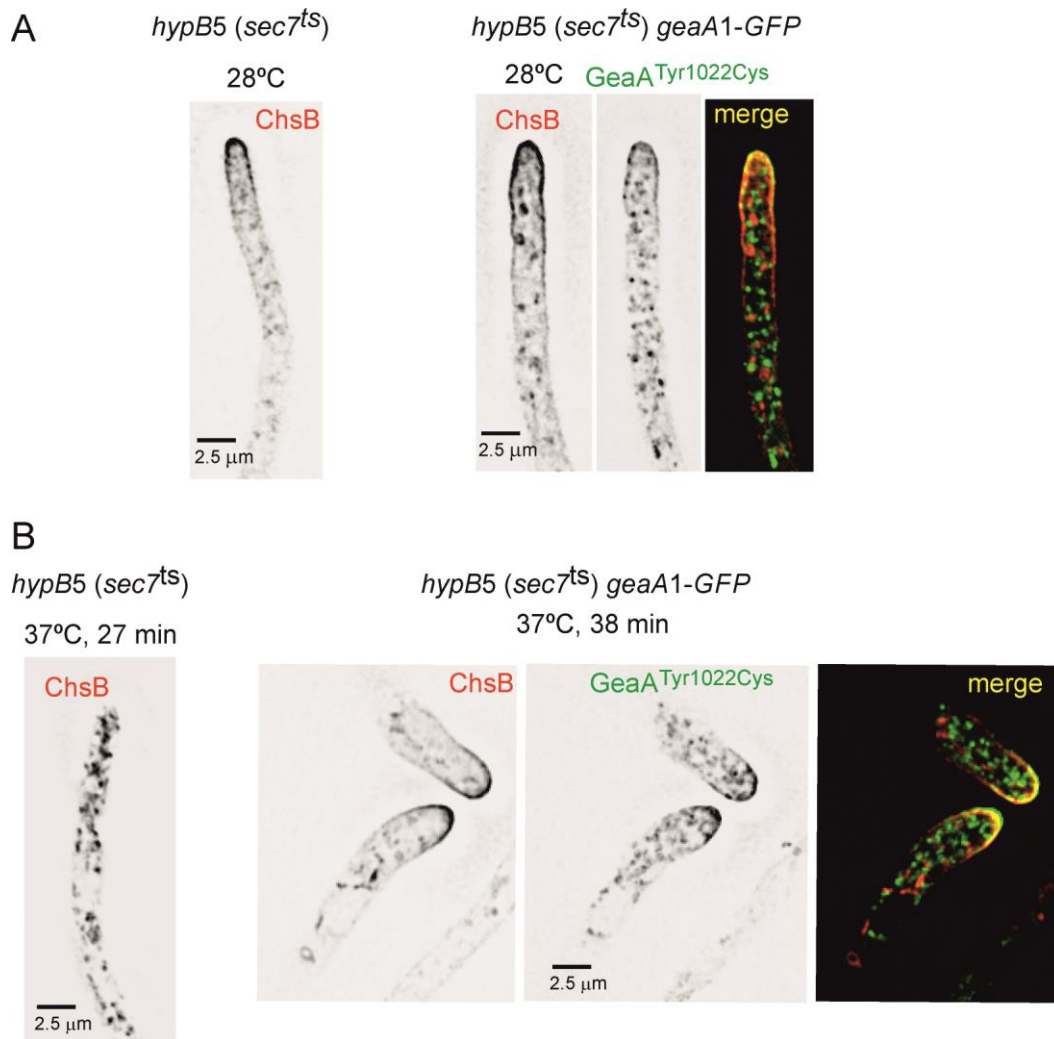
En resumen, ChsB se acumula en las cisternas del TGN después de la inactivación de Sec7. Globalmente, los resultados indican firmemente que la localización de ChsB en la membrana apical se mantiene por reciclaje endocítico a través de las cisternas apicales del TGN, cuya función depende de Sec7 (HypB).

### **4.5.9. La mutación *geaA1* restaura la localización silvestre de ChsB en el mutante *hypB5***

Como se demuestra en el capítulo III, *geaA1* codifica una versión mutante de la GEF GeaA (Gea1 en *S. cerevisiae*), que remedia tanto la termosensibilidad de *hypB5* como la letalidad de *hypBΔ*. Para determinar si *geaA1* suprime el requerimiento de HypB para la localización de ChsB en la membrana plasmática construimos una cepa mutante *hypB5 geaA1-gfp mCherry-chsB*. A 28°C, ChsB se localizó como en la cepa silvestre (Figura R.48A). Las cisternas intracelulares donde se encontraba ChsB no se correspondían con las marcadas con GFP-GeaA1 (que predomina en el Golgi temprano), lo que indica que ChsB se localiza en las cisternas del TGN también en el fondo genético *geaA1*, como ocurre normalmente. Al incrementar la temperatura del cultivo, no se alteró la localización de ChsB, que permaneció en el casquete apical en el doble mutante *geaA1 hypB5* (Figura R.48B), al contrario de lo que ocurre con el mutante simple *hypB5*, en el que ChsB se acumula en cisternas intracelulares (Figura R.48B), como se discutió en el apartado anterior.

Por otro lado observamos que a 37°C ChsB tampoco colocalizó en el Golgi temprano con GeaA1 en la cepa *hypB5 geaA1-gfp mCherry-chsB* (Figura R.48B). Esto sugiere que el mecanismo de supresión no está mediado por el reciclaje de ChsB desde cisternas del Golgi temprano, hipotéticamente promovido por *geaA1*.

En cualquier caso, estos resultados demuestran que el alelo *geaA1* suprime el requerimiento de HypB para el reciclaje de ChsB [12]. Por lo tanto, refuerzan la implicación directa de la GEF Sec7/HypB en la localización de ChsB en la membrana apical.



**Figura R.48. Supresión por *geaA1* de la deslocalización de ChsB causada por *hypB5*.** A. ChsB presenta una localización nativa a 28°C tanto en un mutante *hypB5* como en el mutante doble *hypB5 geaA1-gfp*. B. Al incrementar la temperatura a 37°C, mCherry-ChsB se relocaliza a las cisternas del TGN en la cepa *hypB5*, mientras que permanece en la membrana plasmática en el doble mutante. En ningún caso ChsB y GeaA1 colocalizan en las cisternas del Golgi, lo que sugiere que ChsB se encuentra en el TGN en estas condiciones. Las imágenes son proyecciones máximas en el eje z sometidas a un proceso de deconvolución.

#### 4.5.10. RabO (RAB1) se requiere para el tráfico de ChsB

La función de RAB1/Ypt1 (RabO en *A. nidulans*) se ha circunscrito a la regulación del tráfico de llegada al aparato de Golgi desde el retículo endoplasmático (RE). Sin embargo, recientemente se ha determinado su localización en *A. nidulans* y *Neurospora crassa*, y se ha observado que, además de encontrarse en el Golgi temprano, se localiza también en el Spitzenkörper, la prototípica estructura exocítica de los hongos filamentosos [18, 222]. De hecho, se ha propuesto que RabO podría regular la fusión de vesículas con la membrana plasmática, lo que sería una función novedosa para esta GTPasa [159]. Nosotros confirmamos que ChsB y RabO colocalizan en el Spitzenkörper (Figura R.49A).

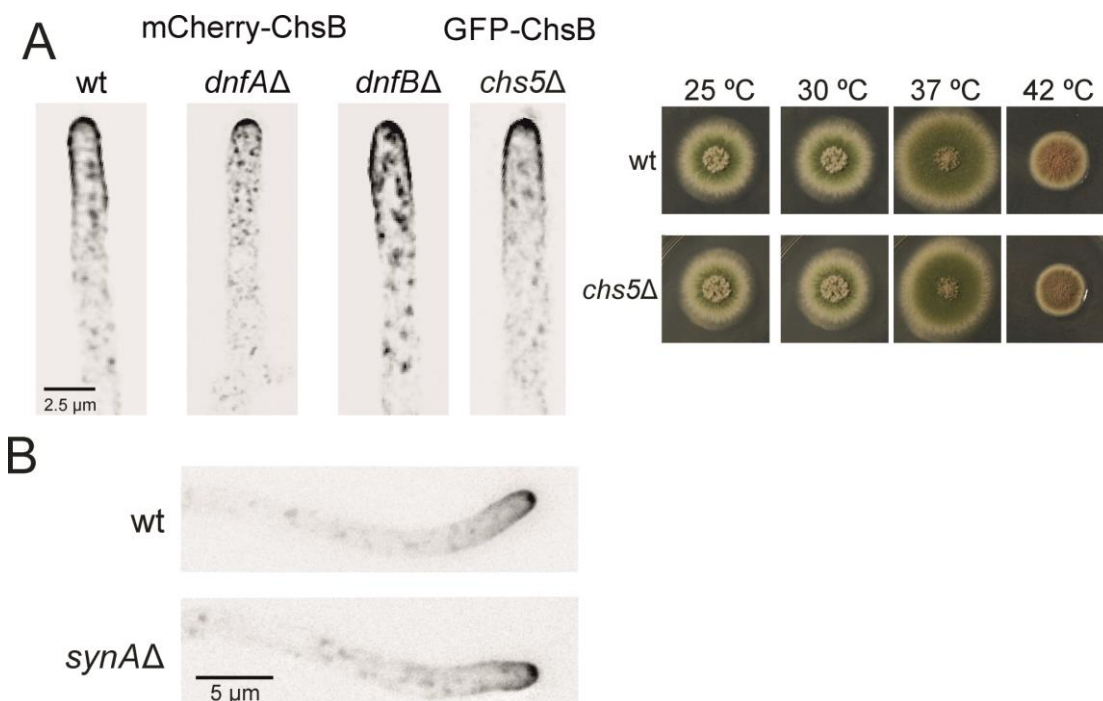


## Capítulo V

ChsB estaba afectada en *rabO*<sup>ts</sup> incluso a 28°C, ya que detectamos a dicha temperatura un incremento de fluorescencia intracelular, aparentemente a expensas de la fluorescencia del casquete apical (Figura R.49C-D). Después de 20 minutos tras cambiar la temperatura a 37°C no se detectó ChsB en la membrana apical, sino en puntos intracelulares, efecto que no se produjo en una cepa wt (Figura R.49C-D). Estos resultados demuestran que se requiere RabO para la localización de ChsB en la membrana apical, pero no ahondan en si este requerimiento procede del papel de RabO en el Golgi o de una hipotética función en el Spitzenkörper. Sin embargo, la interacción sintética detectada y la rápida deslocalización de ChsB del casquete polar sugieren que RabO podría realizar una función “post-Golgi” en el tráfico de ChsB.

### 4.5.11. La ausencia de la subunidad Chs5 del exómero no altera el tráfico de ChsB

En *S. cerevisiae*, la proteína Chs5p forma parte de un complejo oligomérico denominado exómero, que se requiere para el tráfico del TGN a la membrana plasmática de la quitina sintasa Chs3p y de otras proteínas [56]. Delecionamos el ortólogo de *CHS5* en *A. nidulans* (AN8710≡*chs5*) y comprobamos que las cepas *chs5*Δ no presentan defectos ni en el crecimiento ni en la localización de ChsB (ver Figura R.50A). Estos datos indican que el exómero no está implicado en el tráfico de ChsB.



**Figura R.50. Localización de ChsB en los mutantes *dnfA*Δ, *dnfB*Δ, *chs5*Δ y *synA*Δ.** A. *dnfA*Δ y *chs5*Δ no afectan a la localización de ChsB, mientras que la deleción de *dnfA* provoca una ligera deslocalización de ChsB. A la izquierda, test de crecimiento en medio completo (MCA) del mutante *chs5*Δ y una cepa wt. B. *synA*Δ no altera la distribución de GFP-ChsB. Todas las imágenes son proyecciones máximas en el eje z y las de A han sido sometidas a deconvolución.

#### 4.5.12. Implicación de la actividad flipasa en el tráfico de ChsB

Las rutas que conectan el TGN con la membrana plasmática presentan la particularidad de que no parecen necesitar de proteínas de cubierta para deformar la membrana del TGN y formar las vesículas de secreción. Existe cierta evidencia de que la composición lipídica, específicamente los dominios enriquecidos en esfingolípidos y esteroides, y la distribución asimétrica de determinados fosfolípidos en la membrana del TGN contribuyen a la biogénesis de las vesículas o *carriers* de secreción [98, 159, 223]. Por ello determinamos el efecto en ChsB de la delección de las flipasas DnfA y DnfB [161]. DnfA presenta una localización similar a ChsB y, de hecho, se endocita en el anillo subapical de parches de actina [161]. La delección de *dnfA* afectó débilmente a la localización de ChsB, cuya distribución en la membrana apical estaba alterada y abarcaba una menor superficie en el casquete polar (Figura R.50A). Esto sugiere que la flipasa DnfA pudiera jugar un papel en el tráfico de ChsB. Por el contrario, la delección de *dnfB* (*DRS2* en *S. cerevisiae*) no alteró la localización de ChsB (Figura R.50A).

#### 4.5.13. La sinapobrevina SynA no se requiere para el tráfico de ChsB

Pese a que se ha propuesto que SynA (homóloga de Snc1p en levadura) es la v-SNARE implicada en la fusión de las vesículas exocíticas con la membrana plasmática [12], hemos demostrado recientemente que la delección de *synA* no afecta al crecimiento (Manuel S. López-Berges, sin publicar). Visualizamos GFP-ChsB en una cepa *synAΔ* y comprobamos que su distribución no estaba alterada (Figura R.50B). Por lo tanto, la función de SynA no se requiere para la exocitosis ni para el reciclaje endocítico de ChsB, pese a circular, aparentemente, por la misma ruta.

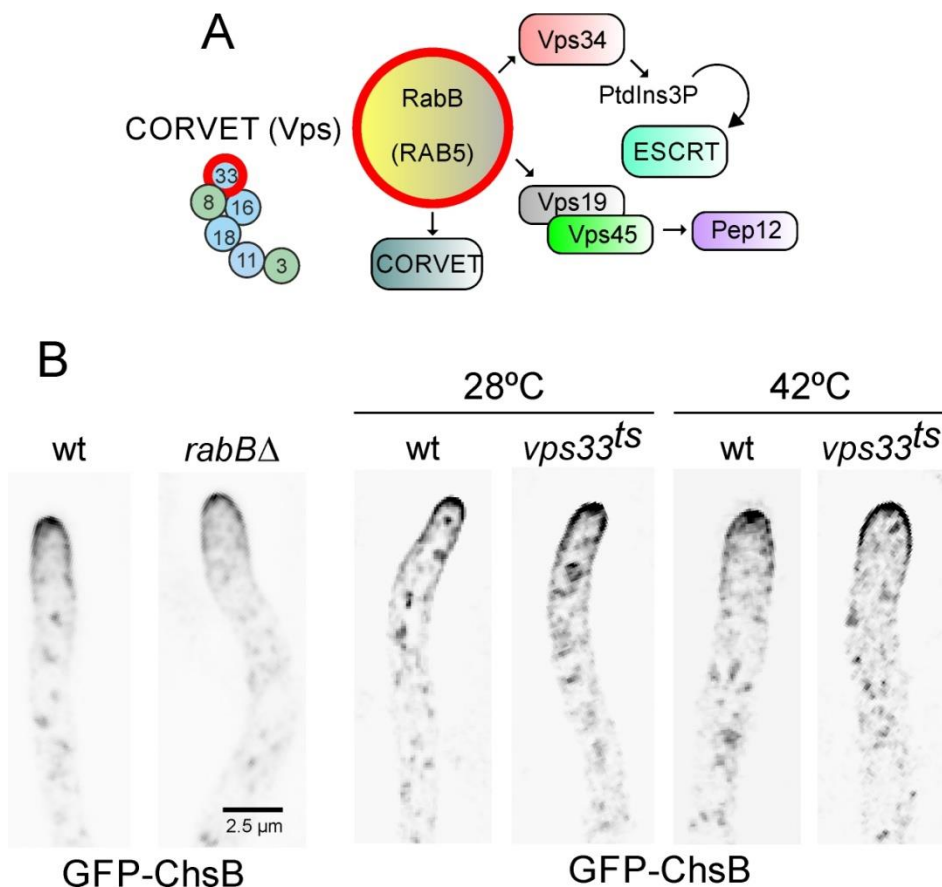
#### 4.5.14. ChsB recicla al TGN desde un compartimento endosomal localizado aguas arriba del dominio RabB (RAB5)

RabB (RAB5) es la Rab principal de los endosomas tempranos y una GTPasa clave en el proceso de maduración endosomal, dado que recluta la enzima fosfatidil inositol-3-fosfoquinasa (PtdIns3P) kinasa Vps34, que se requiere, a través de la síntesis de PtdIns3P, para la iniciación de la ruta de los cuerpos multivesiculares [164]. También recluta a los endosomas al complejo CORVET, que media eventos de fusión en los endosomas, y a los motores para el transporte de estos endosomas tempranos en microtúbulos [156, 164, 167, 224-226] (Figura R.51A). Por lo tanto, si ChsB recicla al TGN desde endosomas tempranos RabB/RAB5<sup>+</sup>, la delección de *rabB* afectaría considerablemente su localización. Para averiguarlo construimos la cepa *gfp-chsB rabBΔ* y determinamos que ChsB se localiza normalmente en ausencia de RabB (Figura R.51B). Este resultado indica que el compartimento endosomal desde el que ChsB recicla al

## Capítulo V

TGN se encuentra aguas arriba de los endosomas que contienen PtdIns3P y ESCRT. Hipotéticamente, este compartimento podría corresponder al denominado endosoma post-Golgi, propuesto por Pelham y colaboradores [227].

Para confirmar el resultado obtenido con *rabBΔ*, utilizamos un mutante termosensible (*hbrA2*  $\equiv$  *vps33<sup>ts</sup>*) del gen que codifica la proteína SM (*Sec1/Munc18-like*) denominada Vps33, que es una de las subunidades del complejo CORVET [167]. Este mutante es inviable a 42°C. Tanto a temperatura permisiva (28°C), como después de un cambio a restrictiva (>1.5 horas a 42°C), ChsB no varió su localización (Figura R.51B). Este resultado confirma que el reciclaje de ChsB es independiente de los “endosomas RabB/RAB5” en el reciclaje de ChsB. Nótese que tanto *rabBΔ* como *vps33<sup>ts</sup>* impiden la secreción de inulinasa por una ruta independiente a la de ChsB (ver capítulo VI).

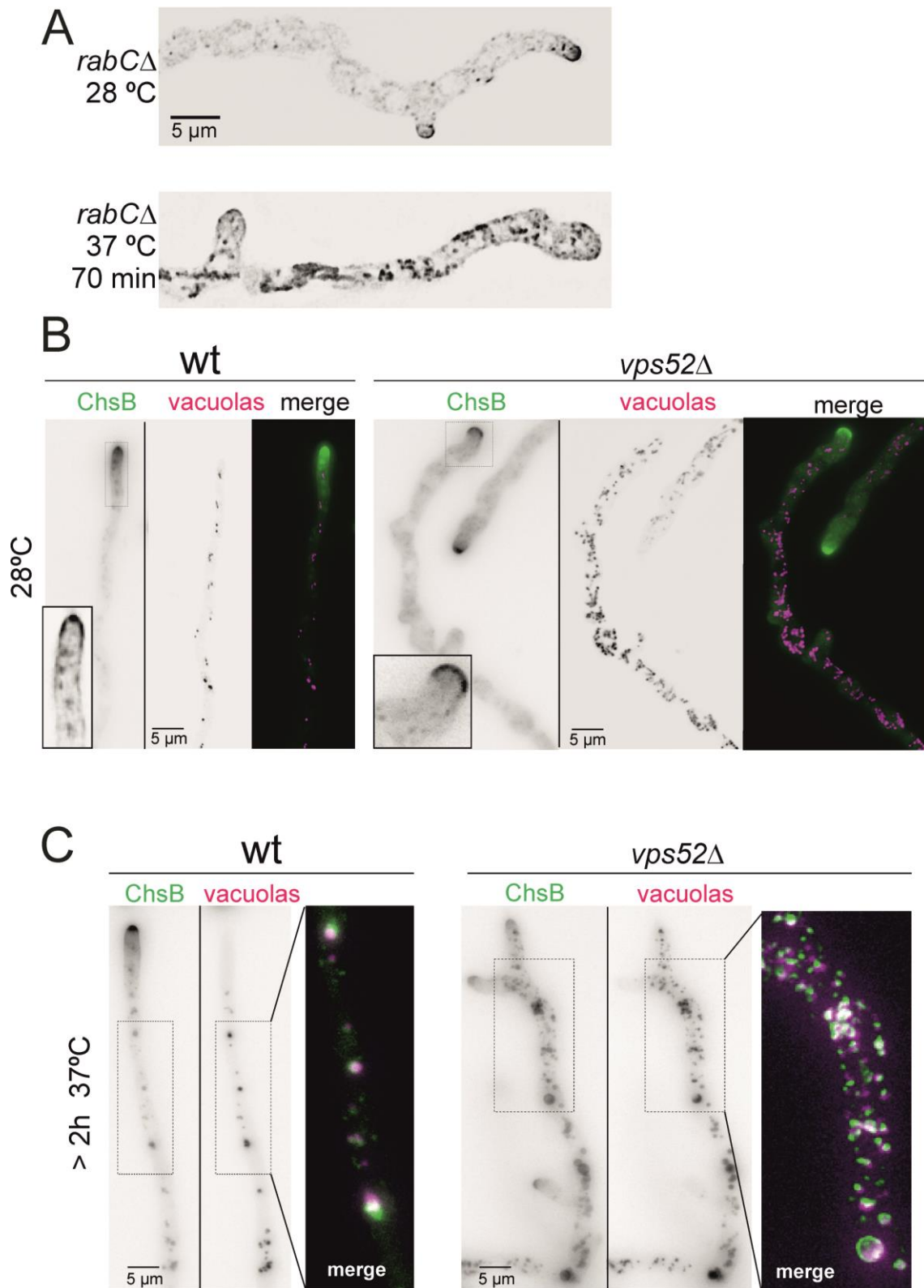


**Figura R.51. Las funciones endosomales relacionadas con RabB (RAB5) no se requieren para el tráfico de ChsB.** **A.** Esquema que representa los efectores reclutados por RabB. A la izquierda, las distintas subunidades del complejo CORVET. Los mutantes utilizados afectan a Vps33 y RabB, que presentan un círculo rojo en el esquema. **B.** Microscopía de fluorescencia que muestra la “localización wt” que presentan el mutante *rabBΔ* y el mutante termosensible *vps33<sup>ts</sup>* a 28°C y después de 1.5 horas a 42°C. Todas las imágenes corresponden a una proyección de las intensidades máximas de planos en el eje z. En el experimento con *vps33<sup>ts</sup>*, las imágenes han sido sometidas a deconvolución.

#### 4.5.15. El reciclaje de ChsB depende críticamente de RabC y GARP

Para investigar la ruta que transporta ChsB desde los endosomas al TGN, nos centramos en Rab6 (RabC en *A. nidulans*), un regulador clave del tráfico retrógrado que conecta los endosomas con el aparato de Golgi [228]. A 28°C, la delección de *rabC* [38] afectó gravemente la localización de ChsB (Figura R.52A), disminuyendo la cantidad de ChsB que se localiza en la membrana apical. Además, también provocó la presencia de fluorescencia citosólica difusa, que posiblemente corresponde a vesículas incapaces de fusionarse con su compartimento de destino. Estas observaciones implicaron a RabC en el reciclaje de ChsB. El principal candidato a mediar este rol de RabC es el complejo GARP (*Golgi-associated retrograde protein*). El complejo oligomérico de *tethering* o anclaje GARP está formado por cuatro subunidades diferentes, denominadas Vps51, Vps52, Vps53 y Vps54. GARP se asocia con la cara citosólica del TGN y reconoce el tráfico proveniente de los endosomas, para su incorporación al aparato de Golgi [229, 230]. Este complejo, en *S. cerevisiae*, se localiza en el Golgi por interacción con Ypt6 (Rab6 en mamíferos, RabC en *A. nidulans*) a través de Vps52 [231]. Para averiguar si GARP está implicado en el tráfico de ChsB, estudiamos el mutante *vps52Δ*. *vps52Δ* forma colonias pequeñas y a nivel celular tiene un claro defecto morfogénico patente por sus hifas engrosadas, además de presentar vacuolas pequeñas y numerosas (Ignacio Bravo Plaza, sin publicar) (en estos aspectos fenotípicos se asemeja al mutante *rabCΔ* [38]). Como en *rabCΔ* (i.e. *rab6Δ*), la localización de ChsB en *vps52Δ* está alterada: ChsB marca de manera difusa el interior celular y presentaba menor fluorescencia en la membrana apical que la cepa wt (Figura R.52B).

Hipotetizamos que en el mutante *vps52Δ*, debido a una eficiencia de transporte entre los endosomas y el TGN reducida, el tráfico de ChsB se desviaría hacia la ruta de degradación endocítica, aumentando así el transporte de ChsB a las vacuolas. Para examinar dicha posibilidad, explotamos el hecho de que *A. nidulans* crece más rápidamente a 37°C que a 28°C, lo que debe de requerir una mucho mayor eficiencia del reciclaje endocítico para mantener polarizada ChsB en los sitios de crecimiento. Por tanto, incrementamos la temperatura de un cultivo de células *vps52Δ* de 28°C a 37°C, en paralelo a un cultivo silvestre y otro *rabCΔ*. Tanto en el mutante *rabCΔ* como en *vps52Δ*, ChsB perdió su localización en el casquete apical y el Spitzenkörper, y se relocalizó a vacuolas (Figura R.52C), tal como confirmamos, en el caso de *vps52Δ*, mediante tinción con CMAC (Figura R.52C). Estos resultados sugieren que el *tethering* de GARP dependiente de RabC es necesario para el reciclaje eficiente de ChsB.



**Figura R.52. Alteración del tráfico de ChsB causado por la ausencia de GARP o de RabC (RAB6).** A. En el mutante *rabC* $\Delta$  GFP-ChsB presenta una localización deficiente a 28°C y una relocalización a vacuolas cuando la temperatura del cultivo se eleva a 37°C. B. La localización de ChsB en la membrana apical está afectada en *vps52* $\Delta$ . C. Al incrementar la temperatura, se reduce la cantidad de ChsB en la membrana plasmática y se relocaliza en numerosas vacuolas, teñidas con el colorante fluorescente CMAC. Las imágenes son proyecciones de intensidades máximas de varios planos en el eje z y han sido procesadas mediante deconvolución.

#### 4.5.16. En hifas silvestres, la síntesis *de novo* de ChsB no parece contribuir en gran medida a mantener sus niveles estacionarios

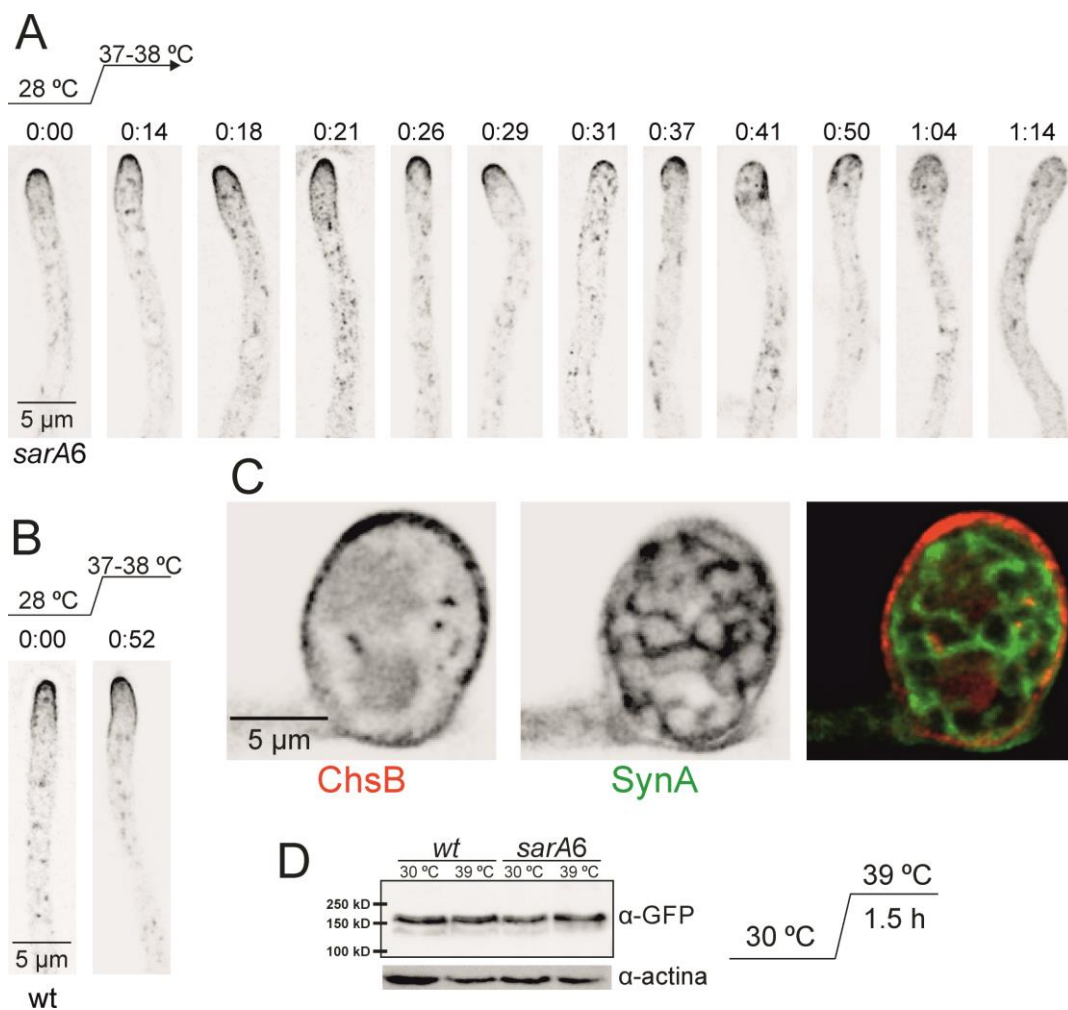
Hipotetizamos que la gran mayoría de ChsB que está presente en el TGN provendría del reciclaje desde la membrana plasmática y no de la ruta biosintética. Para averiguar la posible contribución de la síntesis *de novo* al *pool* de ChsB nos propusimos bloquear la salida de dicha proteína del RE con la mutación termosensible *sarA6*. *sarA6* impide la salida del RE tanto de la endoglucanasa EglC (capítulo VII) como de la enzima inulinasa (capítulo VI). Como se muestra en la Figura R.53A-B, a 28°C *sarA6* no afectó a la localización de ChsB. Al incrementar la temperatura del cultivo para bloquear la salida de proteínas del RE, ChsB siguió detectándose en el casquete apical durante los primeros 30 minutos y no se detectó en el RE. Después de 40-50 minutos del incremento de temperatura en *sarA6*, el aparato Golgi está totalmente desorganizado (Figuras R.7 y R.8). En este tiempo, siguió sin detectarse ChsB en el RE aunque se apreció un efecto leve en la localización de ChsB, que ya no se localizaba nítidamente en el Spk y que, aunque permanecía polarizado en la membrana plasmática, el casquete apical se redujo claramente (Figura R.53A). El marcador del TGN TlgB no marca cisternas en estos tiempos (Figura R.8A) y, sin embargo, ChsB también se localiza en estructuras intracelulares. No hemos determinado la identidad de estas estructuras. A partir de 1 hora a 37-38°C, las hifas comenzaron a lisarse. Incluso en estos tiempos no llegamos a detectar ChsB en el RE (Figura R.53A). Estas observaciones apoyan la idea de que la ChsB detectada en condiciones normales en el TGN no procede de nueva síntesis, sino de reciclaje endocítico.

Si las células *sarA6* se incuban a 37°C durante suficiente tiempo, la región apical de la membrana plasmática crece isotrópicamente hasta formar un globo característico (Figura R.10). En estas condiciones, se puede estudiar el efecto de un bloqueo crónico, aunque probablemente parcial, de la salida de tráfico del RE. De hecho, en estas condiciones SynA, que en condiciones normales colocaliza con ChsB en la membrana plasmática (Figura R.40D), se encuentra exclusivamente en el RE (Figura R.12A). Para estudiar si ChsB se comportaba igual, formamos estos globos apicales en una cepa *sarA6 gfp-chsB*. Sin embargo, en este estadio ChsB no se localizó en el RE; por el contrario, estaba mayoritariamente en la membrana de los globos, incluso después de 5 horas de cambiar la temperatura (Figura R.53C), así como en “parches” en la membrana de las hifas. Esta localización en globos y parches coincide con los engrosamientos de la pared celular descritos en el capítulo I (Figura R.11A). Para confirmar que hay acumulación de proteínas en el RE en las condiciones en que ChsB no se detectó en dicho orgánulo, covisualizamos SynA y ChsB en un mutante *sarA6*. En el estadio de globos SynA se localizaba claramente en el RE y ChsB en la membrana de los globos (Figura R.53C).

Finalmente consideramos otras dos posibilidades. La primera que el aporte biosintético de ChsB fuese normalmente alto, pero que en el mutante *sarA6* la ChsB de nueva síntesis se

## Capítulo V

degrada al inactivar la salida del RE, por ejemplo como resultado de la activación de la ruta de estrés de pared. La segura posibilidad es que se interrumpiera la síntesis de ChsB por motivos similares, de manera que ChsB no se acumule en el RE. Por ello determinamos por *western-blot* los niveles de ChsB en *sarA6* a las temperaturas permisiva y restrictiva. Como muestra la Figura R.53D, *sarA6* no afectó a los niveles de ChsB ni a 30°C ni a 39°C, lo que no concuerda con ninguno de estos dos escenarios. Por ello concluimos que la ausencia de acumulación de ChsB en el RE en el mutante *sarA6* indica que la aportación de la ruta biosintética es baja, y que la proteína que se localiza en el casquete procede de la enzima cautiva en el ciclo de reciclaje endocítico.



**Figura R.53. Efecto de *sarA6* en ChsB.** **A.** Seguimiento temporal del efecto de *sarA6* sobre GFP-ChsB después de una subida de temperatura. **B.** GFP-ChsB en una cepa wt. **C.** mCherry-ChsB y GFP-ChsB en un balloon formado por el efecto después de 2.5 horas de *sarA6* a 37°C. SynA se localiza en las membranas del retículo endoplasmático, mientras que ChsB se encuentra en la superficie celular. **D.** *Western-blot* para detectar los niveles de ChsB a 30°C y 39°C en una cepa wt y en el mutante *sarA6*. Cultivamos durante 16 horas las cepas *gfp-chsB* y *sarA6 gfp-chsB* a 30°C. Después, cambiamos a 39°C durante 1.5 horas un cultivo de cada tipo, a la vez que recogíamos el micelio de cultivos idénticos, como control de 30°C. Todas las imágenes de microscopía de esta figura son proyecciones máximas de planos en el eje z previamente sometidos a deconvolución.

# Capítulo VI

### 4.6. Capítulo VI. Estudio de la ruta de secreción de una enzima soluble: InuA

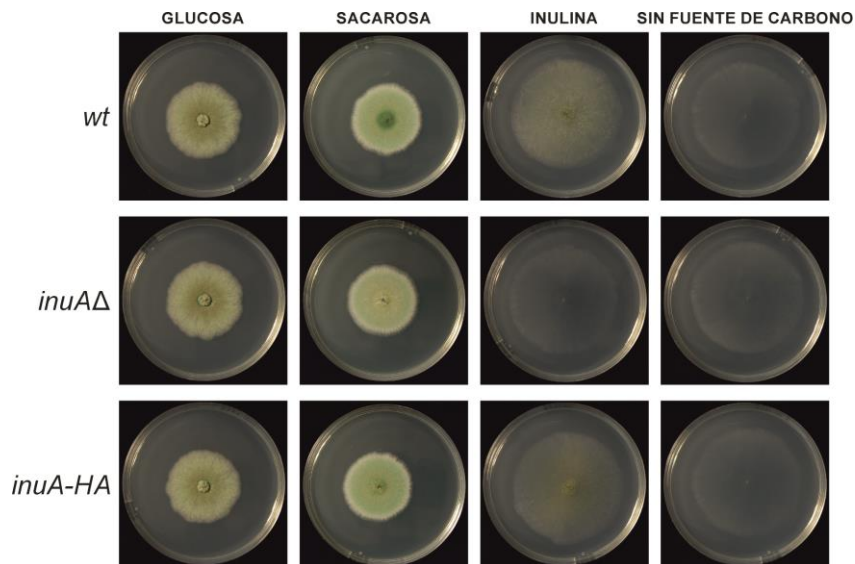
Con la idea de que diferentes proteínas pudiesen seguir rutas de secreción distintas, decidimos estudiar el camino seguido por una proteína soluble. Para ello, elegimos la enzima extracelular codificada por AN11778 [232], la cual se ha descrito previamente como una invertasa, es decir, catalizadora de la conversión de sacarosa en glucosa y fructosa [233]. Esta proteína presenta tres ventajas experimentales: (i) tiene gran homología con la exo-inulinasa InuE de *Aspergillus awamori*, cuya estructura tridimensional está disponible (código *protein data bank*: Q96TU3) [234]; (ii) contiene un péptido señal canónico y se ha determinado experimentalmente el sitio de corte de la proteasa, entre Ala18 y Leu19 [232]; y (iii) está extensamente glicosilada [232]. La idea subyacente de que los diferentes estados de glicosilación podrían servir para determinar en qué nivel de la ruta secretora se encontraría bloqueada esta enzima, en mutantes con bloqueos del tráfico exocítico, dado que en su paso por el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi las proteínas adquieren patrones de glicosilación diferenciados [4, 235]. Denominamos *inuA* al gen AN11778 y, a su vez, InuA a la proteína que codifica, por su gran homología con InuE de *A. awamori*.

#### 4.6.1. InuA es una inulinasa esencial para el crecimiento en inulina

InuA tiene una identidad de secuencia del 54.9% y una similitud del 80.7% con la exo-inulinasa InuE, de *Aspergillus awamori* (Figura R.54) [234]. La conservación es casi total en la región correspondiente al dominio catalítico y ligeramente inferior en el dominio C-terminal [las diferencias principales se encuentran en el péptido señal y en la unión entre los dos dominios (Figura R.54)]. Por otro lado, InuA tiene sólo una identidad del 30.5% y una similitud de 60.3% con Suc2p de *S. cerevisiae* (Figura R.54). Esto sugirió que el sustrato fisiológico de la enzima codificada por AN11778 es el polisacárido inulina. Sin embargo, InuA es activa también sobre sacarosa y, por ello, fue previamente clasificada como una invertasa [232]. Esta paradoja puede ser explicada por el hecho de que las inulinasas también presentan actividad catalítica sobre sacarosa [236]. Para verificar nuestra predicción, delecionamos el gen y probamos el crecimiento de la cepa *inuA* $\Delta$  en diferentes fuentes de carbono. La delección de *inuA* no afectó al crecimiento en glucosa o sacarosa, pero impidió el crecimiento en inulina (Figura R.55), indicando que InuA es una inulinasa que también tiene actividad  $\beta$ -fructofuranosidasa sobre sacarosa.



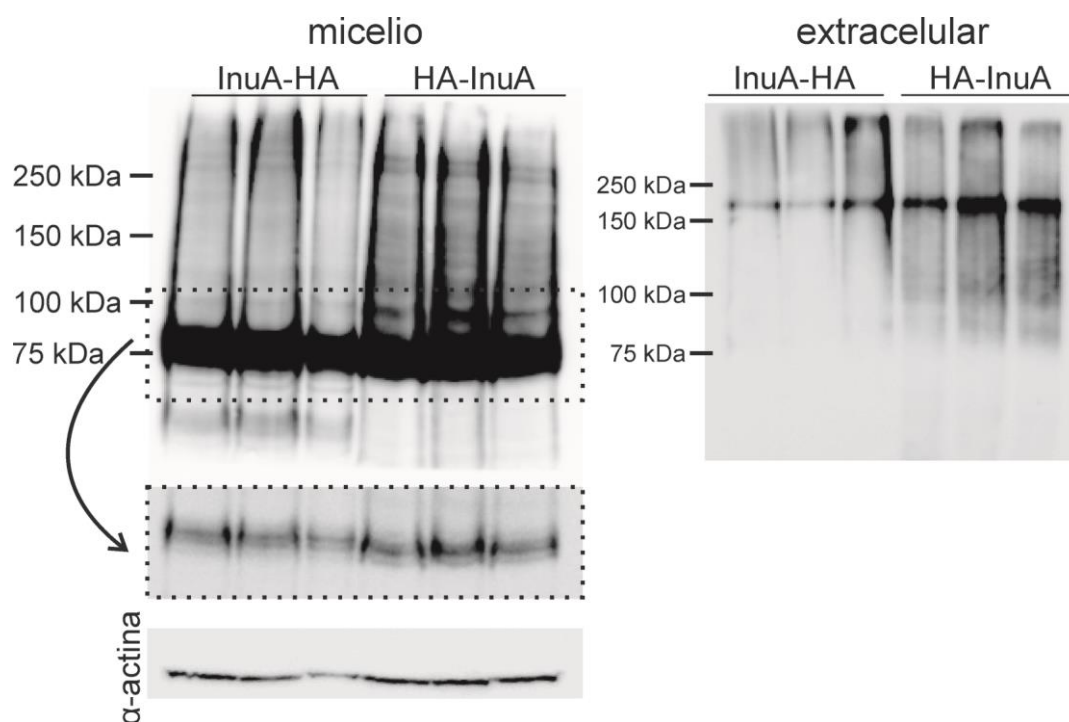
**Figura R.54.** Alineamiento de InuA de *A. nidulans*, InuE de *A. awamori* y Suc2 de *S. cerevisiae*. En rojo, conservación total, en gris los residuos conservados. El rectángulo marca el péptido señal predicho por SignalP 4.1 y la línea punteada el sitio de corte predicho y determinado experimentalmente [232]. La línea verde señala los residuos que forman parte del dominio catalítico de InuE (F20-Q372) y la línea azul indica la región correspondiente al dominio C-terminal de dicha proteína (R382-N537).



**Figura R.55.** Crecimiento en diferentes fuentes de carbono. Test de crecimiento en medio mínimo al que se le ha sustituido el amonio tartrato por amonio sulfato y se ha mantenido la glucosa 1% o se ha sustituido por sacarosa 1%, inulina 1%. En el último caso no se ha añadido fuente de carbono. Como se puede apreciar, después de 7 días a 30°C, el crecimiento de la cepa *inuAΔ* en inulina es idéntico al que ocurre sin fuente de carbono incapaz, mientras que las estirpes *wt* y *inuA-HA* crecen y esporulan.

### 4.6.2. Detección de las formas intracelulares y extracelulares de InuA mediante su etiquetado con HA<sub>3</sub>

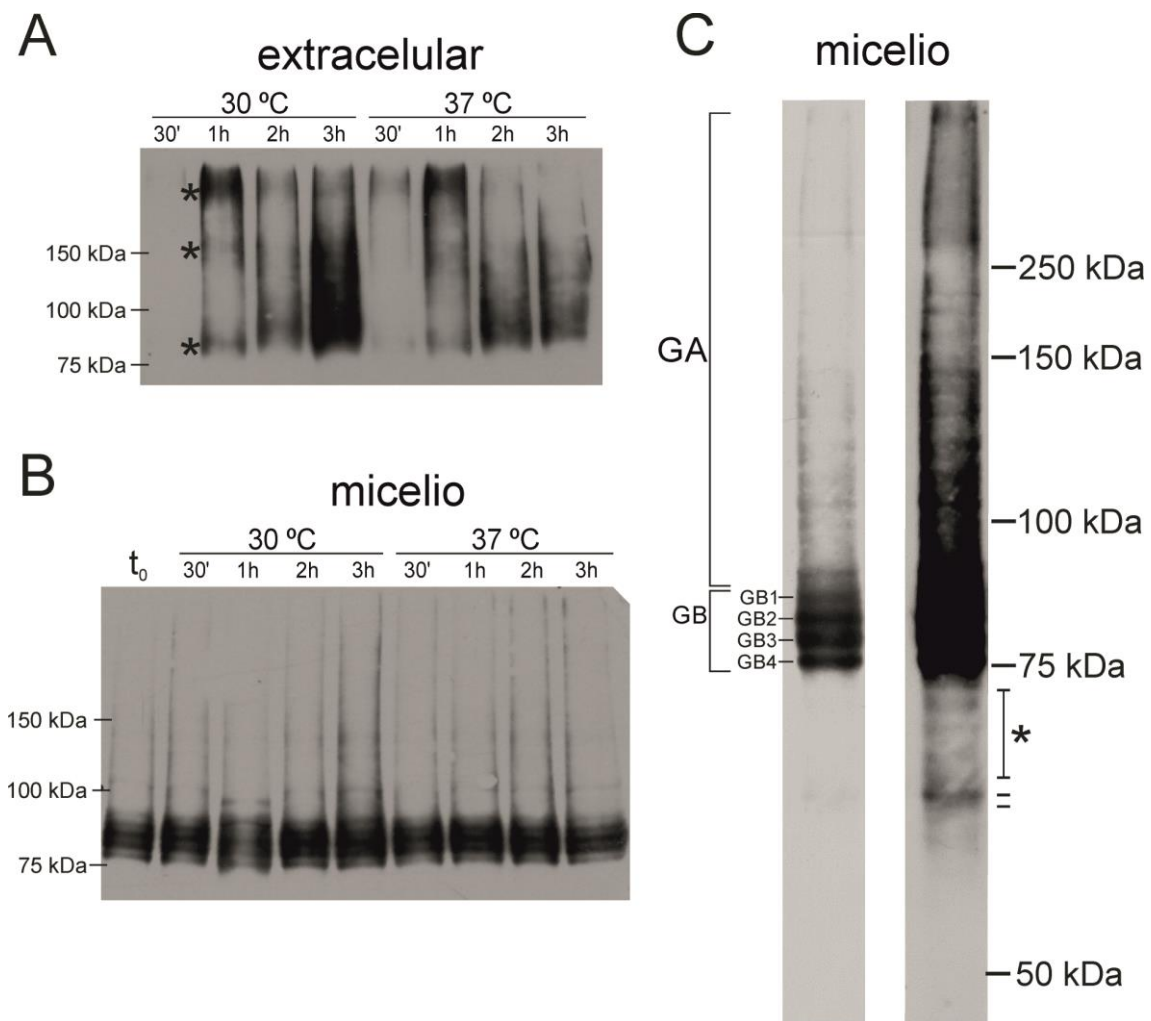
Para monitorizar la ruta exocítica seguida por InuA mediante *western-blot*, diseñamos inicialmente dos quimeras génicas que codifican distintas versiones de InuA etiquetadas con tres copias del epítipo hemaglutinina (HA<sub>3</sub>). Ambas se expresan bajo el control del promotor constitutivo y moderadamente fuerte *gpdA<sup>mini</sup>* y se integraron en copia única en el locus *pyroA* [24], mediante corrección de la mutación *pyroA4*. Una de ellas expresa InuA marcada con HA<sub>3</sub> en C-terminal y, la otra, en N-terminal (corriente abajo del péptido señal). Específicamente en la quimera “N-terminal”, introdujimos HA<sub>3</sub> después de los 25 primeros aminoácidos, basándonos en las predicciones de péptido señal hechas por SignalP 4.1 y en la determinación de la secuencia N-terminal de la proteína madura [232]. Mediante *western-blot* con un anticuerpo anti-HA, comprobamos que ambas proteínas de fusión presentan un patrón electroforético similar (Figura R.56). Esto se cumplió tanto en el caso de un extracto proteico de micelio como en el caso del medio de cultivo (Figura R.56). Una vez comprobado que ambas quimeras se comportaban de manera similar, elegimos la etiquetada en C-terminal para los experimentos posteriores.



**Figura R.56. Patrón electroforético de InuA-HA y HA-InuA.** No existen diferencias apreciables en el patrón electroforético correspondiente al micelio ni en el del medio extracelular.

Primeramente, monitorizamos por *western-blot* la secreción de InuA-HA al medio de cultivo. Para ello, precultivamos las células durante 16 horas, recogimos el micelio y lo utilizamos para inocular matraces con medio fresco. Incubamos estos matraces durante 1-3 horas adicionales tanto a 30°C como a 37°C. Después de separar el micelio y el medio por filtración, precipitamos las proteínas del medio extracelular con ácido tricloroacético y las analizamos mediante PAGE-SDS y *western-blot* (Figura R.57). Detectamos InuA-HA secretada *de novo* después de 30 minutos y, con mucha mayor intensidad, después de 1 hora (Figura R.57A). La inulinasa secretada migra como una mancha poco definida (*smear*) en un rango que va de 80 kDa a más de 250 kDa. Destacando en el *smear* se podían apreciar tres bandas muy heterogéneas, con movilidades correspondientes a ~80-85 kDa, ~150 kDa y, una tercera, con una movilidad muy inferior a 150 kDa (asteriscos en la Figura R.57A). En otras palabras, la mayoría de InuA-HA secretada presenta una movilidad muy baja, lo que indica que la inulinasa extracelular está altamente glicosilada (el peso molecular de la enzima sin glicosilar es de ~65 kDa). También detectamos un cambio en la movilidad de InuA-HA extracelular a lo largo del tiempo, posiblemente por cambios en su contenido en glicanos, dependientes de la “edad” del cultivo (Figura R.57A). Dicha variación temporal había sido detectada previamente [232].

En segundo lugar, analizamos la inulinasa asociada a las células, es decir, dentro de los límites de la pared celular, mediante extractos proteicos de micelio. Para obtener los extractos proteicos, realizamos una lisis alcalina del micelio liofilizado, seguida de una precipitación con ácido tricloroacético. Después neutralizamos el precipitado y lo resuspendimos en tampón Laemli. De este modo, pudimos analizar InuA del micelio a partir de extractos de proteína total donde se minimizaba la posible degradación de proteínas resultantes de la manipulación de los extractos *in vitro*. Por *western-blot* detectamos una banda prominente con una movilidad de ~80 kDa (Figura R.57B). Mediante el uso de geles más largos pudimos resolverlo en cuatro bandas diferentes (Figura R.57C), a las que denominamos GB1-GB4 (de glicosilación basal). Además de las formas GB, en el *western-blot* detectamos un *smear* de bandas, que denominamos GA (de glicosilación abundante). Estas formas GA parecen coincidir en movilidad con la inulinasa secretada. Gracias a exposiciones largas de los *western-blots*, también detectamos bandas con mayor movilidad que las bandas GB (Figura R.57C). La bandas de este tipo predominantes corresponden a un doblete, con una movilidad consistente con InuA-HA carente péptido señal y sin otras modificaciones postraduccionales (~65 kDa), atribuible al producto primario de traducción una vez importado al RE previamente a su glicosilación. En el doblete una de las bandas es minoritaria y podría corresponder a InuA en la que la proteasa señal hubiera cortado el péptido señal en un enlace distinto del preferente.

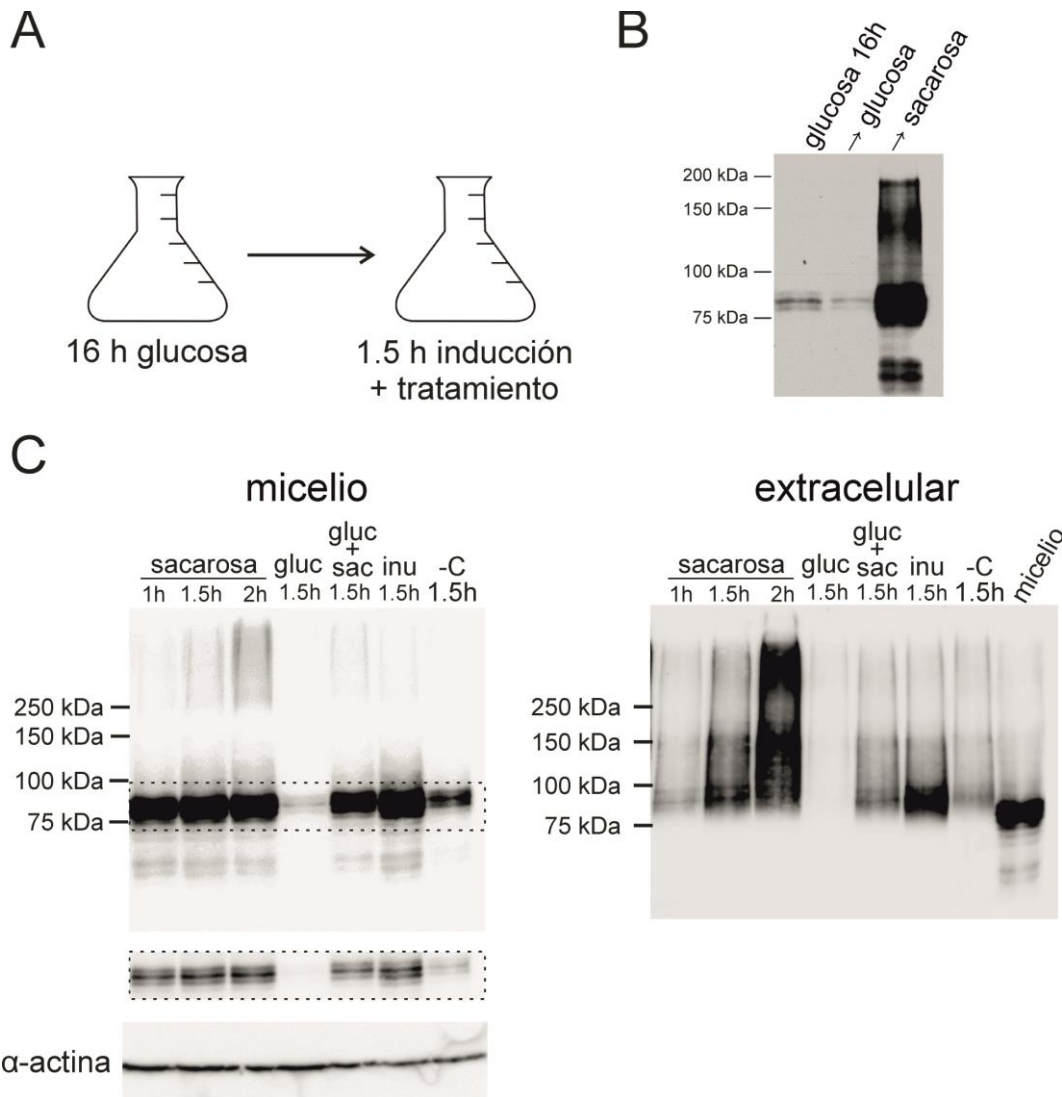


**Figura R.57. Caracterización del patrón electroforético de InuA-HA.** **A.** InuA-HA secretada al medio extracelular en un tiempo de 30 min hasta 3 horas. Los asteriscos indican bandas mayoritarias. **B.** InuA-HA expresada bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*, se trata de un extracto proteico de micelio mediante lisis alcalina (ver Materiales y Métodos). Corresponde al mismo experimento que en A. **C.** Patrón electroforético de InuA-HA procedente de micelio. Se trata de dos exposiciones diferentes de una misma película. Se aprecian las cuatro bandas correspondientes a GB; InuA-HA con todo el rango de movilidades que corresponde a GA; así como InuA con mayor movilidad que GB, donde predomina una banda que corresponde a la movilidad de InuA-HA sin glicosilar. Los asteriscos indican las bandas intermedias entre GB y el doblete de mayor movilidad.

#### 4.6.3. Regulación de la expresión de InuA mediante el uso de sacarosa

Previamente se había determinado que la expresión de InuA se puede inducir con sacarosa [237]; por tanto, nos propusimos aprovechar esta regulación natural de su expresión. Esto sería ventajoso en nuestros experimentos, dado que podríamos inducir la expresión de la inulinasa después de interrumpir condicionalmente un paso específico de la ruta secretora (Figura R.58A). De este modo, toda la inulinasa presente en la célula habría sufrido dicho bloqueo, sin existir proteína InuA sintetizada, glicosilada y transportada previamente que pudiese enmascarar el análisis. Por lo tanto, realizamos un reemplazamiento el gen *inuA* original por una versión que expresa la proteína marcada con HA<sub>3</sub> en C-terminal, manteniendo la región

promotora natural del gen. Probamos que esta versión InuA-HA era funcional, tras confirmar que la cepa obtenida es capaz de utilizar inulina como fuente de carbono (Figura R.55). Además, confirmamos que, efectivamente, la expresión de InuA-HA se puede controlar con la fuente de carbono: si las células transformantes se cultivan en medio con sacarosa la expresión es notablemente mayor que si se cultivan con glucosa. De hecho, la expresión se induce drásticamente en menos de 1.5 horas, tras cambiar el medio de cultivo con glucosa por uno con sacarosa (Figura R.58B).



**Figura R.58. Pruebas de inducción de InuA con diferentes fuentes de carbono.** **A.** Esquema general de los experimentos de inducción, combinados con mutaciones o drogas, llevados a cabo, en este trabajo, con InuA-HA expresado bajo su propio promotor. “Tratamiento” significa adición de una droga o incremento de temperatura en el caso de estudiar un mutante termosensible. **B.** *western-blot* que muestra los niveles de InuA de un cultivo de 16 horas con glucosa 1% como fuente de carbono. En el segundo y tercer carril se muestran los niveles de InuA tras un cambio del cultivo anterior a un medio con glucosa 1% o sacarosa 1% durante 1.5 horas. La sacarosa induce notablemente la expresión de InuA. **C.** Niveles de InuA en cultivos con diferentes tiempos de inducción con sacarosa 1% (carriles 1-3), con glucosa 1% (glu), con glucosa 1% y sacarosa 1% (gluc+sac), con inulina 1% o sin fuente de carbono.

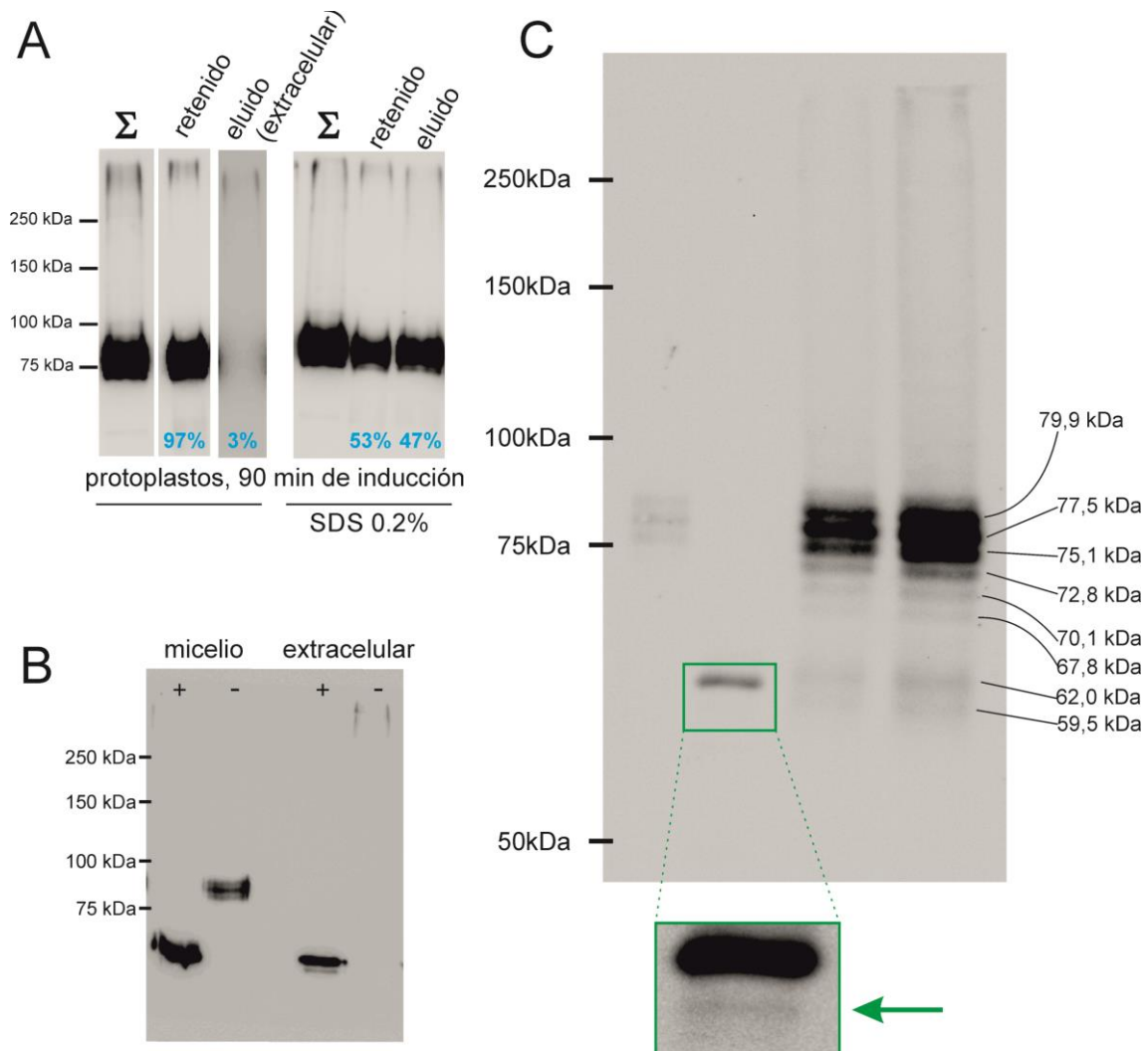
A continuación, comprobamos la expresión de InuA en cultivos con diferentes fuentes de carbono. Como se muestra en la Figura R.58C, la glucosa es parcialmente represora en presencia de sacarosa; la inulina, a pesar de ser parcialmente insoluble, es casi tan buen inductor como la sacarosa (en mismas concentraciones p/v); y la ausencia de fuente de carbono no promueve la expresión de InuA (Figura R.58C). De este modo, dispusimos de un sistema donde poder expresar de manera regulada la proteína de fusión InuA-HA<sub>3</sub>.

### **4.6.4. Las especies moleculares GB y GA son intracelulares**

Nos preguntamos si la inulinasa de los extractos de micelio provenía de InuA secretada y retenida en el periplasma o si, por el contrario, correspondía a la enzima intracelular “capturada” en los compartimentos secretores, en tránsito a su destino final. Para responder a esta pregunta, indujimos la síntesis de InuA-HA en protoplastos purificados, estabilizados osmóticamente con 1 M sorbitol. Los protoplastos no tienen pared celular [238] y, por tanto, carecen proteínas solubles periplásmicas. Al igual que en el caso del micelio, en los protoplastos detectamos una fuerte inducción de la síntesis de InuA después de 1.5 horas (Figura R.59A). Esta inulinasa intracelular presenta tanto formas GB como formas de menor movilidad, que coinciden en movilidad con parte de las especies GA (Figura R.59A). Este resultado indica que las formas detectadas en el micelio son, al menos en parte, intracelulares. De hecho, una proporción significativa (47%) de InuA se libera de los protoplastos al tratarlos con SDS (Figura R.59A). En conclusión, estos resultados sugieren que los extractos de proteína total de micelio representan fielmente la proteína intracelular.

### **4.6.5. La diversidad de especies moleculares de InuA se produce por N-glicosilación**

Utilizamos la enzima PNGasa F para eliminar totalmente los N-glicanos de InuA [239]. La PNGasa F es una amidasa que rompe el enlace que une la asparagina con la primera N-acetil glucosamina (GlcNAc) del glicano [239]. Observamos un cambio de movilidad tanto en la enzima secretada como en las especies intracelulares GB y GA. Todas ellas se convirtieron en dos bandas con una movilidad similar (~65 kDa, Figura R.59B-C), las cuales coinciden con el “doblete” de alta movilidad detectado en el micelio que, como se ha discutido antes, correspondería al producto de importación al RE (esto es, el producto primario de traducción al que se le ha eliminado el péptido señal). Estos resultados demuestran que la heterogeneidad de especies moleculares de InuA y su característico patrón electroforético son debidos a N-glicosilaciones.



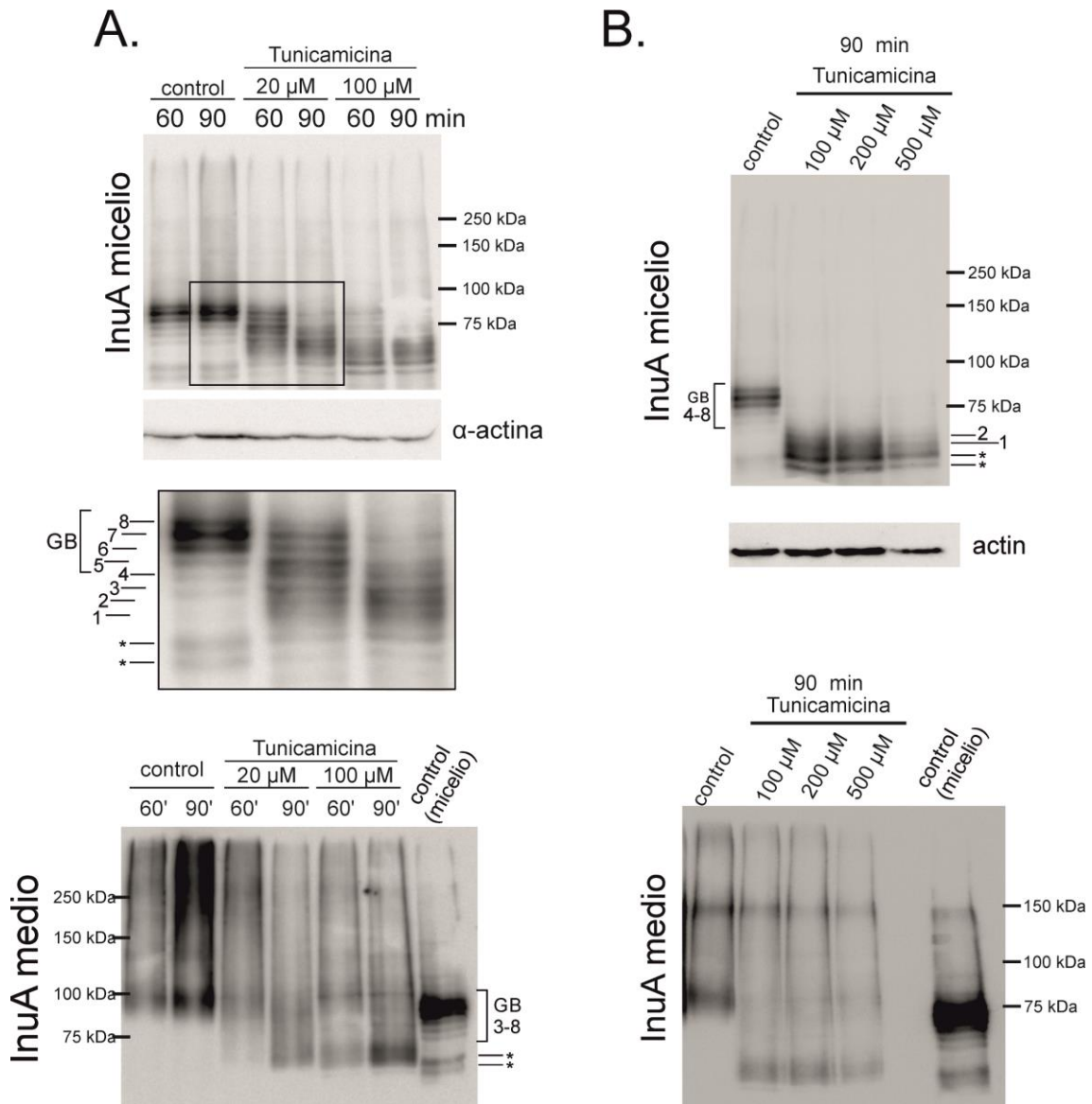
**Figura R.59. Análisis de InuA en protoplastos y desglicosilación enzimática.** **A.** La inducción de la expresión de InuA-HA en protoplastos produce especies moleculares, tanto intracelulares como extracelulares, que son indistinguibles a las que producen las hifas intactas. Cuando se tratan los protoplastos con SDS 0.2 %, gran parte de la inulinasa se libera, probablemente por desaparición de las membranas intracelulares. La cuantificación de los carriles indicados la realizamos con el programa Image Lab. **B.** El tratamiento de InuA, tanto miceliar como extracelular, con PNGasa F produce la conversión de todas las formas moleculares a dos bandas con movilidad compatible con InuA-HA sin modificaciones postraduccionales. **C.** Gel largo que confirma que las dos bandas obtenidas tras la desglicosilación enzimática coinciden con las dos bandas más “rápidas” de InuA del micelio. Los tamaños moleculares indicados son estimaciones basadas en una recta patrón construida a partir de dicho *western-blot*, a partir de los tamaños correspondientes a las bandas del marcador de masa molecular. El recuadro corresponde a una ampliación 2 x de una imagen más expuesta de la región señalada.

### 4.6.6. Análisis de la glicosilación basal en el retículo endoplasmático

InuA contiene 8 motivos Asn-X-Ser/Thr y, por tanto, posee 8 asparaginas que son aceptoras potenciales de N-glicosilación. En el RE de *S. cerevisiae*, la enzima oligosacárido transferasa (OST) cataliza la transferencia en bloque de una cadena oligosacáridica a las asparaginas correspondientes de los polipéptidos nacientes [1]. Esta cadena está compuesta por [N-acetil glucosamina(GlcNAc)]<sub>2</sub>-(manosa)<sub>9</sub>-(glucosa)<sub>3</sub> [1]. Antes de llegar al Golgi, dicha cadena pierde las tres glucosas y una manosa. De este modo, cada cadena añade ~1.7 kDa al peso molecular de la proteína. De hecho, la diferencia en movilidad entre cada banda de las formas GB coincide, *grosso modo*, con ~1.7 kDa, lo que es compatible con que dichas especies se diferencien en el número de asparaginas N-glicosiladas (ver estimación de las masas moleculares en la Figura R.59C). Además, la inulinasa del micelio presenta especies moleculares adicionales, muy débiles, entre la enzima sin glicosilar y las formas GB. Estas bandas están espaciadas entre ellas con aproximadamente el mismo intervalo de movilidad que las bandas GB (Figura R.57C) y podrían corresponder a InuA con menos bloques de oligosacáridos. En resumen, nos planteamos la hipótesis de que la escalera de bandas existente entre la enzima sin glicosilar y la banda con menor movilidad de GB correspondiese a los distintos niveles de glicosilación parcial de las asparaginas Asn-X-Ser/Thr de InuA. Para probar esta hipótesis inhibimos la N-glicosilación en el RE con tunicamicina. Esta droga impide el primer paso en la biosíntesis de dolicol-P-P-(GlcNAc)<sub>2</sub>-(manosa)<sub>9</sub>-(glucosa)<sub>3</sub>, que sirve como sustrato de la OST. Específicamente, la tunicamicina es un nucleósido que inhibe la transferencia de GlcNAc-1-fosfato desde UDP-GlcNAc al dolicol-fosfato.

Añadimos tunicamicina (20 µM y 100 µM) al medio en el momento de la inducción con sacarosa e incubamos a 30°C durante el tiempo indicado (Figura R.60A). La droga provocó un desplazamiento de la escalera GB hacia movilidades mayores, efecto que aumentó con la concentración de tunicamicina (Figura R.60A). Esto permitió la detección de dos bandas adicionales (bandas 2 y 1; Figura R.60A), que no eran detectables sin el uso de la droga. La utilización de 20 µM de tunicamicina produjo un menor efecto a los 60 min que a los 90 min, mientras que el patrón no cambió con el tiempo cuando usamos una concentración de 100 µM. La utilización de estas altas concentraciones de tunicamicina no impidió la secreción de InuA; sin embargo, el patrón electroforético de las formas secretadas de InuA se extendió, abarcando también movilidades mayores, es decir especies de InuA hipoglicosiladas (Figura R.60A). Estos resultados indican que la tunicamicina reduce la capacidad de N-glicosilación y, por tanto, disminuye las especies de InuA con 5 a 8 antenas de N-glicanos e incrementa la presencia relativa de bandas con 1-5 antenas (20 µM) o 1-3 antenas (100 µM) (Figura R.60A).

Con el fin de inhibir en mayor medida la N-glicosilación, utilizamos concentraciones incluso mayores de tunicamicina. Esto provocó un desplazamiento más acusado de las formas GB, hasta tal punto de que predominaban las especies moleculares con una movilidad similar a la inulinasa digerida con PNGasa F (Figura R.60B), lo que sugiere que estas bandas representan la inulinasa sin glicosilar. Con 500  $\mu$ M tunicamicina, la cantidad total de InuA era visiblemente menor, posiblemente debido a la degradación de la proteína sin glicosilar (Figura R.60B). Nótese que ni siquiera la mayor concentración de tunicamicina utilizada impidió la exocitosis de InuA.



**Figura R.60. Inhibición de la N-glicosilación con Tunicamicina.** **A.** Efecto sobre InuA-HA, después de 60 y 90 minutos, del tratamiento con 20  $\mu$ M y 100  $\mu$ M tunicamicina. Nótese el aumento proporcional de bandas con mayor movilidad. La secreción no está afectada por la inhibición de la glicosilación. Los asteriscos en la inmunodetección inferior señalan las dos bandas sin glicosilación. **B.** Efecto con mayores concentraciones de tunicamicina: 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 500  $\mu$ M.

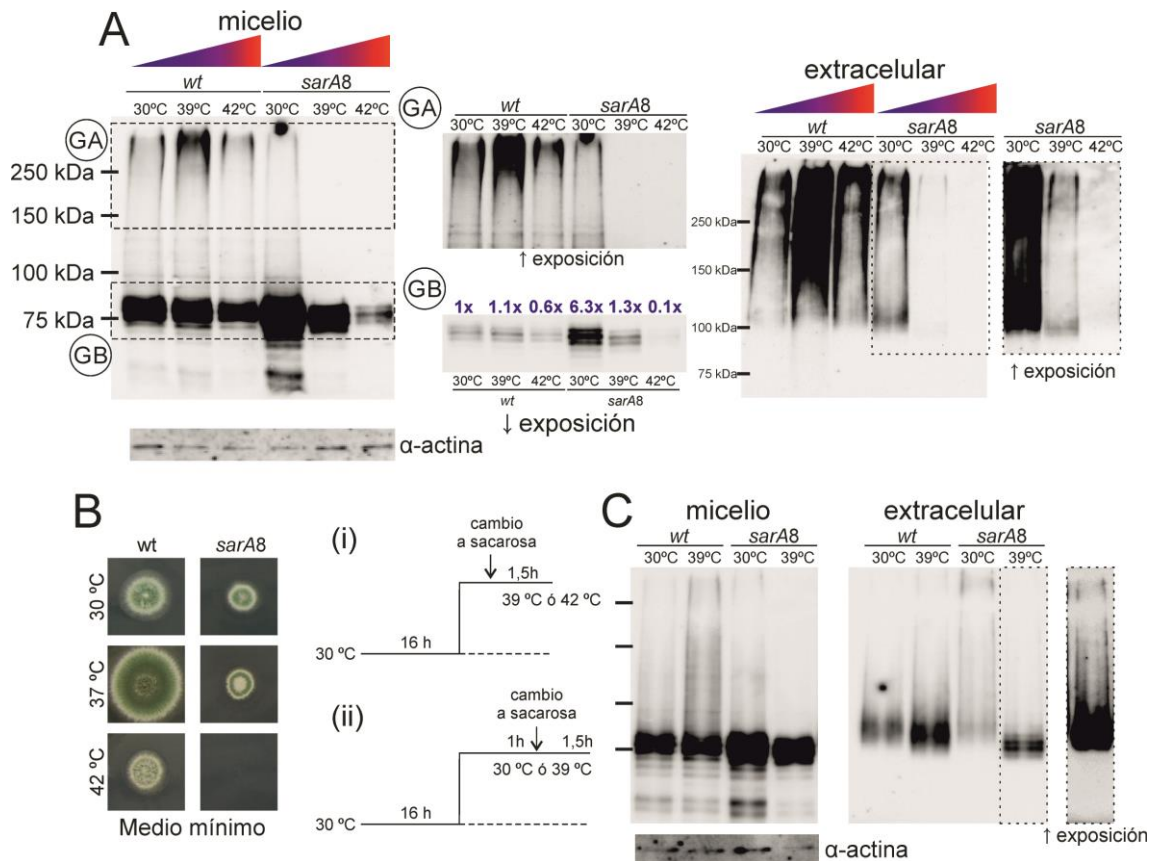
Estas observaciones sugieren que las especies GB corresponden a la N-glicosilación “en bloques” que sucede en el RE. Sin embargo, cuando se reduce la eficiencia de este proceso la secreción de InuA no se detiene y, de hecho, se detectan nuevas especies de la enzima en el espacio extracelular, que deben de corresponder a InuA hipoglicosilada en el RE y modificada en el aparato de Golgi. Por tanto, la N-glicosilación en el RE no parece ser una condición sine qua non para el avance de InuA en la ruta secretora.

### **4.6.7. El bloqueo de la salida del retículo con *sarA8* impide la secreción de InuA y la formación de las especies GA**

Las observaciones y conclusiones del apartado anterior se podrían explorar mediante bloqueos en el transporte de InuA desde el RE al aparato de Golgi. Con este propósito utilizamos un mutante termosensible de la GTPasa encargada de dicho proceso, SarA (Sar1) (capítulo I). Elegimos el alelo mutante *sarA8*, dado que crece bien a 30°C y 37°C pero no es viable a 42°C. De este modo, al combinar la inducción con sacarosa y el incremento de la temperatura de cultivo conseguiríamos un bloqueo condicional y agudo del transporte de InuA. Por tanto, tras obtener la cepa *sarA8 inuA-HA* correspondiente, la precultivamos durante 16 horas a 30°C en matraces con medio mínimo con glucosa, en paralelo con un control *sarA+*. Posteriormente, transferimos el micelio a medio mínimo con sacarosa e incubamos los cultivos a 30°C, 39°C o 42°C durante 1.5 horas. La secreción de InuA al medio externo a 30°C fue similar a la cepa silvestre (Figura R.61A). Por el contrario, la secreción de InuA a 39°C estaba casi totalmente anulada, mientras que a 42°C fue indetectable (Figura R.61A). A dichas temperaturas, la cepa wt secretó InuA en cantidades similares a las secretadas a 30°C (Figura R.61A). Esto demuestra que la secreción de InuA se bloquea mediante la inactivación condicional de SarA.

En relación a la inulinasa del micelio, el mutante *sarA8* acumuló a 30° C las formas GB (~6 veces más que en el wt), mientras que a 37°C los niveles de GB fueron similares al wt. Estas especies GB mostraron una fuerte reducción a 42°C (Figura R.61A). La gran reducción en los niveles de GB a 42°C es atribuible a un incremento en la degradación de proteínas asociada a estrés del retículo (ERAD, *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) o a una reducción de la síntesis de InuA. El incremento, detectado a 30°C, de las formas GB indica que incluso a la temperatura permisiva *sarA8* afecta a la interfaz RE-Golgi, hecho que ya habíamos demostrado en el capítulo I, al determinar que causa la deslocalización parcial de SedV. Además, el mutante *sarA8* presenta niveles ligeramente reducidos de las especies GA a 30°C, los cuales llegan a ser indetectables a 39°C y 42°C (Figura R.61A). Dicha ausencia de especies GA correlaciona con el bloqueo en la secreción de inulinasa. Estos resultados muestran que la producción de GA requiere un transporte eficiente del RE al aparato de Golgi y que GB no se

produce o se degrada cuando la salida del RE está muy comprometida. Sin embargo, si la eficiencia de dicha salida se reduce sólo parcialmente, las especies GB se acumulan mientras que GA se reduce. Téngase en cuenta que la afectación parcial de la función de SarA desorganiza drásticamente el aparato de Golgi (capítulo I), pudiendo impedir la glicosilación en dicho orgánulo. En conjunto, estos resultados demuestran que SarA se requiere para la secreción de InuA y para la formación de las especies GA.



**Figura R.61. Efecto de *sarA8* en InuA.** **A.** En este experimento el cambio de temperatura se ha realizado simultáneamente con la inducción por cambio a medio con sacarosa. Los niveles de InuA GB están aumentados a 30°C y 39°C en *sarA8*; sin embargo, no existe InuA GA a 39°C ni a 42°C, lo que correlaciona con el bloqueo en la secreción de InuA. La cuantificación de las especies moleculares GB la realizamos con el programa *Image Lab*. **B.** Test de crecimiento que muestra la termosensibilidad *sarA8*. **B.** Representación esquemática de los experimentos de A (i) y C (ii). **C.** En este segundo experimento, la inducción de InuA se ha realizado en un cultivo precalentado durante 1 hora. Esto ha provocado que, a 39°C, se permita la secreción de InuA, correspondiente a la glicosilación basal (GB). A la derecha se muestra una mayor exposición que demuestra que la inulinasa del medio de cultivo no proviene de lisis celular, ya que no están presentes las especies con mayor movilidad que GB. Las bandas del patrón de peso molecular se indican con una línea, corresponden a los mismos pesos moleculares que en A.

Por último, si se sigue el protocolo estándar en el que la temperatura se cambia en el momento de la inducción, *sarA8* no secreta InuA a 39°C (Figura R.61A); sin embargo, si

## Capítulo VI

---

inducimos la expresión de InuA una hora después del cambio de temperatura (ver esquema en Figura R.61B), *sarA8* secreta cantidades muy reducidas de inulinasa que, además, corresponde a las especies GB (Figura R.61C). En estas condiciones, *sarA8* podría permitir una salida lenta del RE de InuA y, debido a la desorganización parcial del aparato de Golgi, la inulinasa no podría adquirir las glicosilaciones que la transformarían en GA, aunque sí secretarse. La ausencia en el medio extracelular de las especies sin glicosilar y de transición entre éstas y GB, las cuales sí están presentes en el micelio, indica que la inulinasa GB que detectamos en el medio de cultivo no puede proceder de lisis celular (ver Figura R.61C).

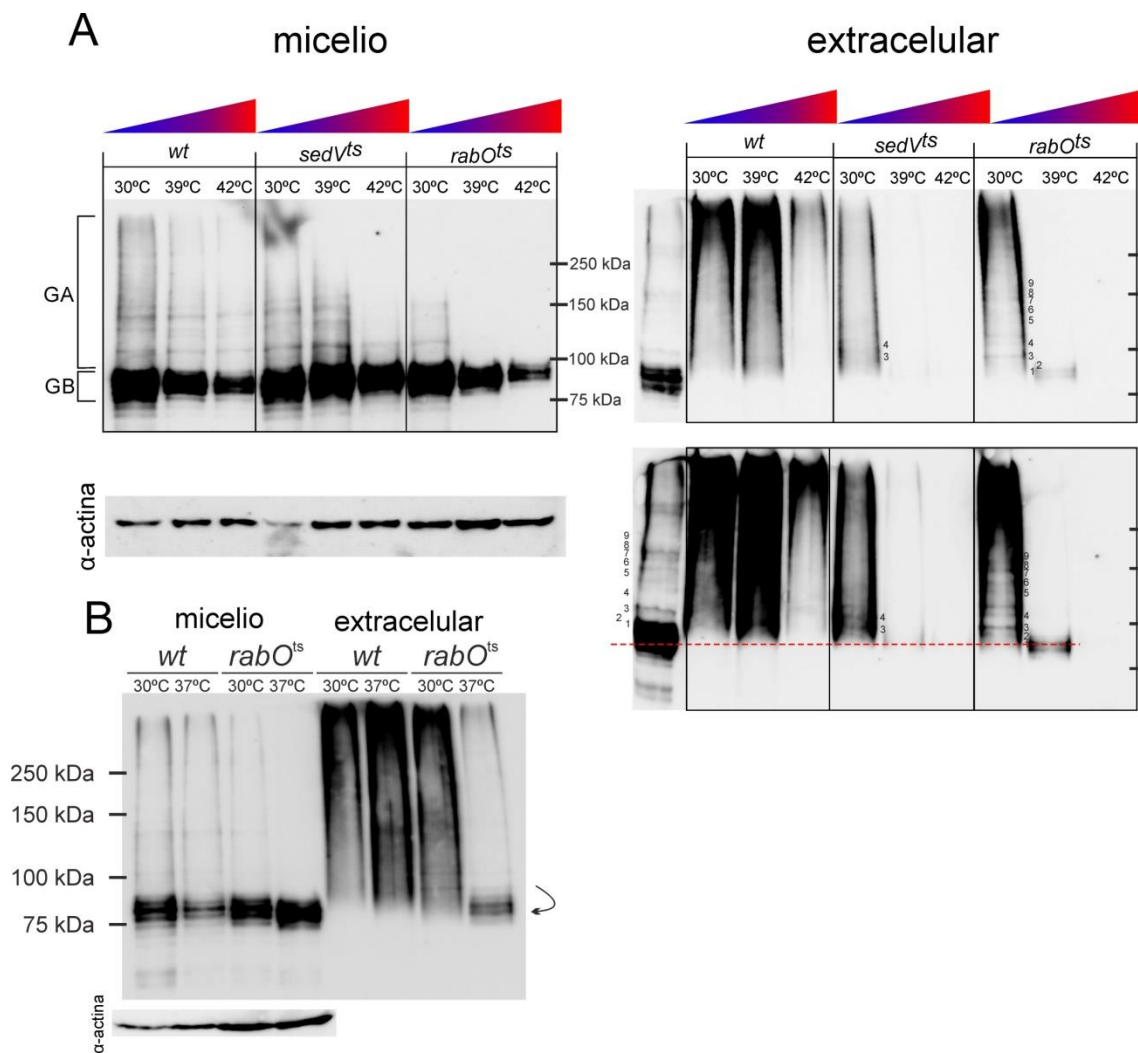
En conclusión, este y otros resultados apuntan a una relación precursor-productor entre las formas GB y GA, que se formarían en el RE y en el aparato de Golgi, respectivamente.

### **4.6.8. La alteración de la interfaz retículo-Golgi por inactivación de RabO o SedV bloquea la secreción de InuA y la síntesis de las especies GA**

La GTPasa RabO y la t-SNARE SedV se localizan en el Golgi temprano y se requieren para la organización del aparato de Golgi [18]. La inactivación de estas proteínas con los mutantes termosensibles *rabO<sup>ts</sup>* y *sedV<sup>ts</sup>* desorganiza el Golgi [18]. La deslocalización del marcador del Golgi temprano RerA [18] que ocurre en estas condiciones sugiere que dichas mutaciones previenen la biogénesis de las cisternas del Golgi a partir del tráfico proveniente del RE.

Estudiamos el efecto de *rabO<sup>ts</sup>* y *sedV<sup>ts</sup>* en la secreción de InuA. Como se muestra en la Figura R.62A, a 39°C y 42°C ambas mutaciones bloquean prácticamente la secreción, de acuerdo con su efecto en el Golgi. En cuanto a la enzima intracelular, *sedV<sup>ts</sup>* eliminó las especies GA a 42°C, mientras que *rabO<sup>ts</sup>* las redujo a 30°C y eliminó a 39°C y 42°C (Figura R.62A). Además, *rabO<sup>ts</sup>* secretó cantidades mínimas de las especies GB a 39°C. Estas cantidades menores se convirtieron en claramente detectables al utilizar una temperatura de 37°C (Figura R.62B). Incluso a 30°C, el mutante *rabO<sup>ts</sup>* presenta defectos en la glicosilación de la inulinasa secretada, puesto que presenta bandas definidas que no están presentes en la cepa wt (Figura R.62A).

Estos resultados refuerzan las observaciones realizadas con *sarA8* e indican que la formación de las cisternas del Golgi temprano por tráfico del RE es necesaria para la conversión de InuA GB en GA, así como para su secreción. Sin embargo, dejan abierta la incógnita de si se requieren estadios posteriores del aparato de Golgi para la glicosilación o secreción de InuA.



**Figura R.62. Efecto de *sedVts* y *rabOts* en InuA-HA.** A. Análisis de InuA en *sedVts* y *rabOts* a 30°C; 39°C y 42°C, en el que se aprecia una reducción de las formas GA en el micelio, lo que correlaciona con una reducción drástica en la secreción de InuA. En las imágenes de la derecha el patrón de pesos moleculares está únicamente señalado con líneas horizontales; los pesos moleculares son los mismos que en la imagen de la izquierda. B. InuA en *rabOts* a 30°C y 37°C. A 37°C el mutante secreta InuA con la glicosilación basal, lo que sugiere un defecto en la glicosilación en el aparato de Golgi.

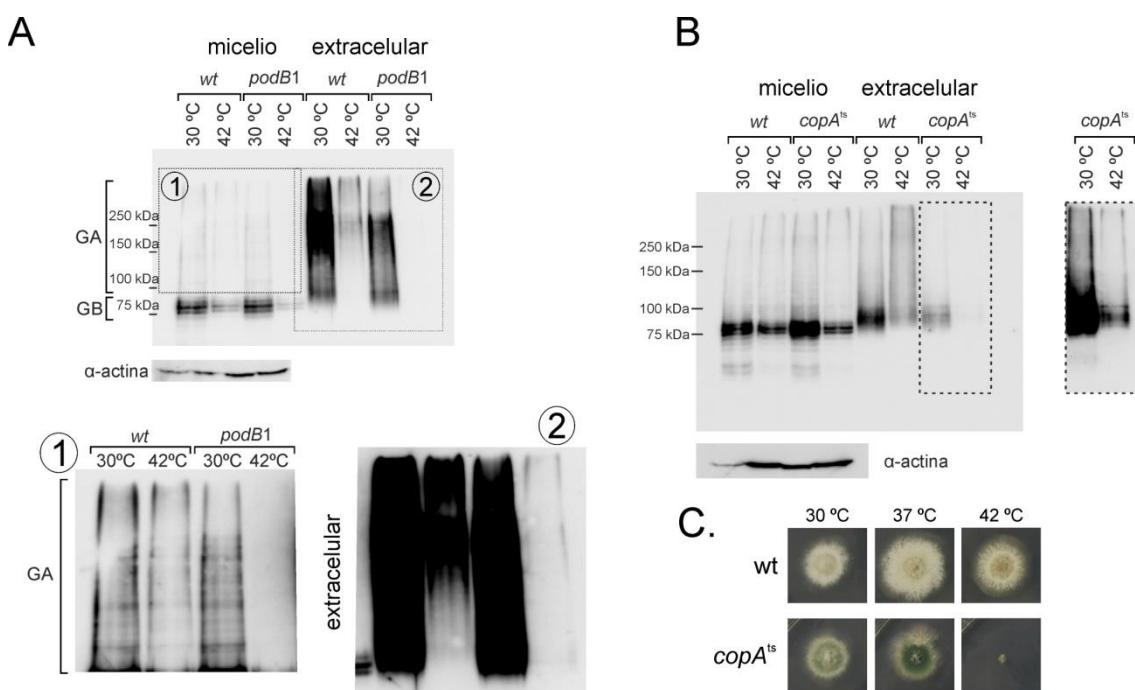
#### 4.6.9. Implicación del aparato de Golgi temprano en la glicosilación de InuA

Para afectar al aparato de Golgi sin perturbar la interfaz RE-Golgi utilizamos dos bloqueos genéticos diferentes. Uno de ellos implica el uso de una mutación en el complejo COG (*conserved oligomeric Golgi*). COG es un complejo de anclaje o *tethering* esencial para la estructura y la función del Golgi. Su función es crucial para mantener la glicosilación normal en el Golgi, dado que media el tráfico retrógrado entre sus cisternas y mantiene, de este modo, el orden secuencial necesario de las enzimas de glicosilación [240-242]. Utilizamos un mutante *podB1* termosensible del gen de *A. nidulans* que codifica la subunidad COG2 [171]. A 30°C, *podB1* se comportó como una cepa wt respecto a la glicosilación de InuA y a su secreción al

## Capítulo VI

medio externo (Figura R.63A). Sin embargo, a 42°C *podB1* fue incapaz de producir especies GA detectables, aunque produjo niveles normales de GB. A esta temperatura tampoco secretó inulina, mientras que el control wt sí lo hizo (Figura R.63A). Por lo tanto, *podB* es necesario para la transformación de GB en GA mediante glicosilación y para la secreción de InuA. Estos resultados refuerzan la conclusión de que GB es precursor de las especies GA, que se producen en el aparato de Golgi. Además, también implican a la compartimentación del aparato de Golgi *per se* en la glicosilación y la secreción de InuA, dado que la conexión RE-Golgi en *podB1* no debe de estar afectada.

Una segunda manera de alterar la homeostasis del Golgi es mediante mutaciones termosensibles que condicionen la función del complejo de cubierta COPI. *copA* codifica, en *A. nidulans*, la subunidad  $\alpha$  del complejo COPI (ver capítulo IV). *sod(VI)C1* (a partir de ahora *copA<sup>ts</sup>*) es una mutación termosensible de *copA*, que impide el crecimiento a 42°C [210]. Como muestra la Figura R.63B, *copA<sup>ts</sup>* reduce la secreción de InuA a 30°C, mientras que a 42°C la secreción es aún menor, lo que correlaciona con su crecimiento termosensible (Figura R.63C). Sin embargo, no impide totalmente la formación de las especies moleculares GA. Esto podría ser debido a que el mutante *copA<sup>ts</sup>* fuese un hipomorfo que mantuviese una estructura suficientemente organizada del aparato de Golgi como para glicosilar y secretar InuA durante el tiempo de 1.5 horas a 42°C.

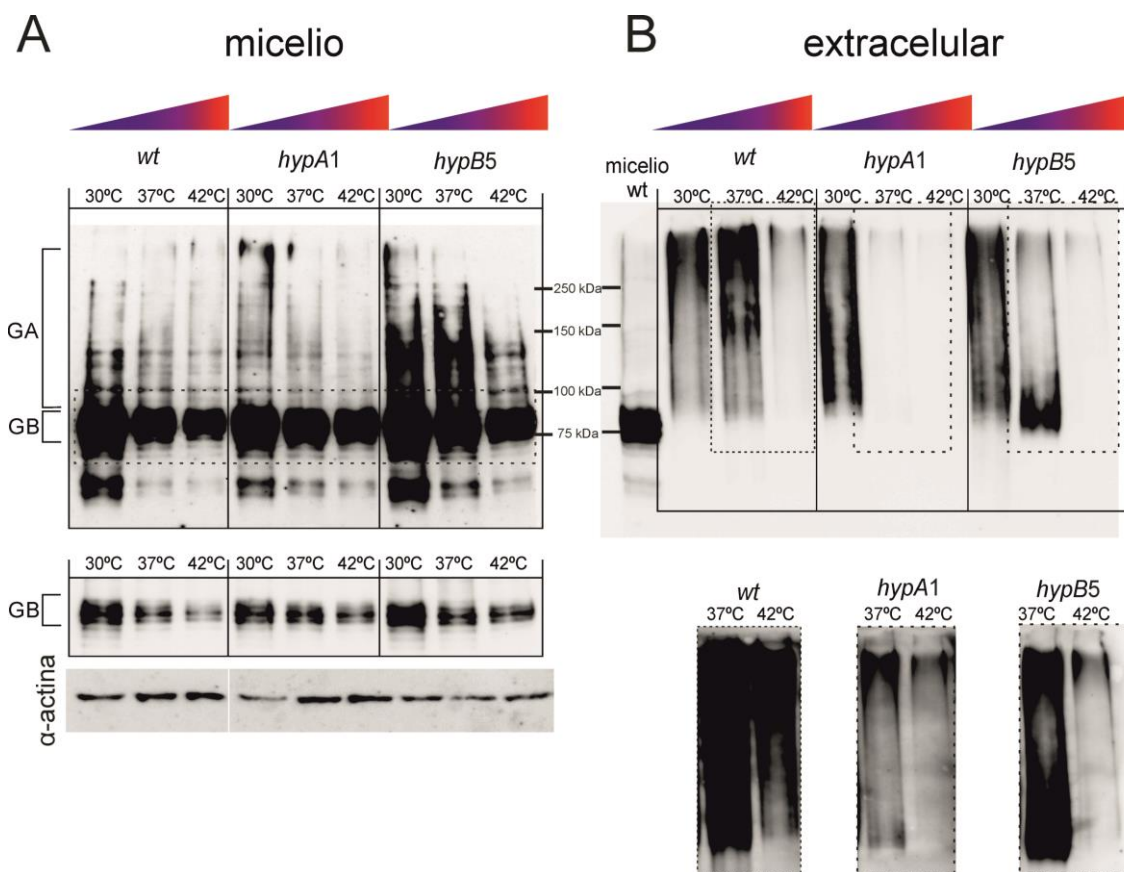


**Figura R.63. Alteración del Golgi con *podB1* y *copA<sup>ts</sup>*.** **A.** Efecto del incremento de la temperatura del cultivo a 42°C en el mutante *podB1*. A 42°C, *podB1* no produce InuA del tipo GA, ni es capaz de secretar inulina al medio extracelular. **B.** *copA<sup>ts</sup>*, incluso a la temperatura permisiva de 30°C secreta menos InuA que la cepa wt, efecto que se ve exacerbado al realizar la inducción a 42°C. **C.** Test de crecimiento de una cepa *copA<sup>ts</sup>*.

**4.6.10. Papel esencial del TGN en la secreción de InuA: HypB/Sec7 y HypA/Trs120**

HypB (Sec7) y HypA (Trs120) son dos residentes prototípicos del *trans*-Golgi (TGN), cruciales para su función [18, 24, 37]. HypB (Sec7) actúa como GEF de Arf en el TGN [24]. HypA (Trs120) activa RabE durante la salida de vesículas secretoras [36, 37]. Utilizamos las mutaciones termosensibles *hypB5* [25] y *hypA1* [37] para provocar un bloqueo en el TGN y estudiar el efecto sobre InuA. Existen numerosos datos que implican al TGN de hongos en la salida de *cargo* del Golgi, pero no en su glicosilación [135].

*hypA1* no provocó ningún efecto sobre la inulinasas intracelular a ninguna de las temperaturas probadas —30°C, 37°C y 42°C (Figura R.64A). Sin embargo, *hypA1* impidió la secreción de InuA casi completamente a 37°C y 42°C (Figura R.64B). Estos resultados indican que *hypA1* no es necesario para la glicosilación de InuA, aunque es crucial para su exocitosis, presumiblemente a través de la activación de RabE.



**Figura R.64. Efecto de *hypA1* y *hypB5* en InuA. Ambos mutantes impiden la secreción de InuA a 42°C. A. Análisis por *western-blot* de la inulinasas del micelio. B. *Western-blots* del medio extracelular. Las imágenes de abajo corresponden a mayores exposiciones de la misma membrana.**

*hypB5* provocó un efecto diferente al de *hypA1*. Mientras que el patrón de glicosilación de la inulinasas intracelular es esencialmente igual al de una cepa *wt* (Figura R.64), el mutante *hypB5* a 39°C secretó especies de InuA hipoglicosiladas, cuyas formas más abundantes

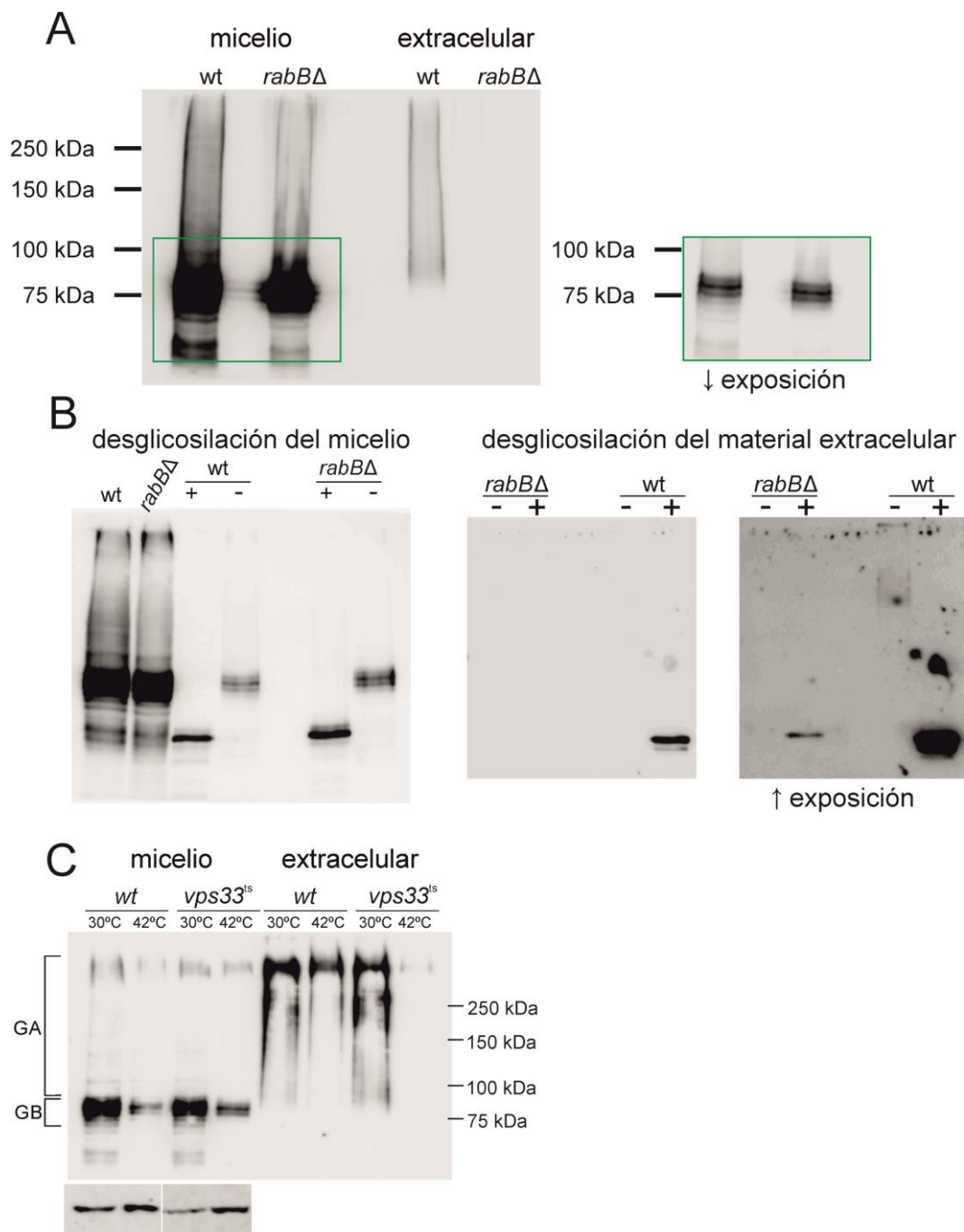
migraron como las formas más “rápidas” de GA (Figura R.64B). Esto indica que *hypB5* presenta un defecto en la glicosilación de InuA en el aparato de Golgi. Como corresponde a su papel clave en el TGN, *hypB5* redujo notablemente la secreción de InuA a 42°C (Figura R.64B).

Estos resultados sugieren que la integridad del TGN es necesaria para la secreción de inulinasa y que HypB (Sec7) participa tanto en la salida de *cargo* desde el TGN como en la organización del Golgi, necesaria esta última para la correcta glicosilación. Junto con los resultados del apartado anterior, sugieren que lo que llamamos el Golgi temprano (i.e. el Golgi donde se encuentra SedV) es más importante para la glicosilación de InuA que el TGN.

### **4.6.11. La integridad de los endosomas tempranos es un requisito para la exocitosis de InuA**

Existía evidencia previa de que ciertas proteínas solubles, como la invertasa de *S. cerevisiae*, requieren el funcionamiento normal del sistema endosomal para su tráfico normal al exterior celular [30], de manera que estas proteínas viajarían a los endosomas antes de ser secretadas. Por ello, alteramos el tráfico entre Golgi y endosomas y analizamos su efecto en InuA. Para afectar la integridad de los endosomas tempranos utilizamos el mutante termosensible *vps33<sup>ts</sup>* y el mutante de delección *rabBΔ*. RabB (ortóloga de RAB5 de mamíferos y Vps21p en *S. cerevisiae*) es el principal determinante del establecimiento de identidad endosomal en *A. nidulans* [164]. RabB recluta la quinasa Vps34, requerida para iniciar la ruta de cuerpos multivesiculares [164]. También recluta el complejo CORVET, que media eventos de fusión y HookA que media el transporte endosomal a larga distancia [18, 156, 164]. Vps33 es una subunidad común de los complejos CORVET y HOPS [224], complejos oligoméricos que se localizan en los endosomas tempranos y tardíos, respectivamente. Específicamente, Vps33 es una proteína SM (Sec1/Munc18) que interviene en procesos de fusión endosomal.

Como se muestra en la Figura R.65A, la mutación *rabBΔ* impidió la secreción de InuA. Sin embargo, no alteró los niveles ni el patrón electroforético de la inulinasa del micelio. Concentramos las proteínas del medio utilizando un filtro *Microcon* y digerimos este concentrado de proteínas con PNGasa F para convertir todas las especies de InuA en el doblete de bandas sin glicosilar y, así, eliminar la posibilidad de que, en *rabBΔ*, InuA se hiperglicosilase de manera que no entrase en el gel o que no la detectásemos mediante *western-blot*. De este modo, pudimos detectar una pequeña cantidad de InuA secretada por el mutante *rabBΔ*, que en cualquier caso era muy inferior a la del wt (Figura R.65B). Concluimos que RabB es necesario para la secreción eficiente de InuA al medio externo, pero no para su glicosilación.



**Figura R.65. Efecto de *rabBA* y *vps33<sup>ts</sup>* en InuA.** **A.** Efecto de *rabBA*. *rabBA*Δ no es capaz de secretar InuA eficientemente, mientras que InuA en el micelio es igual que una cepa wt. El recuadro verde es una exposición más baja de las formas GB, que muestra la ausencia de diferencias entre wt y *rabBA*Δ. **B.** Mediante desglicosilación de la inulinasa del micelio confirmamos que InuA intracelular no está alterada en la cepa mutante. La desglicosilación de las proteínas del medio de cultivo nos permitió detectar InuA y confirmar el déficit en secreción que causa la mutación *rabBA*. **C.** *vps33<sup>ts</sup>* no es capaz de secretar InuA eficientemente, a 42°C.

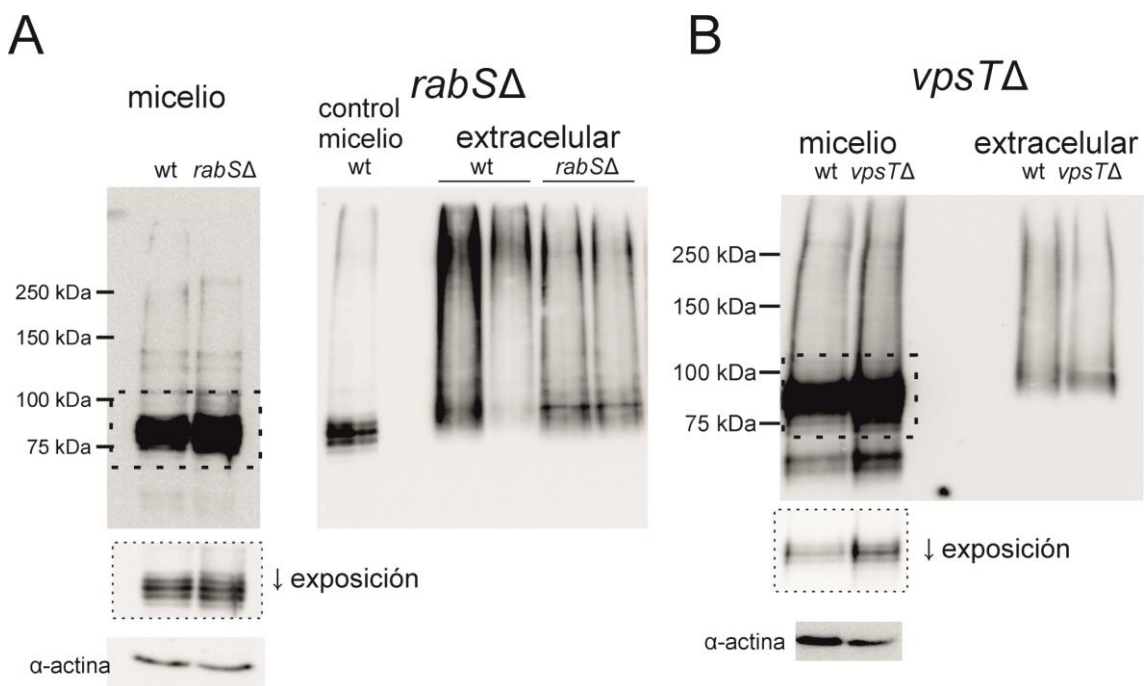
Al realizar los experimentos equivalentes con el mutante *vps33<sup>ts</sup>*, basados en cambio de temperatura, comprobamos que a 30°C *vps33<sup>ts</sup>* es capaz de secretar InuA al medio externo, mientras que a 42°C la InuA secretada es prácticamente indetectable (Figura R.65C). Por tanto, al igual que RabB, Vps33 no es necesario para la glicosilación de InuA (Figura R.65C), pero sí

## Capítulo VI

lo es para su secreción al medio externo. Es importante recalcar que ni RabB ni Vps33 son necesarios para el transporte de ChsB a la membrana plasmática (capítulo V). Además, RabB no se requiere para la secreción de EglC (capítulo VII). Por tanto, concluimos que el efecto de *rabBΔ* es específico sobre el *cargo* inulinasa.

Quisimos comprobar si la maduración endosomal era necesaria para la secreción de InuA o si, por el contrario, solo se requiere la integridad de los endosomas tempranos (RabB y Vps33). Para ello utilizamos el mutante *rabSΔ*. RabS (ortólogo de Rab7 de mamíferos e Ypt7p de *S. cerevisiae*) media la fusión homotípica que ocurre entre los endosomas tardíos y la heterotípica entre ellos y las vacuolas; como consecuencia, el mutante *rabSΔ* presenta vacuolas con un tamaño reducido [173]. Al contrario que *rabBΔ* y *vps33<sup>ts</sup>*, la mutación *rabSΔ* no afectó ni a la glicosilación ni a la secreción de InuA (Figura R.66A).

Finalmente, analizamos el mutante *vpsTΔ* —el ortólogo de *VPS10* de *S. cerevisiae*— [38]. En *S. cerevisiae* Vps10p media el transporte de hidrolasas vacuolares a los endosomas, función que parece estar conservada en *Aspergillus* [243]. La mutación *vpsTΔ* no afectó a la secreción de InuA ni a su glicosilación (Figura R.66B), lo que indica que esta proteína no está implicada en el tráfico de inulinasa.



**Figura R.66. *vpsTΔ* y *rabSΔ* no afectan al tráfico de InuA.** A. InuA de micelio y extracelular en una cepa wt y otra cepa *rabSΔ*. La precipitación del medio extracelular esta hecha por duplicado y, por ello, aparecen “duplicados” los carriles. B. Lo equivalente con *vpsTΔ*. No existen diferencias apreciables entre la cepa silvestre y las cepas mutantes.

Globalmente los resultados anteriores muestran que los endosomas juegan un papel clave en la exocitosis de InuA. Sin embargo, ni la integridad de los endosomas tardíos y las vacuolas, ni tampoco el transporte de hidrolasas vacuolares son necesarios. Por lo tanto, estas evidencias implican de manera específica a los endosomas tempranos en la secreción de InuA.

En este capítulo hemos cartografiado la ruta de secreción y de glicosilación de InuA. En conjunto los resultados indican que las especies GB se producen por la N-glicosilación las asparaginas de InuA en el RE. Posteriormente las especies GA se producirían por modificación, en el aparato de Golgi, de los N-glicanos de las especies GB. Tanto la conexión RE-Golgi, como el Golgi temprano y HypB (Sec7) son necesarios para la síntesis de estas especies moleculares GA y para la secreción de inulinasa. Trs120 también es indispensable para la exocitosis de InuA pero no para la glicosilación. Consideramos que el resultado más importante de este capítulo es el que implica, de manera específica, la función de los endosomas tempranos en la secreción de inulinasa.

# Capítulo VII

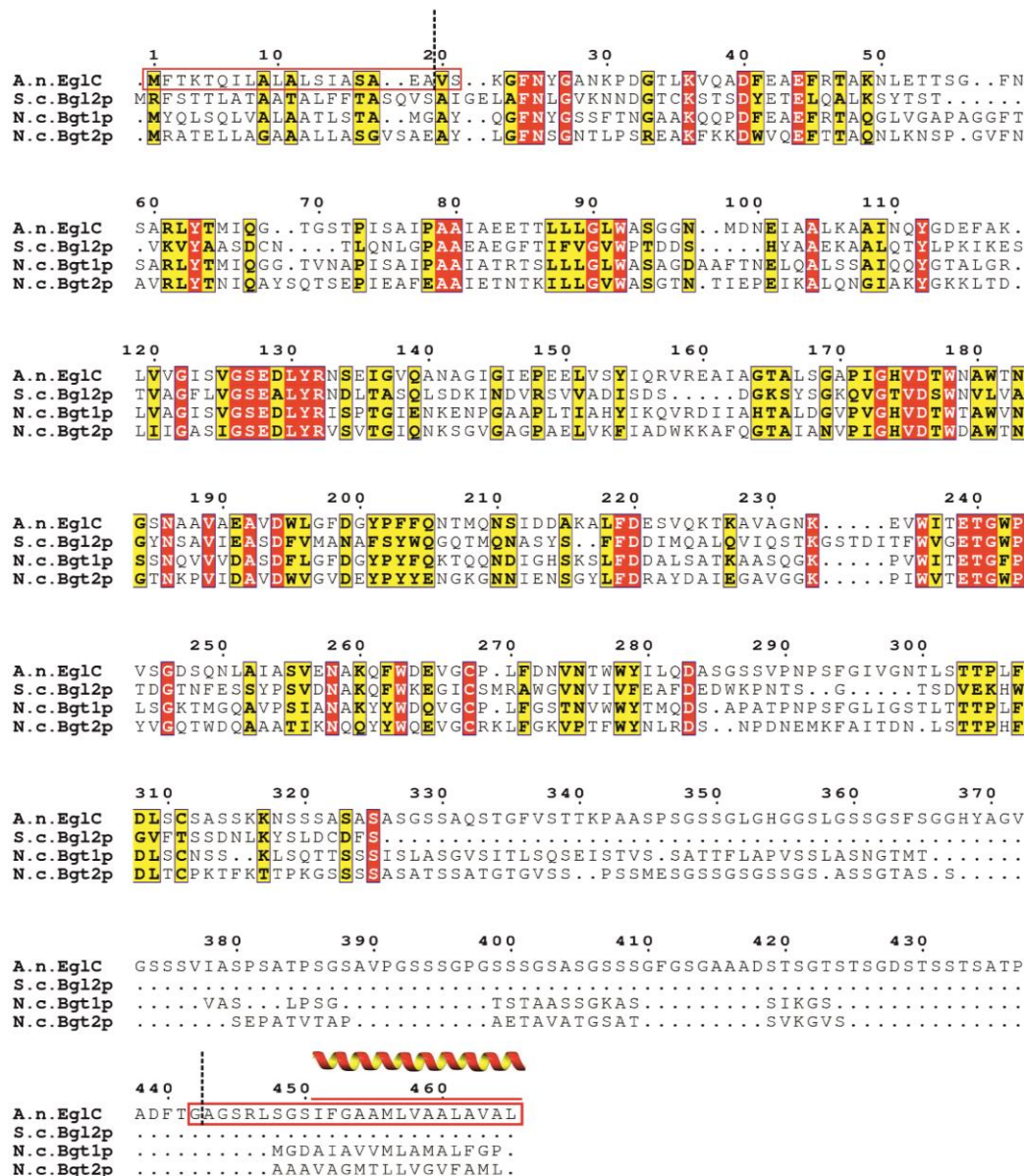
## 4.7. Capítulo VII: Análisis de la ruta de secreción de una proteína anclada a GPI: EglC

Las proteínas ancladas a GPI (PA-GPI) son proteínas *cargo* de la ruta secretora que viajan unidas a la membrana mediante un anclaje de glicosil fosfatidil inositol (GPI) covalentemente unido, unión que se produce en el retículo endoplasmático (RE) [2]. En *S. cerevisiae* y en mamíferos las PA-GPI se concentran en vesículas diferentes del resto de *cargo*. En *S. cerevisiae* la separación ocurre en la salida del RE, desde donde las PA-GPI viajan al Golgi en vesículas COPII exclusivas [31]. Por el contrario, en mamíferos la segregación de las PA-GPI ocurre en el TGN (ver Introducción).

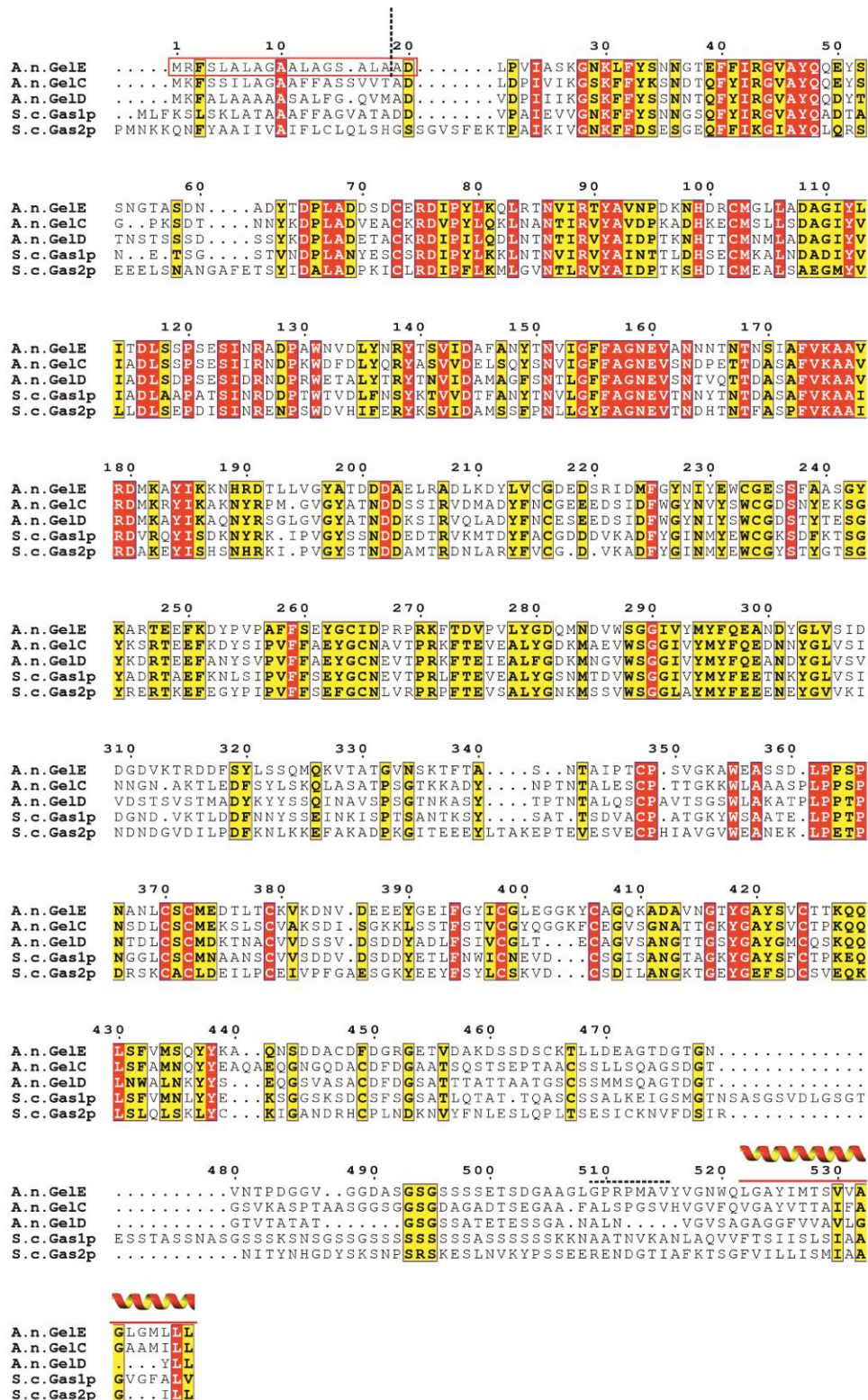
### 4.7.1. Análisis bioinformático de las proteínas ancladas a GPI en *Aspergillus nidulans*

Con el propósito de utilizar como *cargo* modelo una proteína anclada a GPI que se expresase eficientemente y viajase a la superficie celular nos basamos en un estudio que identificó y caracterizó hasta 12 PA-GPI diferentes en la pared celular o el periplasma de *A. nidulans* [244]. De entre ellas, nos fijamos en las pertenecientes a las familias Bgl2 y Gas/Gel, ya que eran las más estudiadas en levaduras. Ambas familias presentan actividad  $\beta$ -(1,3)-endoglucanasa; sin embargo, los miembros de la familia Gas/Gel también tienen actividad transglicosilasa, la cual actúa inmediatamente después de la actividad endoglucanasa [245, 246]. De este modo, estas enzimas rompen un enlace  $\beta$ (1,3) de un glucano y transfieren el extremo reductor así formado a un extremo no reductor de otro glucano. Esta doble actividad enzimática permite la extensión en longitud de las cadenas de glucanos [246].

Respecto a la familia Bgl2, el estudio proteómico citado identificó la proteína EglC [244]. EglC presenta gran homología con Bgt1p y Bgt2p de *Neurospora crassa* [247] y con Bgl2 de *S. cerevisiae* (Figura R.67). SignalP 4.1 predice que los 21 primeros residuos de EglC corresponden al péptido señal que determina su entrada al RE (corte entre los residuos 19 y 20 a partir de la metionina N-terminal). Por otro lado, los últimos 24 aminoácidos conformarían la señal de anclaje a GPI, ocupando la posición  $\omega$  la Gly442 (Figura R.67), que representaría el aminoácido C-terminal cuando dicha señal se procesa.



**Figura R.67. Alineamiento de la familia Bgl2.** Alineamiento múltiple de secuencia mediante ClustalW. El color rojo indica residuo invariable y el amarillo similitud de secuencia con un umbral de 0.15 usando la matriz BLOSUM62. Nombre de especie y números de identificación de GenBank: *Aspergillus nidulans* (EglC): 74593233, *Saccharomyces cerevisiae* (Bgl2p): 1323515, *Neurospora crassa* (Bgt1p): 28923819; *Neurospora crassa* (Bgt2p): 28920483. El rectángulo rojo al principio de la secuencia de EglC muestra el péptido señal predicho por SignalP 4.1, y la línea punteada indican el punto de corte por la peptidasa correspondiente. El rectángulo rojo del final muestra la señal de anclaje al GPI y la línea punteada indican el punto de corte. La hélice superpuesta indica una región polar compatible con ser una  $\alpha$ -hélice transmembrana.



**Figura R.68. Alineamiento de la familia Gel/Gas.** Alineamiento múltiple como en la figura 1. Nombre de especie y números de identificación de GenBank: *Aspergillus nidulans*: GelE: 67901048, GelC: 67526545, GelD: 67526545; *Saccharomyces cerevisiae*: Gas1: 1023941878, Gas2: 1023942311. El rectángulo rojo al principio de la secuencia de EglC muestra el péptido señal predicho por SignalP 4.1, y la línea punteada indican el punto de corte por la peptidasa. La hélice al final de la secuencia indica una región polar compatible con ser una  $\alpha$ -hélice transmembrana y la línea punteada indican la región donde posiblemente está el punto de corte, tras el reconocimiento de la señal de anclaje del GPI.

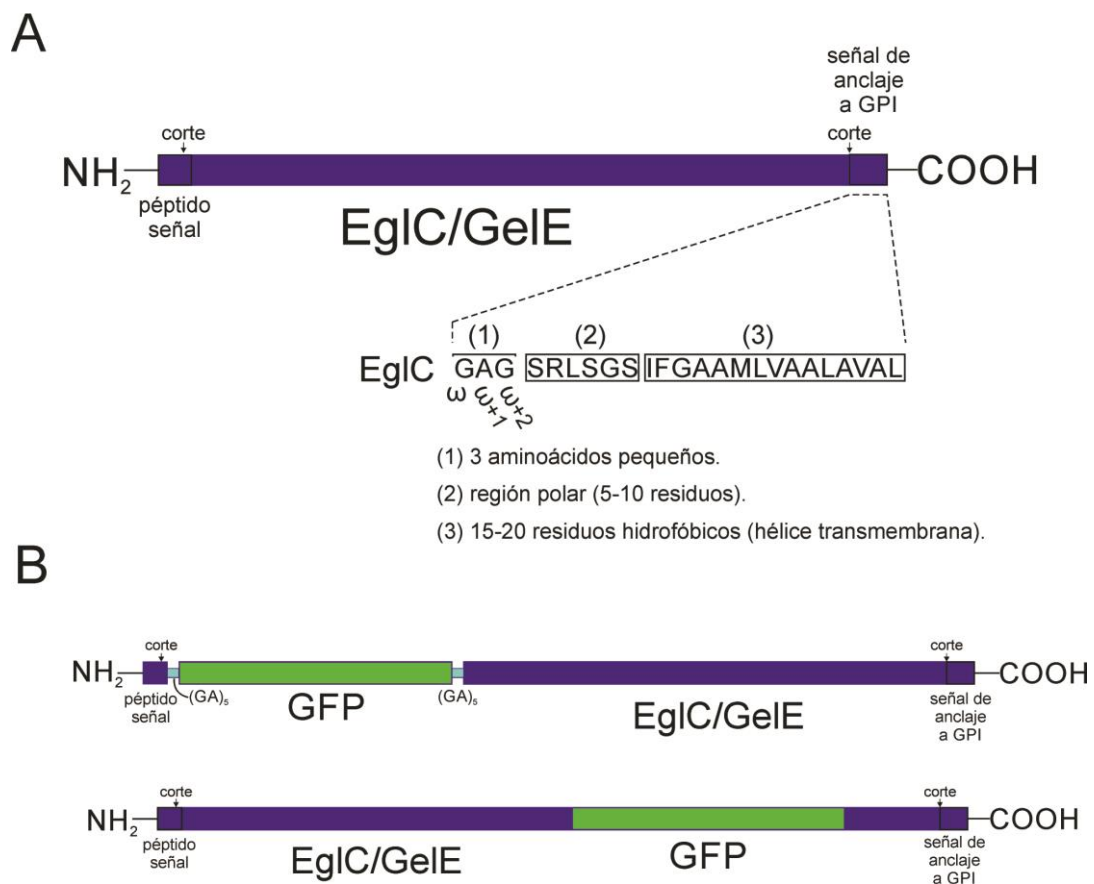
En relación a la familia Gas/Gel, estudiamos la homología de secuencia entre Gas1p y Gas2p de *S. cerevisiae* y todas las proteínas Gel de *A. nidulans* (GelA-GelE). Todas estas proteínas de *A. nidulans*, excepto GelC, fueron identificadas por espectrometría de masas en el estudio previamente descrito [244]. En un primer alineamiento, comprobamos que GelA y GelB son muy diferentes del resto de proteínas. Por lo tanto, las excluimos de un segundo alineamiento, con el que comprobamos que el nivel de similitud de estructura primaria entre Gas1p y Gas2p y GelC/D/E es relativamente alto (Figura R.68). En *A. fumigatus*, de los siete miembros de la familia Gel, solamente tres de ellos (Gel1p, Gel2p y Gel4p) se expresan constitutivamente [248]. Con este dato en mente, comprobamos los datos de expresión en *A. nidulans* de *gelC*, *gelD* y *gelE* (RNAseq, comunicación personal de Mark X. Caddick a *Aspergillus Genome Database*). Éstos indicaban que GelE se expresa a niveles mucho mayores que GelC y GelD. Por tanto, preseleccionamos GelE para nuestro estudio. Finalmente, verificamos que GelE presenta péptido señal (corte entre los residuos 18 y 19) y, en su extremo C-terminal, contiene predeciblemente una hélice transmembrana (Figura R.68), que constituye una parte indispensable de la señal de anclaje a GPI (Figura R.68).

En conclusión, seleccionamos EglC y GelE para su estudio como modelos de PA-GPI.

### 4.7.2. Etiquetado fluorescente de EglC y GelE

Dado que las PA-GPI tienen su extremo N-terminal ocupado por el péptido señal y su región C-terminal constituye la señal de anclaje de GPI (Figura R.69A), la fusión de cualquier proteína o péptido en uno de sus extremos alteraría su función. Por tanto, integramos la secuencia de *gfp* en un punto “interior” de la ORF de *eglC* y *gelE*. En primer lugar, marcamos tanto EglC como GelE con GFP entre el péptido señal y el resto de la proteína. Específicamente, construimos un gen quimérico que codificaba los 21 aminoácidos N-terminales de EglC seguidos de GFP y el resto de EglC (Figura R.69B). Además, introducimos un conector de 5x Gly-Ala en ambos extremos de la secuencia de GFP para evitar en la medida de lo posible efectos indeseados de la GFP sobre el plegamiento de los dominios de EglC. Realizamos la construcción equivalente con GelE, considerando los 20 primeros aminoácidos como el péptido señal (Figura R.69B). Ambos casetes de transformación incluyeron el marcador de selección *pyrG<sup>fum</sup>* y secuencias flanqueantes para mediar la recombinación homóloga y su correcta integración en los loci correspondientes, sustituyendo los genes *eglC* o *gelE* endógenos. Tras transformar *A. nidulans* y estudiar los transformantes comprobamos que las células no tenían fluorescencia. En vista de esto, para utilizar un promotor fuerte y constitutivo, construimos cepas que expresaban los mismos genes quiméricos con el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*. Estas cepas tampoco fueron fluorescentes. Consideramos la posibilidad de que estuviésemos afectando al plegamiento de EglC y GelE o a su entrada al RE y, por lo tanto, decidimos cambiar la posición

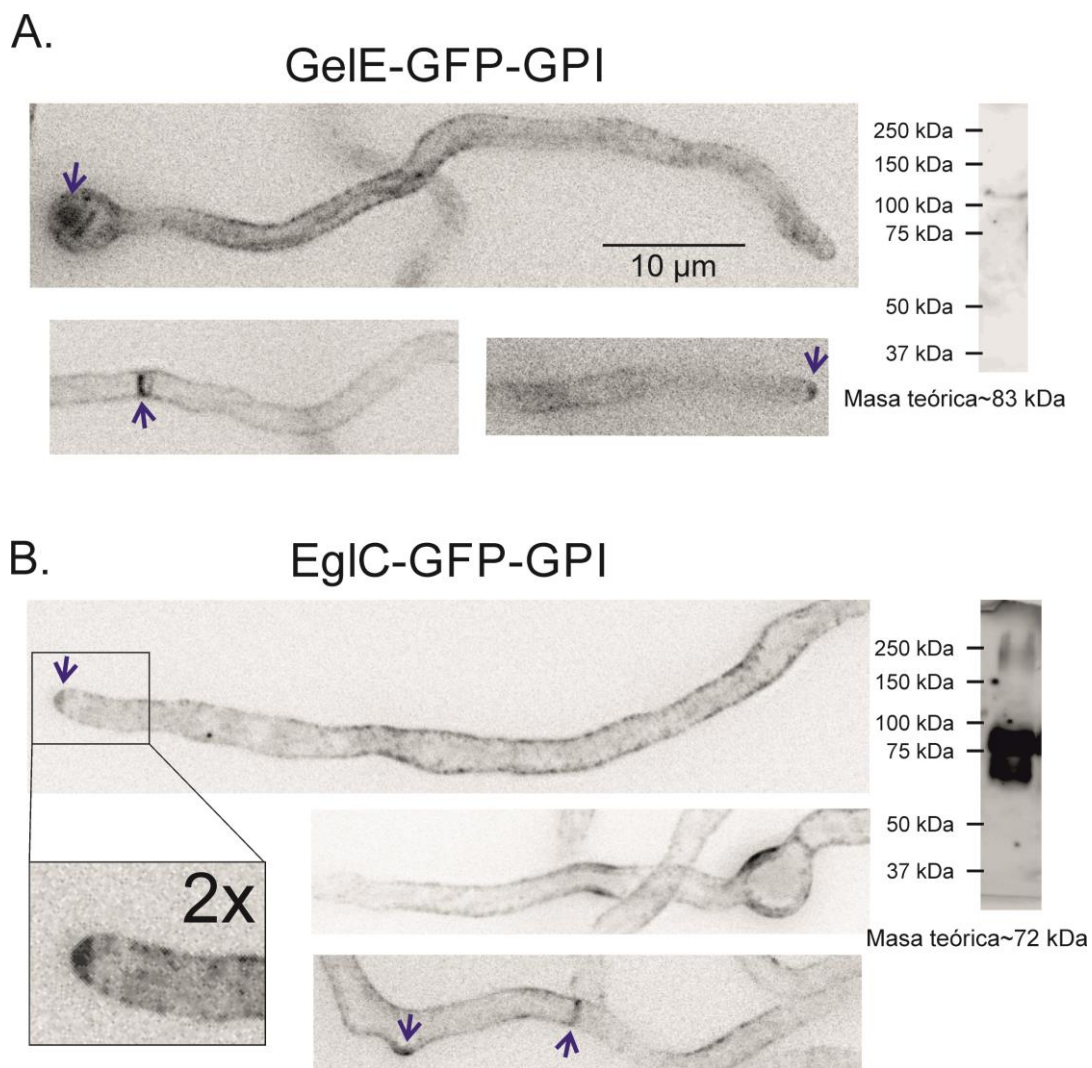
de la GFP. Para ello, estudiamos la estructura tridimensional de los ortólogos cristalizados de EglC y GeIE: la endo- $\beta$ -1,3-glucanasa de *Musa acuminata* [249] y Gas2p de *S. cerevisiae* [245], respectivamente. Estas proteínas tienen, como dominio catalítico, un barril TIM ( $\beta$ - $\alpha$ )<sub>8</sub>, frecuente en enzimas modificadoras de carbohidratos [245, 249]. Gas2p, además, tiene un dominio rico en cisteínas (familia CBM45), que también participaría en la catálisis. En ambas proteínas existe una secuencia no conservada entre la región catalítica y la secuencia de anclaje de GPI (Figuras R.67 y R.68), probablemente carente estructura secundaria, que no está resuelta en los cristales correspondientes [245, 249]. Decidimos situar la GFP en esta supuesta región espaciadora de EglC y GeIE, asumiendo que, de esta manera, no afectaríamos al plegamiento de la proteína. Específicamente, marcamos GeIE con GFP entre los residuos 482 y 483 y EglC entre 359 y 360. Denominamos a estos genes quiméricos *eglC-gfp-GPI* y *geIE-gfp-GPI*. Una vez integradas en sus respectivos loci por recombinación homóloga, estas quimeras produjeron resultados satisfactorios dado que las cepas presentaron fluorescencia en la superficie celular (Figura R.70).



**Figura R.69. Estructura de GeIE y EglC y marcaje con GFP.** **A.** El dibujo representa las proteínas GeIE y EglC con el péptido señal en N-terminal y la señal de anclaje de GPI en C-terminal, enfatizando la dificultad del marcaje con GFP. **B.** Las dos estrategias utilizadas en el marcaje de estas proteínas. Para preservar las secuencias N y C-terminales la GFP se integró en el interior de la secuencia proteica. El marcaje después del péptido señal no produjo resultados satisfactorios; sin embargo, GFP colocado en el largo bucle predicho que existiría en ambas proteínas, permitió visualizarlas por microscopía de fluorescencia.

### 4.7.3. Las quimeras fluorescentes de EglC y GeIE se localizan en la periferia celular

Mediante microscopía *in vivo*, determinamos que la localización de ambas proteínas era indistinguible entre sí y que su fluorescencia era relativamente baja. Se localizan principalmente en la superficie celular y, en menor medida, en los septos y en el Spitzenkörper (Figura R.70). Sus distribuciones a lo largo de la superficie de la hifa son “antipolarizadas”: hay más fluorescencia en las zonas basales y menos en las apicales (Figura R.70). Además, existe una acumulación en los sitios de ramificación, donde están naciendo nuevos ápices (Figura R.70A). La localización de estas proteínas en la superficie celular y los septos es consistente con su función de enzimas modificadoras de la pared celular.

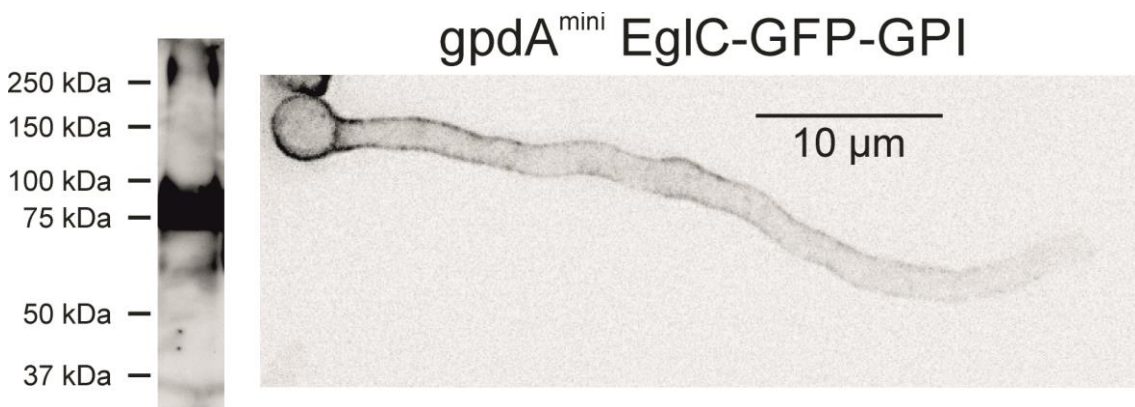


**Figura R.70. Localización e inmunodetección de EglC-GFP-GPI y GeIE-GFP-GPI** **A.** A la izquierda, localización de GeIE en la superficie celular, en la vacuola de la espora, en los septos y en el Spitzenkörper. A la derecha, débil inmunodetección de GeIE-GFP-GPI. **B.** A la izquierda, localización de EglC de manera indistinguible a GeIE. Derecha, inmunodetección de EglC, mostrando diversidad de especies moleculares. Todas las imágenes con la misma ampliación.

Las proteínas ancladas a GPI suelen N-glicosilarse [2, 149], proceso que ocurre tanto en el RE como en el Golgi. Si fuese el caso, la determinación del patrón electroforético de estas proteínas podría ser útil para averiguar la ruta que toman en su viaje a la superficie celular, de manera similar al abordaje realizado con InuA (ver capítulo VI). De hecho, mediante *western-blot*, demostramos que EglC y GeIE presentan numerosas bandas (Figura R.70), que serán analizadas más adelante. Obtuvimos mayor señal de EglC que de GeIE en el *western-blot* y decidimos continuar los estudios sólo con EglC (Figura R.70B).

#### 4.7.4. La expresión de EglC-GFP-GPI bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>* mejora su señal fluorescente

Dado que la expresión de EglC-GFP-GPI y GeIE-GFP-GPI con su promotor natural produjo niveles de fluorescencia relativamente bajos, decidimos expresar EglC-GFP-GPI con el promotor moderadamente fuerte *gpdA<sup>mini</sup>*. Mediante el uso de este promotor obtuvimos mayor señal fluorescente con una localización esencialmente igual (Figura R.71). La única diferencia fue que la localización en el SPK no era tan evidente, probablemente por el aumento considerable de la fluorescencia en la superficie celular. El *western-blot* de la Figura R.71 muestra que la sobreexpresión de EglC-GFP-GPI no afectó a su patrón de especies moleculares.



**Figura R.71. Expresión de EglC-GFP-GPI bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*.** La expresión de EglC con el promotor *gpdA<sup>mini</sup>* no altera la localización ni el patrón electroforético de la proteína, pero mejora su señal.

### 4.7.5. Expresión regulable de EglC-GFP-GPI mediante integración del gen quimérico en el locus *inuA*

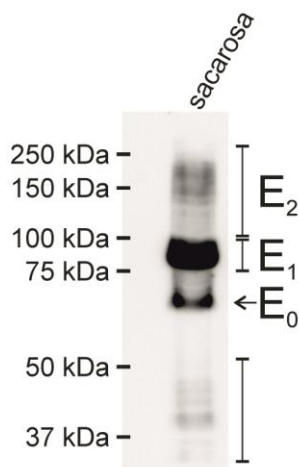
Recuérdese que nuestro objetivo era determinar la ruta seguida por una PA-GPI. Para ello sería útil realizar interrupciones de pasos específicos del tráfico intracelular y determinar el efecto en la localización de EglC. Estos bloqueos se pueden hacer con mutantes termosensibles, incrementando la temperatura del cultivo en células ya crecidas. Sin embargo, al realizar este tipo de experimentos con un promotor constitutivo, la proteína que se localizase en la superficie celular previamente a la interrupción del tráfico enmascararía el efecto real de dicha interrupción. Este inconveniente se puede subsanar utilizando un promotor regulable e induciendo la expresión de EglC después del bloqueo del tráfico. Sin embargo, los promotores regulables que se utilizan en *A. nidulans* requieren o la inducción con una fuente de carbono pobre (promotor *alca*<sup>P</sup> [18]) o el uso de una fuente alternativa de nitrógeno (promotor *niiA*<sup>P</sup> [157]). Dado que la regulación de la expresión de *InuA* con glucosa/sacarosa había dado buenos resultados anteriormente (capítulo VI), decidimos usar dicha regulación para la expresión EglC. Para ello, sustituimos en el genoma la ORF de *inuA* por el gen quimérico *eglC-gfp-GPI*. Así, obtuvimos una cepa en la que *eglC-gfp-GPI* estaba controlado por el circuito de regulación transcripcional que normalmente controla la expresión de *inuA*. (Parte de los experimentos relativos a esta cepa fueron realizados junto a Esteban Moscoso Romero, estudiante del “Máster en Microbiología y Parasitología: Investigación y Desarrollo” de la Universidad Complutense de Madrid, que se incorporó a este proyecto). Comprobamos que esta cepa transgénica no era fluorescente si se cultivaba en medio con glucosa. Sin embargo, al cultivarla con sacarosa como fuente de carbono, EglC-GFP-GPI se expresó y marcó con fluorescencia su localización normal. Es más, cuando cultivamos estas células en medio con glucosa y las cambiamos, una vez crecidas, a medio con sacarosa, en 5-10 minutos se empezó a apreciar fluorescencia citosólica. Después de 2 horas, la fluorescencia fue relativamente alta y EglC-GFP-GPI se localizó igual que cuando se expresaba con su promotor natural (Figura R.72A). La potencia de la inducción con sacarosa quedó patente al analizar los niveles de EglC mediante *western-blot*. Como muestra la Figura R.72B, la expresión de EglC-GFP-GPI en un cultivo con glucosa no era detectable con un tiempo de exposición que saturaba la señal correspondiente a la inducción con sacarosa durante 1.5 horas, tanto a 30°C como a 37°C (Figura R.72C). Los *western-blots* también revelaron que las modificaciones postraduccionales se producían fielmente (Figura R.72B-C).

A

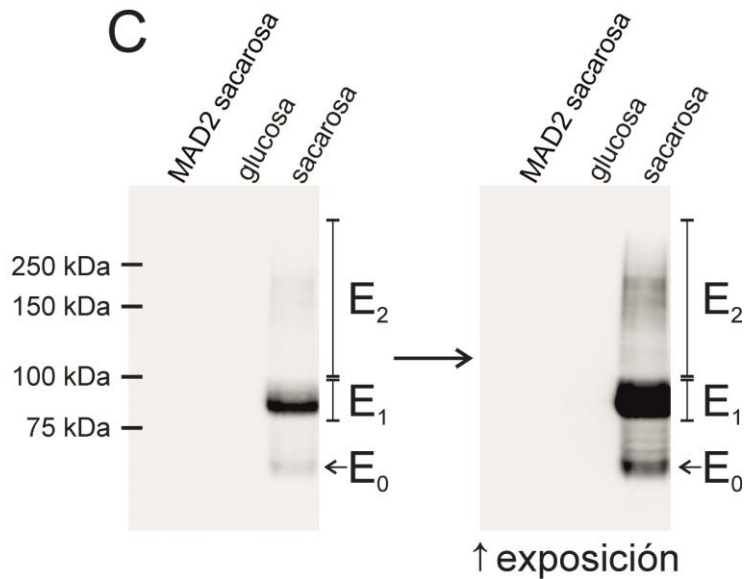
*inuA*::[EglC-GFP-GPI]



B



C



**Figura R.72. Inducción de la expresión de EglC-GFP-GPI con sacarosa mediante su integración en el locus *inuA*.** A. Célula expresando EglC-GFP-GPI tras 2 horas del cambio a un medio con sacarosa. B. Patrón electroforético de EglC-GFP-GPI en donde se indica la clasificación de las diferentes regiones. C. Electroforesis que muestra la especificidad de la inmunodetección (MAD2 es una cepa que no contiene *eglC-gfp-GPI*). También pone de manifiesto la regulación del promotor por la fuente de carbono: el carril glucosa muestra la inmunodetección de extracto proteico de una cepa *eglC-gfp-GPI* cultivada en glucosa durante 1.5 horas; el carril sacarosa muestra la inmunodetección de la misma cepa crecida en sacarosa 1.5 horas. Nótese que en esta electroforesis las muestras se han dejado correr más que en B.

#### 4.7.6. Análisis del patrón electroforético de EglC-GFP-GPI

El tamaño predicho para EglC-GFP-GPI, una vez descontados el péptido señal y el péptido de anclaje de GPI, es de ~ 69,3 kDa. Si a ello le sumamos la masa molecular de un anclaje GPI estándar (3 x manosas + 3 x etanolaminas fosfato + etanolamina + glucosamina + inositol + ceramida o diacilglicerol; ~1.9 kDa), la masa molecular final sería de ~ 72.2 kDa. El patrón electroforético de EglC-GFP-GPI presenta cuatro regiones bien diferenciadas (Figura R.72B). En primer lugar, una región corresponde al conjunto de bandas con una movilidad mayor a la banda de 50 kDa del marcador que, creemos, correspondería a EglC-GFP-GPI

degradada. La segunda región contiene una banda con una movilidad superior a 75 kDa. Hipotetizamos que esta banda corresponde a EglC-GFP-GPI procesada pero sin glicosilar, con un tamaño teórico de ~ 72.2 kDa. Denominamos a esta banda E<sub>0</sub>. En tercer lugar, existe una serie de bandas discretas con una movilidad de 75-100 kDa, que presentan distancia similar entre ellas. Por la experiencia con la inulinasa (capítulo VI), hipotetizamos que esta región podría corresponder a EglC-GFP-GPI con N-glicosilaciones producidas en el RE, en donde la N-glicosilación ocurre por transferencia en bloque de cadenas de glicanos [114]. Denominamos a este conjunto de bandas E<sub>1</sub>. Además, hay al menos dos bandas ‘de transición’ entre E<sub>0</sub> y E<sub>1</sub>, de muy baja intensidad en el *western-blot* (Figura R.72C). Finalmente, una tercera región, que denominamos E<sub>2</sub>, contiene numerosas especies de EglC-GFP-GPI en una señal difusa entre la posición de 100 kDa y el principio del gel. Hipotéticamente corresponderían a las glicosilaciones del aparato de Golgi, que extenderían las cadenas añadidas en el RE. Es destacable la similitud entre el patrón de EglC-GFP-GPI y el de la inulinasa (capítulo VI), siendo ambas proteínas *cargo* de la ruta secretora.

### 4.7.7. Estudio de la ruta de exocitosis de EglC

Para el estudio de la ruta secretora de utilizamos la cepa que contiene el transgén *eglc-gfp-GPI* integrado en el locus *inuA*, para regular su expresión con la fuente de carbono. No obstante, cuando lo consideramos necesario utilizamos, como control, otras de las construcciones quiméricas explicadas más arriba.

#### 4.7.7.1. Visualización de EglC-GFP-GPI acumulado en el retículo endoplasmático por efecto de *sarA6*

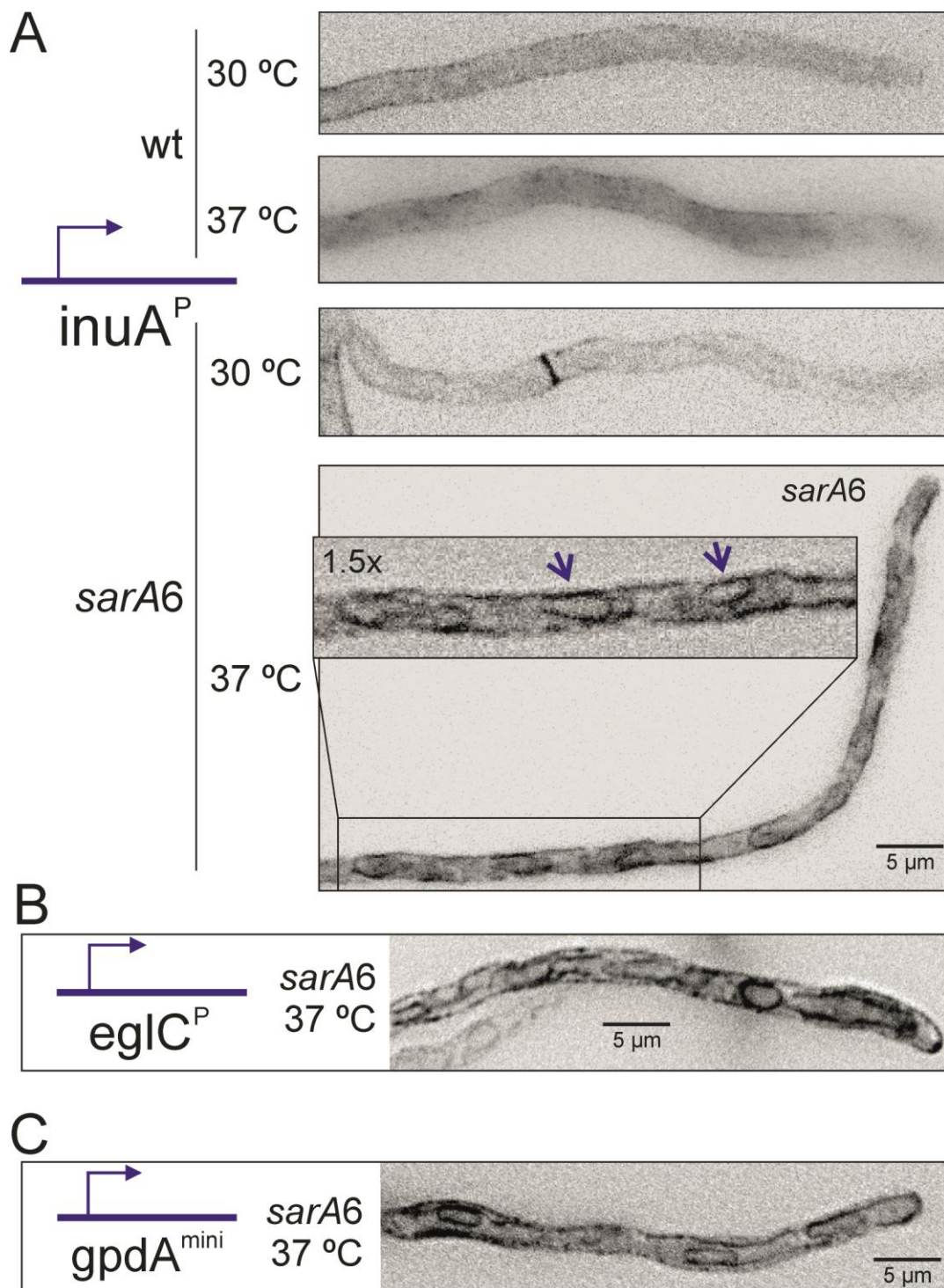
En primer lugar, nos dispusimos a averiguar si la acumulación de EglC-GFP-GPI en el lumen de un orgánulo celular era detectable por microscopía de fluorescencia. Para ello utilizamos el mutante termosensible *sarA6* (ver capítulo I). Por cruzamiento, obtuvimos una cepa *inuA::[eglc-gfp-GPI] sarA6*. En esta cepa, cultivada a 30°C y con sacarosa como fuente de carbono, EglC-GFP-GPI se localizó normalmente en la superficie celular (Figura R.73A). Para determinar el efecto de la inactivación de SarA, incrementamos la temperatura de otro cultivo a 37°C a la vez que inducíamos la expresión de EglC-GFP-GPI. Para ello cambiamos el medio de cultivo por medio con sacarosa y, simultáneamente, incrementamos la temperatura del incubador acoplado al microscopio. En estas condiciones observamos que en el mutante *sarA6*, EglC-GFP-GPI no viajó a la superficie celular, a diferencia de la cepa wt (Figura R.73A). En cambio, se localizó exclusivamente en la red de membranas del RE, que incluye las envolturas nucleares (Figura R.73A). Este resultado demuestra que: (1) SarA es necesario para que EglC-

GFP-GPI salga del RE; (2) EglC-GFP-GPI es una proteína reportera válida para determinar, por microscopía de fluorescencia, la acumulación de EglC en el lumen de los orgánulos (nótese que la GFP es intralumenal en este caso, a diferencia del GFP de GFP-ChsB). Cabe destacar que la acumulación de EglC-GFP-GPI en el RE es homogénea en toda su membrana. En *S. cerevisiae* la acumulación de las PA-GPI en los sitios de salida del retículo (ERES) parece ser independiente a COPII [149]. Específicamente, las mutaciones termosensibles *sec12-4* (Sec12p es la GEF de Sar1) y *sec16-2* (Sec16 se requiere para la organización adecuada de los ERES) no impiden la acumulación de la PA-GPI Cwp2p en puntos intracelulares, presumiblemente ERES. Sin embargo, en la cepa *sarA6* no detectamos acumulación de EglC-GFP-GPI en puntos intracelulares (para ver ERES, marcados con Sec23, ver la Figura R.5A-B). Esta falta de acumulación podría ser debida a altos niveles de expresión de EglC-GFP-GPI bajo el control del promotor *inuA* recién inducido, que saturarían los ERES. Por ello, realizamos el mismo experimento expresando EglC-GFP-GPI con su promotor natural. En este caso, ya que se trata de un promotor constitutivo, era de esperar que parte de EglC-GFP-GPI se encontrara en la superficie celular. Efectivamente, mientras que a temperatura permisiva EglC-GFP-GPI se localizó en *sarA6* como en el wt, a 37°C, EglC-GFP-GPI se encontró, además de en la periferia, marcando las membranas del RE (Figura R.73B). Este marcaje era homogéneo en todo el RE y, por tanto, no existía acumulación en puntos similares a ERES. También probamos el uso del promotor constitutivo *gpdA<sup>mini</sup>* y obtuvimos el mismo resultado que con el promotor natural (Figura R.73C). Estos resultados demuestran que, en ausencia de SarA, EglC-GFP-GPI no es capaz concentrarse en sitios específicos del RE, independientemente de sus niveles de expresión.

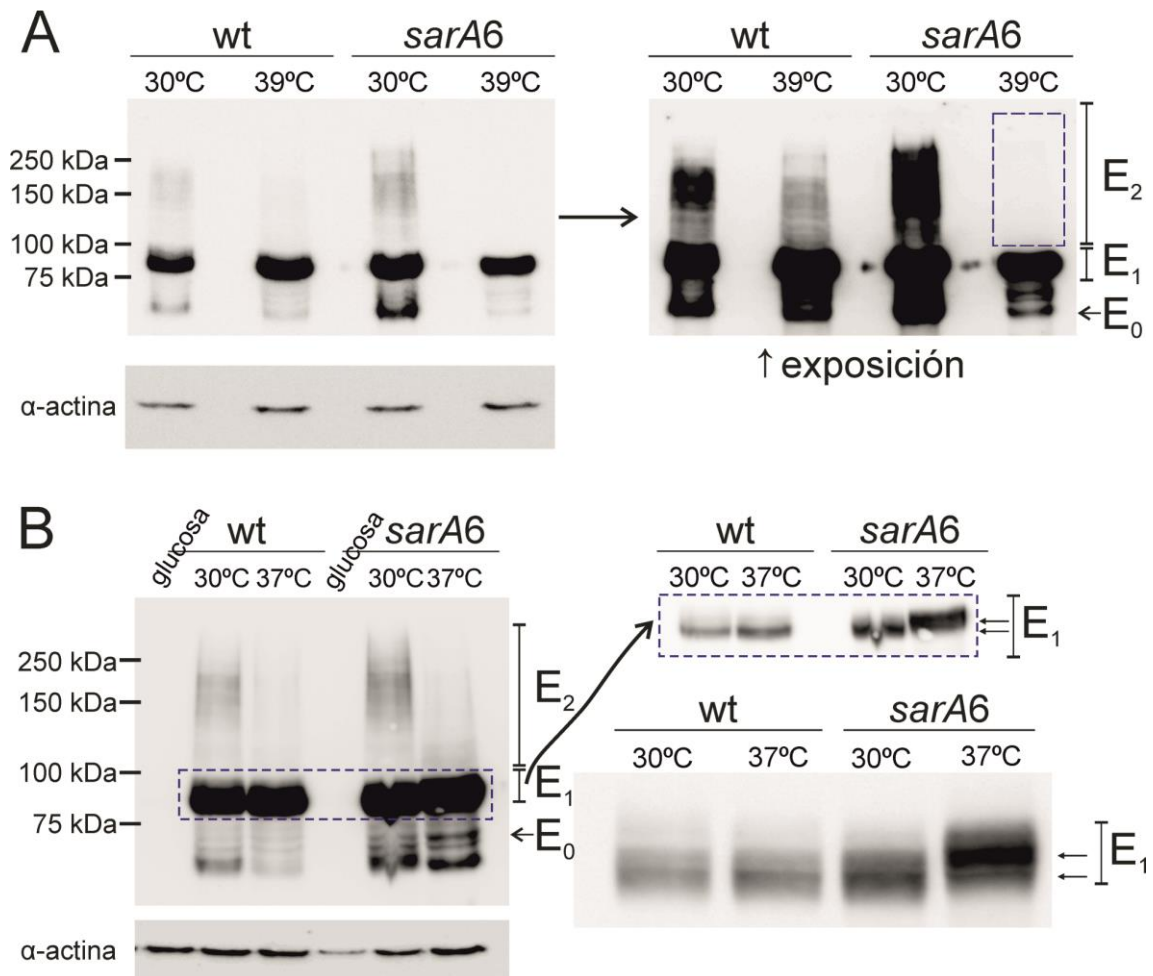
A continuación, estudiamos el patrón electroforético de EglC-GFP-GPI acumulado en el RE en el mutante *sarA6* (Figura R.74). Estos experimentos los hicimos del mismo modo que los anteriormente descritos con InuA-HA (capítulo VI). Brevemente, cultivamos las cepas durante 16 horas en medio con glucosa. Después, cambiamos el cultivo a un medio con sacarosa e incubamos durante 1.5 horas adicionales en las condiciones indicadas en cada caso. En el caso de *sarA6* y su control wt la inducción con sacarosa la hicimos tanto a 30°C como a 39°C. A 30°C, *sarA6* no alteró el patrón de bandas de EglC-GFP-GPI (Figura R.74A). Mientras que en la cepa wt no se detectaron diferencias entre 30°C y 39°C, en el mutante *sarA6* la diferencia fue sustancial, dado que no se detectó el conjunto de especies moleculares E<sub>2</sub> a 39°C. Esto indica que las formas E<sub>2</sub> corresponden a glicosilaciones en el aparato de Golgi (Figura R.74A). En otro experimento, realizado a 37°C, la mutación *sarA6* también alteró el patrón de bandas de E<sub>1</sub> (Figura R.74B). Se detectó un incremento notable de una o más bandas E<sub>1</sub>, minoritarias en la cepa silvestre (Figura R.74B). Dicha(s) banda(s) tiene(n) una movilidad menor que la principal en la cepa wt. ¿Corresponde esta banda a una versión de EglC-GFP-GPI con el GPI no

## Capítulo VII

remodelado? Hipotéticamente *sarA6* podría impedir una remodelación eficiente del GPI y provocar un cambio en la movilidad de EglC-GFP-GPI.



**Figura R.73. Acumulación de EglC-GFP-GPI en el retículo endoplasmático por acción de *sarA6*.** A. EglC-GFP-GPI se encuentra en la superficie celular tanto la cepa wt a 30°C y 37°C como el mutante *sarA6* a 30 °C, Sin embargo, en la cepa *sarA6* a la temperatura restrictiva de 37°C, EglC se acumula en el retículo endoplasmático de manera homogénea. Esta acumulación ocurre tanto después de la inducción de su expresión gracias al locus *inuA*, como con el uso de su promotor natural (B) o del promotor *gpdA*<sup>mini</sup> (C).



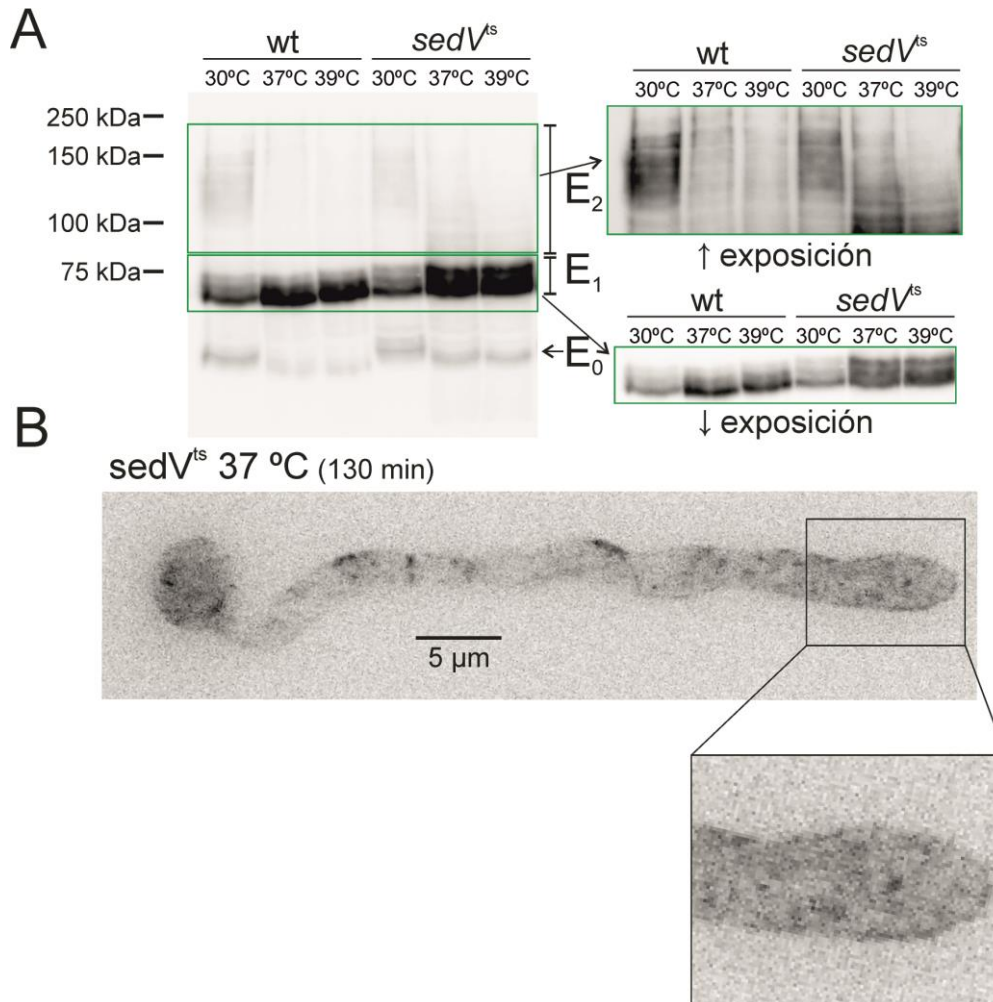
**Figura R.74. Efecto en el patrón electroforético de EglC-GFP-GPI por *sarA6*.** **A.** Experimento de inducción e incubación a 30°C o 39°C. En la derecha se muestra la misma inmunodetección pero con mayor tiempo de exposición. **B.** Como en A pero a 30°C y 37°C y además, con un control de no inducción a 30°C para las cepas wt y *sarA6*. Mientras que no se aprecia efecto en E<sub>3</sub>, hay una alteración clara en E<sub>1</sub>. Arriba a la derecha, se muestra una exposición menor de la misma inmunodetección. Abajo a la derecha, electroforesis diferente con las mismas muestras, utilizando un gel más largo para confirmar el cambio en E<sub>1</sub>.

#### 4.7.7.2. Bloqueo de EglC en estructuras intracelulares por inactivación de SedV (Sed5)

SedV (Sed5p en *S. cerevisiae*) es la t-SNARE del Golgi temprano que se encarga de la recepción de tráfico proveniente del RE [18, 38]. Para averiguar si esta SNARE está involucrada en el tráfico de EglC, determinamos, por microscopía *in vivo* y *western-blot*, la localización y el estado de EglC-GFP-GPI en el mutante termosensible *sedV<sup>ts</sup>*. El *western-blot* de la Figura R.75A ilustra la similitud en el patrón de EglC-GFP-GPI entre la cepa silvestre y el mutante *sedV<sup>ts</sup>* a 30°C, 37°C y 39°C. No obstante, detectamos una ligera diferencia en las regiones E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> a 37°C y 39°C, ya que *sedV<sup>ts</sup>* provoca un aumento relativo de las bandas con mayor movilidad de las especies E<sub>2</sub> y de las bandas con menor movilidad de las especies E<sub>1</sub>. Este resultado indica que existe una reducción en la eficiencia con la que EglC se glicosila en el aparato de Golgi, causada por el déficit de SedV a temperatura restrictiva. Mediante

## Capítulo VII

microscopía observamos que a 37°C, en el mutante *sedV<sup>ts</sup>*, EglC-GFP-GPI no se encuentra en la superficie celular, sino que se acumula en estructuras intracelulares (Figura R.75B). Estos resultados demuestran que SedV se requiere para el tráfico de EglC-GFP-GPI y sugieren que esta proteína se acumula en estructuras con identidad parcial de Golgi, incapaces tanto de avanzar en la ruta como de glicosilar de manera eficiente.

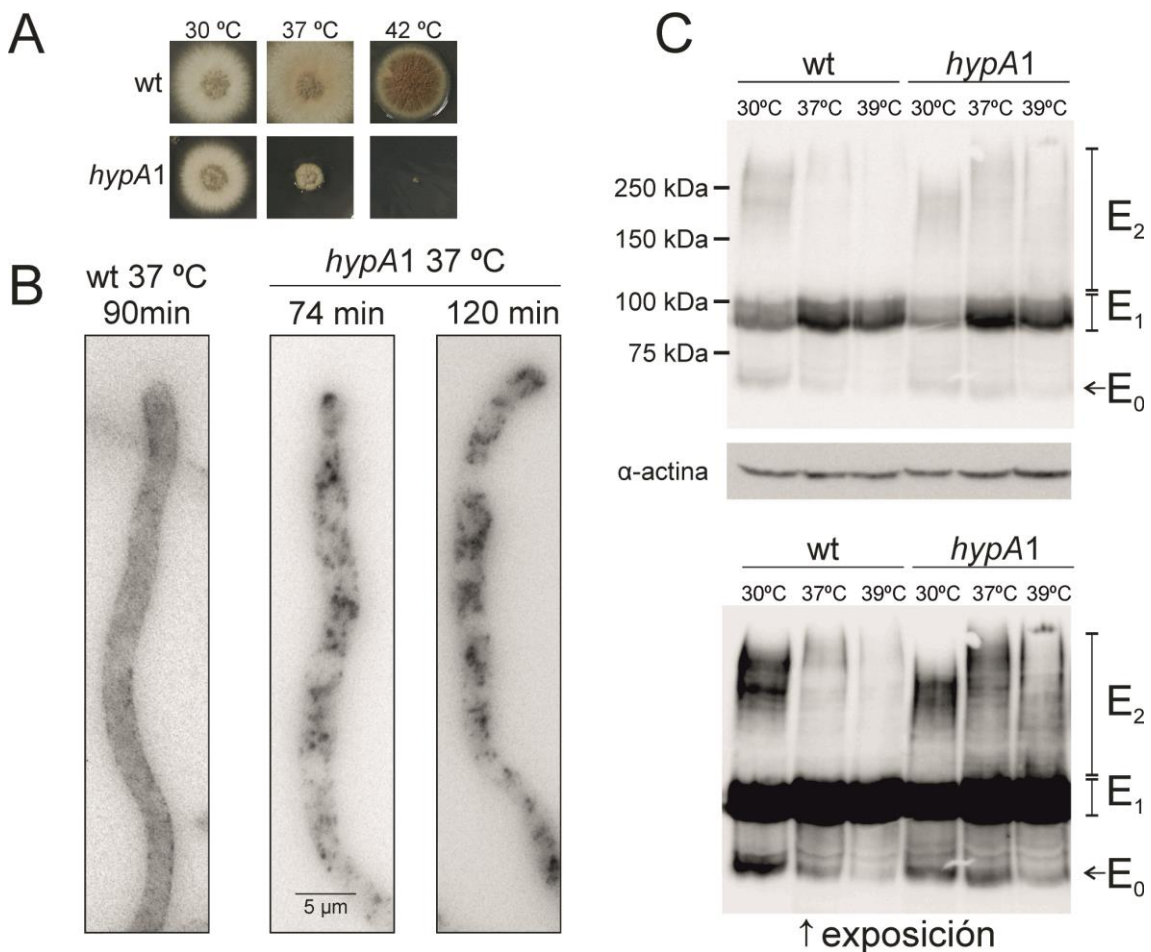


**Figura R.75. EglC-GFP-GPI en *sedV<sup>ts</sup>*.** **A.** Inmunodetección de extractos proteicos de células wt o *sedV<sup>ts</sup>* inducidas con sacarosa durante 1.5 horas a las temperaturas indicadas. El mutante *sedV<sup>ts</sup>* presenta un incremento de las dos bandas superiores de E<sub>1</sub> que sólo ocurre a 37°C y 39°C. A su vez, a estas temperaturas existe un aumento de las bandas inferiores de E<sub>2</sub>. **B.** A 37°C, en el tiempo de inducción indicado, *sedV<sup>ts</sup>* no secreta EglC, si no que lo acumula intracelularmente.

### 4.7.7.3. TRAPPII es necesario para el tráfico de EglC, mientras que RabD (Sec4) regula su distribución en la superficie celular

RabE (Ypt31p / Ypt32p en *S. cerevisiae*, RAB11 en mamíferos) es la GTPasa que regula la salida de vesículas secretoras que desde el TGN se dirigen al Spitzenkörper [36]. Dado que EglC-GFP-GPI se localiza en el Spitzenkörper y parece pasar por el Golgi para viajar a la superficie celular (ver más arriba), nos preguntamos si RabE media la salida de EglC del aparato de Golgi. Para responder a esta pregunta, utilizamos el mutante termosensible de Trs120,

denominado *hypA1* (Figura R.76A). Trs120 es un componente del complejo TRAPP<sub>II</sub>, el cual activa a RabE en el TGN [37]. Mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* y *western-blot* demostramos que *hypA1* impide que EglC-GFP-GPI viaje a la superficie celular (Figura R.76B). De hecho EglC-GFP-GPI se acumuló en estructuras intracelulares, hipotetizamos que correspondiesen a cisternas con identidad de TGN (Figura R.76B). En conclusión, Trs120 es necesario para el transporte de EglC-GFP-GPI a la superficie celular, probablemente porque, al activar a RabE, permite el transporte de EglC-GFP-GPI en vesículas secretoras desde el TGN. Por otro lado, la maduración postraduccional de EglC-GFP-GPI en el mutante *hypA1* fue normal (Figura R.76C).

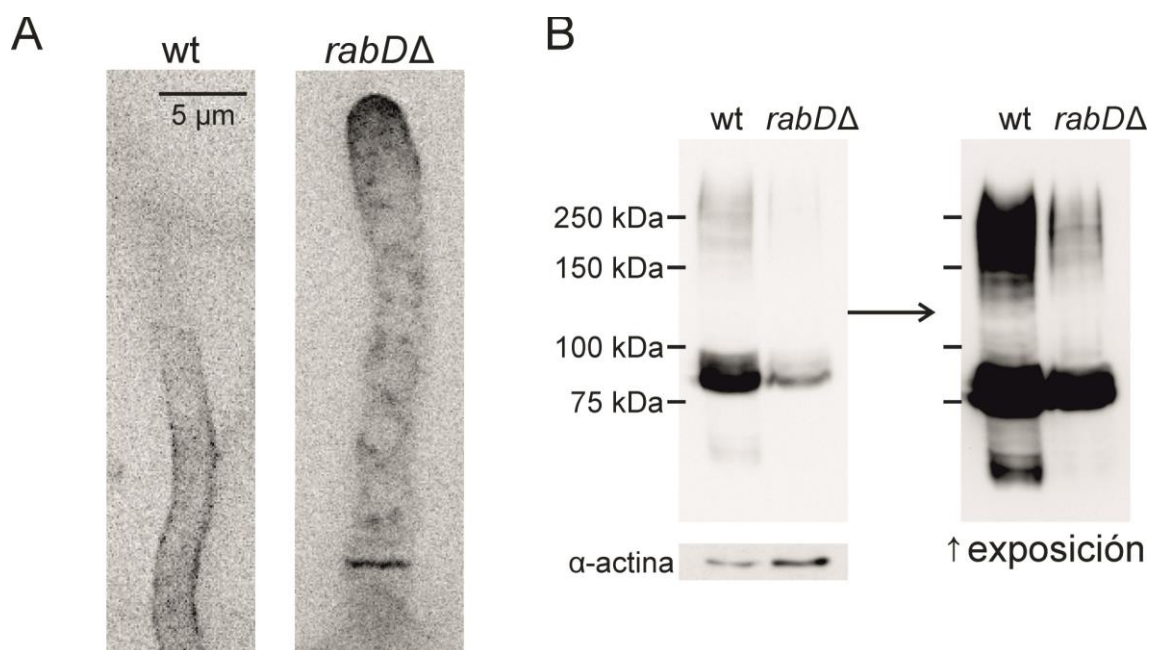


**Figura R.76. Efecto de *hypA1*.** **A.** Test de crecimiento de una cepa *hypA1* en MMA, en comparación con una estirpe wt. **B.** EglC-GFP-GPI expresado en el locus *inuA* en células wt o *hypA1* a 37°C, durante el tiempo indicado de inducción. El mutante *hypA1* no exocita EglC a la superficie celular; sin embargo acumula EglC en estructuras intracelulares. **C.** *Western-blot* anti-GFP para detectar EglC-GFP-GPI en células wt o *hypA1* después de 1.5 h de inducción a las temperaturas indicadas.

*rabD* codifica la GTPasa homóloga de Sec4p en *S. cerevisiae*. Aunque *rabD* no es un gen esencial, es importante para el crecimiento, dado que su delección provoca una reducción del diámetro de las colonias [36]. Sec4p media la fusión de las vesículas de exocitosis con la membrana plasmática, aguas abajo de Ypt32p (RabE) [250]. RabD podría realizar una función

## Capítulo VII

similar a Sec4p, ya que se localiza en los *carriers* exocíticos que se reúnen en el Spitzenkörper, pero no se detecta en el TGN [36], al contrario que RabE. *rabDΔ* no impidió la secreción de EglC-GFP-GPI; sin embargo afectó a su localización en la superficie celular. Mientras que la localización normal es “antipolarizada” a lo largo de las hifas, *rabDΔ* provocó la polarización de EglC-GFP-GPI, de manera que en el mutante predominaba en el casquete polar (Figura R.77A). Es posible que RabD esté implicado en una ruta específica de tráfico exocítico “basolateral” (por analogía con células de mamífero) y que, en ausencia de RabD, EglC viaje por una ruta “directa” a la membrana apical. Alternativamente, EglC podría sufrir, en condiciones wt, una secreción polarizada y que en el mutante *rabDΔ* la pared celular estuviese alterada y se impidiese la difusión de EglC en el periplasma desde la región apical hacia regiones basolaterales. Por otro lado, el mutante *rabDΔ* presentó niveles reducidos de todas las especies moleculares de EglC-GFP-GPI (Figura R.77B). (Ver Discusión para la integración de estos resultados en un modelo de secreción “basolateral”).

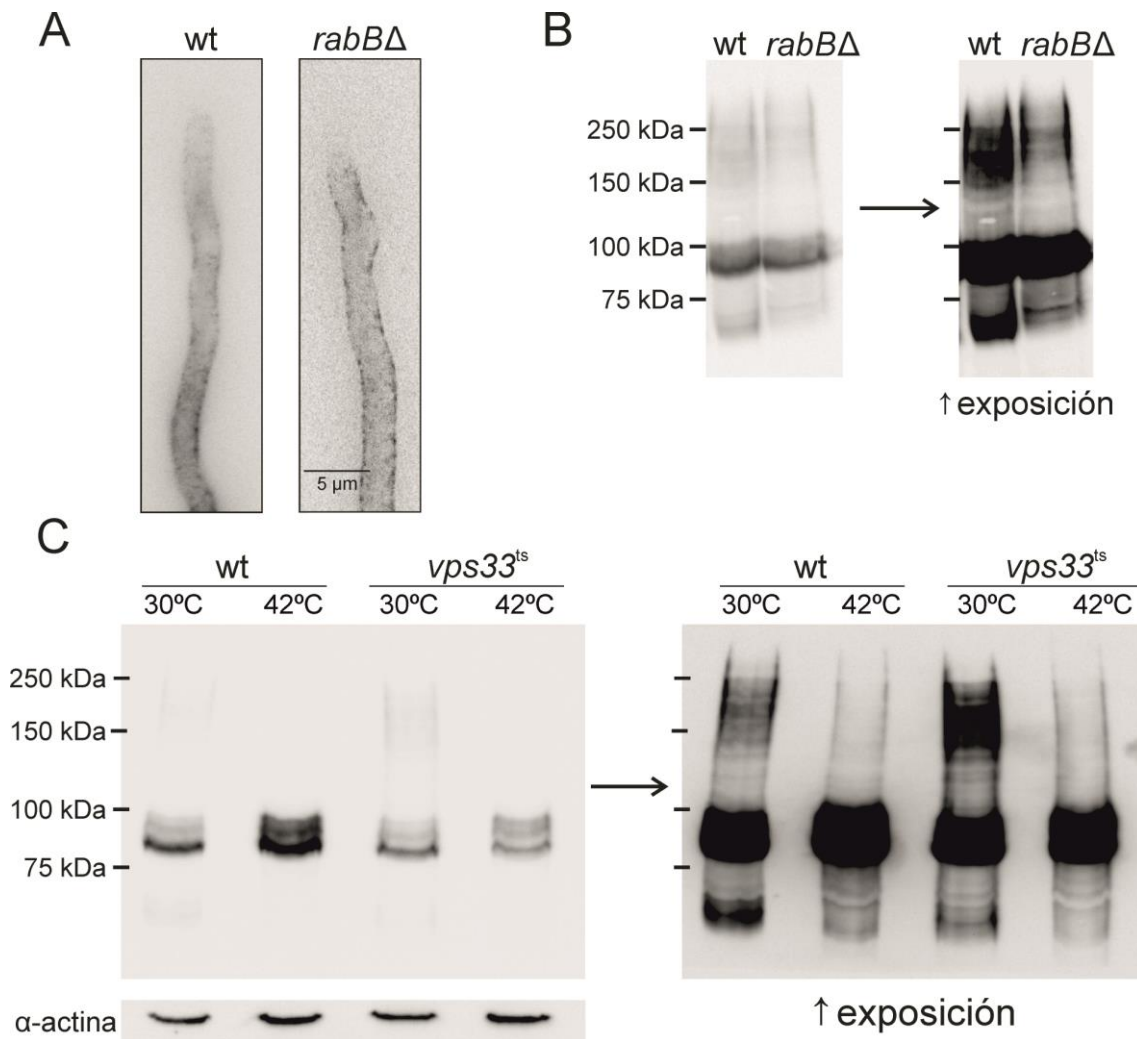


**Figura R.77. Efecto de *rabDΔ* en la distribución y en los niveles de EglC-GFP-GPI. A.** Imágenes de microscopía que ponen de manifiesto el cambio en polaridad de EglC en *rabDΔ*. **B.** Inmunodetección que muestra una reducción específica en los niveles de todas las formas de EglC.

#### 4.7.7.4. EglC no necesita endosomas tempranos funcionales para su exocitosis

Para investigar la posibilidad de que, como en el caso de InuA (capítulo VI), los endosomas estuviesen implicados en el tráfico de EglC utilizamos las dos mismas mutaciones que afectan a la función de los endosomas y a su maduración, *rabBΔ* [164] y *vps33<sup>ts</sup>* [167], y que impiden la secreción de inulinasa (Figura R.65). El mutante *rabBΔ* no impidió el tráfico de

EglC-GFP-GPI ni alteró su maduración postraduccional (Figura R.78A-B). Por otro lado *vps33<sup>ts</sup>*, no afectó el patrón electroforético de EglC-GFP-GPI, ni a 30°C ni a 42°C (Figura R.78C). Estos resultados indican que la función endosomal no se necesita para la secreción de EglC, lo que constituye una diferencia de gran importancia con la secreción de InuA, que necesita la función de RabB y Vps33, y sugiere que InuA y EglC siguen rutas de exocitosis diferentes.



**Figura R.78. *vps33<sup>ts</sup>* y *rabBΔ* no afectan a EglC-GFP-GPI.** **A.** Células *rabBΔ* y *wt*, tras 2.5 horas de inducción de la expresión de EglC-GFP-GPI con sacarosa. La localización de EglC es indistinguible en ambas cepas. **B.** Inmunodetección de EglC-GFP-GPI en una cepa *wt* y otra *rabBΔ*. La imagen de la derecha es una mayor exposición de la misma inmunodetección. **C.** Como en B para *vps33<sup>ts</sup>*. No hay diferencias entre la cepa silvestre y la mutante.



# **DISCUSIÓN**



---

## 5.1. Bloqueo condicional del tráfico de vesículas COPII y localización de COPI

En el primer periodo de esta tesis seleccionamos alelos termosensibles de SarA<sup>Sar1</sup>, la GTPasa que controla la formación de vesículas COPII. Para la obtención de los mutantes, generamos, por mutagénesis al azar, una mutateca de alelos de *sarA* con la que transformamos *Aspergillus nidulans* para seleccionar un total de 8 mutantes termosensibles, con el objetivo de inactivar condicionalmente SarA. Únicamente existían mutantes termosensibles de esta GTPasa en *S. cerevisiae* [251], las cuales muestran una actividad de intercambio de GTP reducida a todas las temperaturas [252]. En nuestro caso, hemos determinado que los niveles de proteína SarA en los mutantes utilizados disminuyen con el incremento de temperatura, lo que sugiere que las mutaciones inducen defectos en el plegamiento de SarA, provocando su degradación.

La inactivación de SarA causa la parada de la extensión apical, tal como se ha observado en numerosos mutantes condicionales que bloquean la ruta secretora [18, 37, 167]. También provoca la desorganización de los sitios de salida del retículo (ERES) y el bloqueo de los *cargos* InuA y EglC en el retículo endoplasmático (RE), lo que confirma el bloqueo del tráfico COPII. Por lo tanto, hemos desarrollado una herramienta genética para bloquear de manera condicional el proceso de formación de las vesículas COPII y, por ende, el tráfico del RE al aparato de Golgi.

La desorganización de los ERES en los mutantes *sarA6* y *sarA8* conlleva la formación de grandes agregados que contienen la subunidad de COPII Sec23. Otros autores han visualizado agregados similares al bloquear la formación de las vesículas COPII. En concreto, estos autores utilizaron mutantes termosensibles de *SEC12* y *SEC16* en *S. cerevisiae* [19] (Sec12p es la encargada de activar a Sar1 [64] y Sec16p es necesaria para la organización de los ERES [59]), así como la droga cerulenina, que inhibe de la síntesis de ácidos grasos [19]. Estos agregados también se forman en mamíferos: en células de *Drosophila* en cultivo, la inactivación de Sar1 provoca la agregación de Sec16 en ERES inusualmente grandes [20]. Sin embargo, existen mutantes que bloquean la salida del RE y no forman estos agregados [143, 253]. Por tanto, la formación de estos agregados es un efecto causado por algunos bloqueos específicos de la salida del RE. Los ERES contienen múltiples complejos COPII, que interaccionan entre sí a través de la proteína Sec16 [59]. La relación estequiométrica entre las subunidades de COPII y Sec16 en los ERES determina la organización de éstos [59]. Una posibilidad para explicar la formación de los grandes agregados es que ciertos bloqueos de la salida del RE provoquen un desequilibrio de los componentes de los ERES, causando el colapso del sistema y la agregación de sus elementos.

### 5.2. Potencial morfogenético de la regulación de la salida del RE

Nuestros datos muestran que tras el bloqueo de la salida del RE la extensión apical se detiene y que el déficit en la eficiencia de la salida del RE, si se mantiene en el tiempo, causa defectos morfogenéticos acusados, dando lugar a la formación de grandes globos apicales de ~10  $\mu\text{m}$  de diámetro (unas 7 veces el ancho normal de una hifa). Estas estructuras presentan una pared celular engrosada, una gran vacuola, numerosos núcleos y abundante RE. Los globos recuerdan a diversas estructuras de hongos filamentosos formadas por la hifas, en condiciones naturales: las esporas holoblásticas [254], los apresorios que desarrollan ciertos patógenos de plantas [255] y las clamidosporas que se forman en la región apical de las hifas de *Candida albicans* [256]. Al igual que los globos formados por *sarA6* y *sarA7*, las clamidosporas de *C. albicans* tienen una pared engrosada, abundante RE y una gran vacuola [257].

En *A. nidulans* el mutante *mnrA455*, y dos alelos mutantes de *choC* (*choC3* y *choCΔ*) también forman globos apicales [258-260]. *mnrA455* es una mutación termosensible de una fosfomanomutasa ortóloga de Sec53 [258]. La inactivación de Sec53 bloquea la salida de *cargo* del RE [261] y, por tanto, *mnrA455* podría provocar el mismo efecto. En relación al gen *choC*, éste codifica una metil-transferasa de fosfolípidos, implicada en la síntesis de fosfatidil-colina [259, 260]. Como se ha comentado antes, la inhibición de la síntesis de ácidos grasos con cerulenina desorganiza los ERES e impide la salida de *cargo* del RE [19]. Las mutaciones en *choC* podrían inhibir síntesis de fosfatidil colina y, por tanto, causar el mismo efecto que la cerulenina, esto es bloquear la salida del RE. Por tanto el mutante *mnrA455* y los dos alelos mutantes de *choC* forman globos apicales quizá mediante el bloqueo de la salida del RE, del mismo modo que *sarA6* y *sarA7*.

En conjunto, toda esta información pone de relieve el potencial morfogenético de la regulación del tráfico de salida del RE y sugiere que los cambios morfológicos que ocurren en el desarrollo de los hongos filamentosos se regulan, en cierta medida, por modulación de la exocitosis, mediante el control de la eficiencia del transporte dependiente de COPII.

### 5.3. Modelo de maduración de cisternas

Tan sólo 10-30 minutos después de la inactivación de SarA el aparato de Golgi se desorganiza. Esta desorganización la hemos visualizado por microscopía de fluorescencia *in vivo*, al observar proteínas tanto periféricas (CopA, subunidad esencial de COPI, y PH<sup>OSBP</sup>, que reconoce Arf1 y PtdIns4P) como integrales de membrana (las t-SNAREs del Golgi SedV y TlgB). Hemos demostrado que el aporte continuo de membranas desde el RE al Golgi es una

condición indispensable para la organización y el mantenimiento de este último. Estos resultados son difíciles de reconciliar con el modelo de cisternas estables, que propone que las cisternas del Golgi son compartimentos permanentes que reciben y envían el *cargo* sin alterarse en gran medida. Por el contrario, sugieren que el aparato de Golgi es un orgánulo transitorio y dinámico, cuyo mantenimiento depende de la entrada de membrana y proteínas desde el RE. Esta conclusión es consistente con el modelo de maduración de cisternas, según el cual las nuevas cisternas del aparato de Golgi se forman por coalescencia de múltiples vesículas COPII, mientras que las cisternas más ‘tardías’ se descomponen en vesículas secretoras [21, 88, 262]. En concordancia con los datos de esta tesis, en células de mamífero se ha detectado la desorganización del aparato de Golgi tras la expresión de una forma inactiva de Sar1 [45].

Al inactivar *sarA6*, el Golgi temprano y el TGN se desorganizan de manera distinta: las membranas del Golgi temprano se reabsorben por el RE y las cisternas del TGN se disipan. Este resultado es consistente con el hecho de que el Golgi temprano y el Golgi tardío o TGN presentan diferencias composicionales y funcionales [22, 23]. En el estudio anteriormente mencionado, en el que visualizan la desorganización del Golgi en células de mamífero al expresar una forma inactiva de Sar1 [45], los autores observan que el Golgi se reabsorbe completamente por el RE. Sin embargo sólo utilizan marcadores de *cis*-Golgi (p58, GRASP65 y GM130) y, por tanto, no determinan el destino de las membranas del TGN. La reabsorción del Golgi temprano por el RE descrita en esta tesis es consistente con que, en condiciones normales, exista un equilibrio dinámico entre el tráfico del RE al Golgi mediado por COPII y el transporte retrógrado del Golgi al RE realizado por COPI. Según esta interpretación, una vez inactivado SarA el tráfico COPII se detiene y el transporte retrógrado de COPI envía las membranas y las proteínas del Golgi temprano al RE, donde se acumulan. Por otro lado, el hecho de que el TGN no se reabsorba por el RE al inactivar SarA muestra que COPI no es capaz de enviar las membranas del TGN al RE. Esto concuerda con la observación de que la subunidad  $\alpha$  de COPI, denominada CopA, se localiza en el Golgi temprano. La localización preferente de COPI en *S. cerevisiae* también es el Golgi temprano [27, 263, 264]. Además, HypB no es necesaria para reclutar a CopA al Golgi, lo que refuerza el hecho de que CopA no reside, en el estado estacionario, en el TGN (HypB activa a Arf1 específicamente en el TGN y Arf1 es la GTPasa que recluta a COPI). Estas observaciones sugieren que existe cierta independencia funcional entre COPI y el TGN. En un reciente trabajo, Glick y colaboradores estudian la función de COPI y proponen que no realiza un transporte retrógrado desde el TGN [27]. Según estos autores, COPI únicamente realiza transporte retrógrado en del Golgi temprano, al menos en *S. cerevisiae*. Estos autores proponen que las vesículas de clatrina/AP-1 son las encargadas del transporte retrógrado en el Golgi tardío (TGN). De hecho AP-1 está involucrado en la localización en el TGN de un gran número de proteínas, como Tlg1p, Drs2p, Chs3p, Pin2p y Kex2p [265-269]. Aunque se ha interpretado que el adaptador AP-1 media rutas de reciclaje

desde los endosomas tempranos, también podría realizar tráfico intra-Golgi, ya que se localiza en el Golgi tardío [270]. En conclusión, la desorganización asimétrica del aparato de Golgi por inactivación de SarA y la localización mayoritaria de COPI en el Golgi temprano, junto con otras investigaciones [27], son consistentes con la idea de que COPI no es esencial para el tráfico retrógrado desde el TGN.

### 5.4. Caracterización general de la familia Arf/Sar y de sus reguladores

Mediante el análisis sistemático de las GTPasas de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras GEFs y GAPs hemos identificado y clasificado, en *A. nidulans*, los integrantes de dichas familias y estudiado su nivel de conservación. Además, hemos realizado las deleciones simples de sus genes para determinar el posible papel esencial de cada proteína. En primer lugar, identificamos 7 GTPasas y fuimos capaces de encontrar los homólogos correspondientes en *S. cerevisiae* y en humanos, excepto en un caso. Es notable la gran conservación que presentan estas proteínas. De las 7 GTPasas, tres de ellas resultaron ser esenciales para el crecimiento de *A. nidulans*: SarA, que funciona en el RE; ArfA, la GTPasa principal del aparato de Golgi; y Arl2. En concordancia con estas observaciones, los homólogos de SarA y ArfA en *S. cerevisiae* y en humanos realizan funciones esenciales [60, 201, 271]. En humanos, existen dos isoformas de Sar1 (Sar1A y Sar1B) y determinadas enfermedades en el metabolismo de lipoproteínas, incluyendo la enfermedad conocida como *chylomicron retention diseases* o enfermedad de Anderson, son causadas por mutaciones en Sar1B [271]. Sin embargo, el homólogo de Arl2 en *S. cerevisiae*, Cin4p, no es esencial [125]. En humanos, sus ortólogos se denominan ARL2 y ARL3 y participan en el transporte de proteínas en las células fotorreceptoras [126] y mutaciones en *ARL3* provocan retinitis pigmentosa [127]. En *S. cerevisiae*, Cin4 realiza funciones relacionadas con microtúbulos [125, 272]. Los microtúbulos en *S. cerevisiae* no participan en la ruta secretora; sin embargo, en *A. nidulans* los microtúbulos son esenciales para mantener un crecimiento por extensión apical eficiente, al colaborar con los cables de actina [36]. Hipotéticamente, la GTPasa Arl2 de *A. nidulans* podría reclutar efectores a las membranas del Golgi que mediasen la interacción con microtúbulos.

Por otra parte también hemos identificado y delecionado los genes que codifican las proteínas reguladoras de estas GTPasas, es decir sus GEFs y sus GAPs correspondientes. Pese a existir un grado de conservación suficiente como para asignar los homólogos en otras especies, existe una mayor divergencia en estas GEF que en las GTPasas Arf/Sar que activan. De las 5 GEF halladas, 2 de ellas son esenciales: Sec12, que activa a SarA en el RE (Ignacio Bravo

Plaza, sin publicar); GeaA, la GEF del Golgi temprano y HypB, su equivalente en el TGN. En *S. cerevisiae*, las proteínas homólogas de estas tres GEFs son también esenciales [203, 273].

Finalmente, de un total de 5 GAPs identificadas y delecionadas, solamente la codificada por AN1931 (Age1a) es esencial. Syt1b y Glo3 se requieren para la esporulación a alta temperatura y la deleción de *gcs1* no presenta defecto alguno en el crecimiento. Las proteínas GAPs de Arf/Sar están menos conservadas que las GEFs. De acuerdo con este hecho, existe una divergencia en sus funciones, al menos en la función de Gcs1. En *S. cerevisiae* Gcs1p se requiere para el tráfico de Snc1 a la membrana plasmática; sin embargo, el ortólogo en *A. nidulans* no es necesario para la localización de SynA, ortólogo de Snc1 (Figura R.27).

La identificación de las GTPasas de la familia Arf/Sar y de sus GEFs y GAPs supone la clasificación más detallada de estas proteínas en el género *Aspergillus*. Las características de estas GTPasas compartidas con sus posibles ortólogos en *S. cerevisiae* y humanos ponen de manifiesto el alto grado de conservación de estos interruptores moleculares. La deleción de los genes que las codifican mostró una alta proporción de genes esenciales, la mayoría de los cuales también realizan funciones esenciales en *S. cerevisiae* y en humanos, indicando la conservación de sus funciones en eucariotas.

### 5.5. GeaA1 mantiene el crecimiento en ausencia de HypB

El Golgi temprano y el TGN comparten una misma GTPasa reguladora, Arf1. Sin embargo, existe una GEF de Arf1 específica para el Golgi temprano (**GeaA/Gea1/GBF** en *A. nidulans*/*S. cerevisiae*/mamíferos) y otra específica para el TGN (**HypB/Sec7/BIG**). Estas GEFs presentan alto grado de conservación en eucariotas [130]. GeaA y HypB son proteínas esenciales para el crecimiento. En este trabajo hemos aprovechado la existencia de un alelo termosensible de *hypB* (*hypB5*) para buscar mutaciones extragénicas que permitiesen el crecimiento de la cepa *hypB5* a 42°C, mediante mutagénesis con ultravioleta. De un total de 40 clones revertientes capaces de crecer a 42°C, 39 de ellos tenían mutaciones adicionales en *hypB*, mientras que uno presentaba el alelo *hypB5* intacto, por lo que lo seleccionamos. Tras el mapeo genético descubrimos que este clon tenía una mutación en *geaA* (alelo *geaA1*) que, como demostramos, es la causante de la supresión. Esta mutación provoca la sustitución Tyr1022Cys en GeaA. Tyr1022 está localizada en un motivo conservado Ser- $\Omega$ - $\phi$ , presente en la subfamilia Gea/GBF (donde  $\Omega$  es un aminoácido aromático y  $\phi$  un residuo hidrofóbico). El alelo *geaA1* también revierte la letalidad resultante de *hypB* $\Delta$ . *geaA1* es hipomorfo, ya que una cepa *geaA1* crece peor que una cepa silvestre. Esto sugiere que la capacidad de GeaA1 de suplir HypB ocurre a expensas de su función fisiológica. Hemos demostrado que Tyr1022Cys induce un cambio en la distribución subcelular de GeaA1 (Figura R.30). Este cambio parece reflejar su

## Discusión

---

desplazamiento hacia fases posteriores de la ruta secretora ya que GeaA1 se redistribuye, en parte, a la membrana apical, donde las vesículas exocíticas se fusionan preferentemente [12]. El cambio en la localización podría reflejar una dinámica alterada del Golgi, que resultase en el desvío de una parte de GeaA1 a la membrana plasmática. Alternativamente, la sustitución Tyr1022Cys podría provocar, directamente, un reclutamiento anormal de GeaA1 a la membrana plasmática, en cuyo caso el cambio en localización *per se* provocaría la supresión. En esta línea, una posibilidad altamente especulativa sería que GeaA1 reorganizase la ruta exocítica de tal modo que se evitase el paso del *cargo* por el TGN. De hecho, existe un precedente de reorganización de la ruta secretora por manipulación de un ortólogo de GeaA, en casos de infección vírica [274].

En el capítulo V, investigamos el efecto de GeaA1 sobre el tráfico de la quitina sintasa ChsB, y descubrimos que GeaA1 es capaz de restaurar la localización normal de ChsB en la membrana apical en un fondo genético *hypB5*. En este experimento, en el que GeaA1 estaba marcado con GFP, comprobamos que mCherry-ChsB y GeaA1-GFP no colocalizan en las cisternas intracelulares en el fondo *hypB5*. Dado que GeaA1 se localiza, además de en la membrana apical, en el Golgi temprano y, en este experimento, no colocaliza con ChsB, ChsB debe de localizarse en el TGN, como en una cepa silvestre. Este resultado parece poco compatible con un mecanismo de supresión que evite el paso del *cargo* (como ChsB) por el TGN, ya que ChsB se localiza en él cuando se inactiva HypB en presencia de GeaA1. También argumenta en contra de que GeaA1 medie un reciclaje de ChsB desde la membrana plasmática a través del Golgi temprano, a no ser que el tiempo de estancia de ChsB en éste fuese tan corto que la hiciese indetectable.

Por otro lado, Tyr1022Cys provoca un ligero incremento en la localización de GeaA1 en el TGN (Figura R.31B), incremento que se hace más patente tras el tratamiento con Brefeldina A. Además, las deleciones de *arl1* y de *arl3*, cuyos productos son GTPasas del TGN, reducen la capacidad de supresión de *geaA1* (Figura R.33). En *S. cerevisiae*, Arl3p recluta a Arl1p al TGN [121, 209] y, a su vez, Arl1p, Gea2p (ortóloga de GeaA) y Drs2p forman un complejo en la membrana del Golgi [124]. Por tanto, en *A. nidulans*, es posible que Arl1 y Arl3 estén implicados en el reclutamiento de una parte de GeaA al TGN, lo que podría facilitar la supresión. Estos resultados, en conjunto, sugieren que el mecanismo de supresión implica la acción de GeaA1 en el TGN, donde hipotéticamente podría activar a Arf1 y facilitar, aunque algo ineficientemente, el funcionamiento de la ruta secretora en ausencia de HypB. De acuerdo con esta hipótesis, GeaA1 sería capaz de desarrollar las funciones esenciales de HypB en el TGN y, por tanto, ambas GEF serían, hasta cierto punto, intercambiables.

Con los datos de que disponemos actualmente, sólo podemos especular sobre el mecanismo por el cual Tyr1022Cys cambia la localización de GeaA1. La sustitución podría

alterar la interacción del motivo Ser- $\Omega$ - $\phi$  con un adaptador de reciclaje retrógrado que hipotéticamente se requiriese para relocalizar GeaA en el Golgi temprano durante el proceso de maduración cisternal. Esto implicaría que si GeaA1 se reciclase de un modo ineficiente e invadiese el TGN, debería viajar rápidamente con las vesículas de exocitosis, ya que sólo hemos detectado un pequeño incremento en la localización de GeaA1 en el TGN. Una alternativa un poco diferente sería que GeaA residiese en el Golgi temprano por detección simultánea de varios tipos moleculares como, por ejemplo, un tipo de lípido y Arf1. La sustitución Tyr1022Cys eliminaría la detección de una de estas moléculas, lo que causaría una localización de GeaA1 más amplia. A este respecto, un fragmento del ortólogo de GeaA de mamíferos, GBF1, que contiene el motivo Ser- $\Omega$ - $\phi$ , interacciona *in vitro* con el fosfolípido PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y permite la localización de GBF1 en la membrana plasmática [275]. Por tanto, el motivo Ser- $\Omega$ - $\phi$  podría ser necesario para la interacción de GeaA con lípidos. El hecho de que una sustitución en GeaA permita el crecimiento fúngico en ausencia de HypB es de gran importancia, ya que GeaA y HypB son las dos únicas GEFs del aparato de Golgi esenciales para el crecimiento (capítulo II). En cualquier caso, en el futuro será necesario investigar en profundidad el mecanismo molecular por el que Tyr1022Cys relocaliza GeaA1.

### **5.6. Cartografiado del tráfico de tres cargos de la ruta secretora: ChsB, InuA y EglC**

En la última parte de esta tesis investigamos el tráfico de tres proteínas diferentes. En primer lugar, estudiamos la proteína integral de membrana ChsB, una quitina sintasa encargada de la síntesis de quitina en el proceso de construcción de nueva pared celular. Previamente se había demostrado que esta enzima se localiza exclusivamente en la región apical de la membrana plasmática de las hifas. El segundo *cargo* que investigamos es una enzima exoglucanasa, EglC, que se encuentra unida a membrana por un anclaje de glicosil fosfatidil inositol (GPI). Las proteínas ancladas a GPI (GPI-AP) circulan por una ruta de exocitosis que, en levaduras y mamíferos, presenta diferencias con otros tipos de *cargo* [2, 31, 145]. En tercer lugar, investigamos la secreción de una enzima soluble, cuya expresión se encuentra regulada. Se trata de la inulinasa InuA. En *S. cerevisiae* se habían descrito diferencias en las rutas de exocitosis para enzimas solubles, las PA-GPI y proteínas transmembrana [29-33]. Además, existía evidencia adicional en mamíferos de que las rutas de exocitosis de distintos tipos proteicos divergen [34, 35]. En resumen, tratamos de responder a la siguiente pregunta: ¿existen diferentes rutas de exocitosis para proteínas con diferente estructura y función fisiológica? Al final de este apartado, se trata de dar una respuesta razonada a la pregunta, a la luz de los resultados de esta tesis.

### 5.6.1. La ruta de reciclaje endocítico de ChsB

ChsB participa en la síntesis de la pared celular en los sitios de crecimiento polarizado [28]. Las quitinas sintetas actúan en la membrana plasmática y utilizan uridina-difosfo-N-acetilglucosamina citosólica como sustrato para sintetizar quitina, la cual se deposita en la pared celular a medida que se sintetiza, a través de un conducto que atraviesa la membrana plasmática y que forma la propia quitina sintasa [276]. Como proteínas integrales de membrana, viajan embebidas en la membrana de las vesículas secretoras y son transferidas a la membrana plasmática allí donde dicha vesícula se fusiona por exocitosis. En los hongos filamentosos *A. nidulans*, *Neurospora crassa* y *Ustilago maydis* las vesículas secretoras se fusionan con la membrana apical [17, 36, 277]. Sin embargo, dicha exocitosis apical no sería capaz, *per se*, de generar la polaridad que ChsB y otras proteínas de membrana presentan [28, 161], ya que cualquier proteína integral de membrana, una vez en la membrana plasmática, difundiría rápidamente en la bicapa lipídica en sentido basípeto. Esta difusión alteraría la localización de ChsB y el resto de proteínas polarizadas.

Valdez-Taubas y Pelham demostraron que la polarización inicial que se da por exocitosis localizada se puede mantener si las proteínas se endocitan antes de que la difusión elimine la polarización [32]. Estas proteínas de membrana, una vez endocitadas, se envían de nuevo a la membrana plasmática en un proceso conocido como reciclaje endocítico [32]. Investigaciones posteriores demostraron que en *A. nidulans* la maquinaria endocítica predomina en un anillo subapical, cuya disposición delimita la localización de las proteínas de membrana que están polarizadas en la región apical de las hifas [12, 177, 218]. La v-SNARE SynA y la flipasa DnfA son dos ejemplos bien estudiados de proteínas que se mantienen polarizadas gracias a la endocitosis. De hecho, se ha demostrado que mutaciones específicas en *synA* [38] y en *dnfA* [161] provocan la pérdida total de polarización de SynA y DnfA, ya que previenen su endocitosis. Con estos datos, hipotetizamos que la polarización de las enzimas modificadoras de la pared celular en la región apical estaría mediada por reciclaje endocítico. En este trabajo hemos demostrado que la localización de ChsB en la membrana plasmática se encuentra restringida a la región anterior al anillo de endocitosis y que la inhibición de la endocitosis provoca la pérdida de polarización de ChsB, lo que es consistente con su reciclaje endocítico. De hecho, hemos demostrado que, en lugar de reciclar directamente desde endosomas [41], ChsB viaja a las cisternas del TGN, donde permanece alrededor de 1 minuto a 28°C para, posteriormente, ser reenviada a la membrana plasmática. El hecho de que la inactivación de HypB (Sec7p en *S. cerevisiae*) provoca que ChsB se acumule en estructuras internas con identidad de TGN, sumado a que dicho efecto no ocurre en una cepa *geaA1*, constituye la demostración definitiva de que ChsB viaja por esta ruta de reciclaje indirecto, a través del TGN (ver modelo en Figura D.1).

¿Qué ruta sigue ChsB para volver desde el TGN a la membrana plasmática? En *A. nidulans*, se conoce la formación de vesículas secretoras a partir de las membranas del TGN. Este proceso ocurre tras la activación y el reclutamiento de RabE al TGN por parte del complejo TRAPPII [36, 37]. En esta tesis hemos determinado que la inactivación de Trs120, un componente esencial de TRAPPII, provoca la relocalización de ChsB desde la membrana apical a estructuras internas. Este hecho demuestra que TRAPPII es necesario para el tráfico de ChsB a la membrana plasmática y sugiere que ChsB viaja a la membrana plasmática por la ruta dependiente de RabE, lo que es consistente con el conocido papel de los ortólogos de RabE en el reciclaje endocítico [278-281]. Sin embargo, en *N. crassa* las quitina sintasas se asocian con una población de vesículas que se encuentran en la parte central del Spitzenkörper [222]. Esta región central no contiene YPT-31 (RabE en *A. nidulans*), que por el contrario se asocia con la región periférica del Spitzenkörper, sino que es rica en YPT-1 (RabO). *A. nidulans* podría diferir de *N. crassa* en esta característica en particular, dado que RabE parece encontrarse en todo el Spitzenkörper [36]. Al igual que en *N. crassa*, en *A. nidulans* RabO también se encuentra en el Spitzenkörper [18], donde colocaliza con ChsB (Figura R.49A). De hecho, la inactivación de RabO deslocaliza rápidamente ChsB de la membrana plasmática y la mutación *rabO<sup>ts</sup>* presenta una interacción sintética negativa con el alelo *gfp-chsB*. Hipotéticamente RabO y RabE podrían colaborar en el tráfico de ChsB a la membrana plasmática. De hecho, los ortólogos de RabO y RabE en *S. cerevisiae*, Ypt1p e Ypt31p respectivamente, cooperan para regular Sec7p (HypB en *A. nidulans*) en el TGN [133].

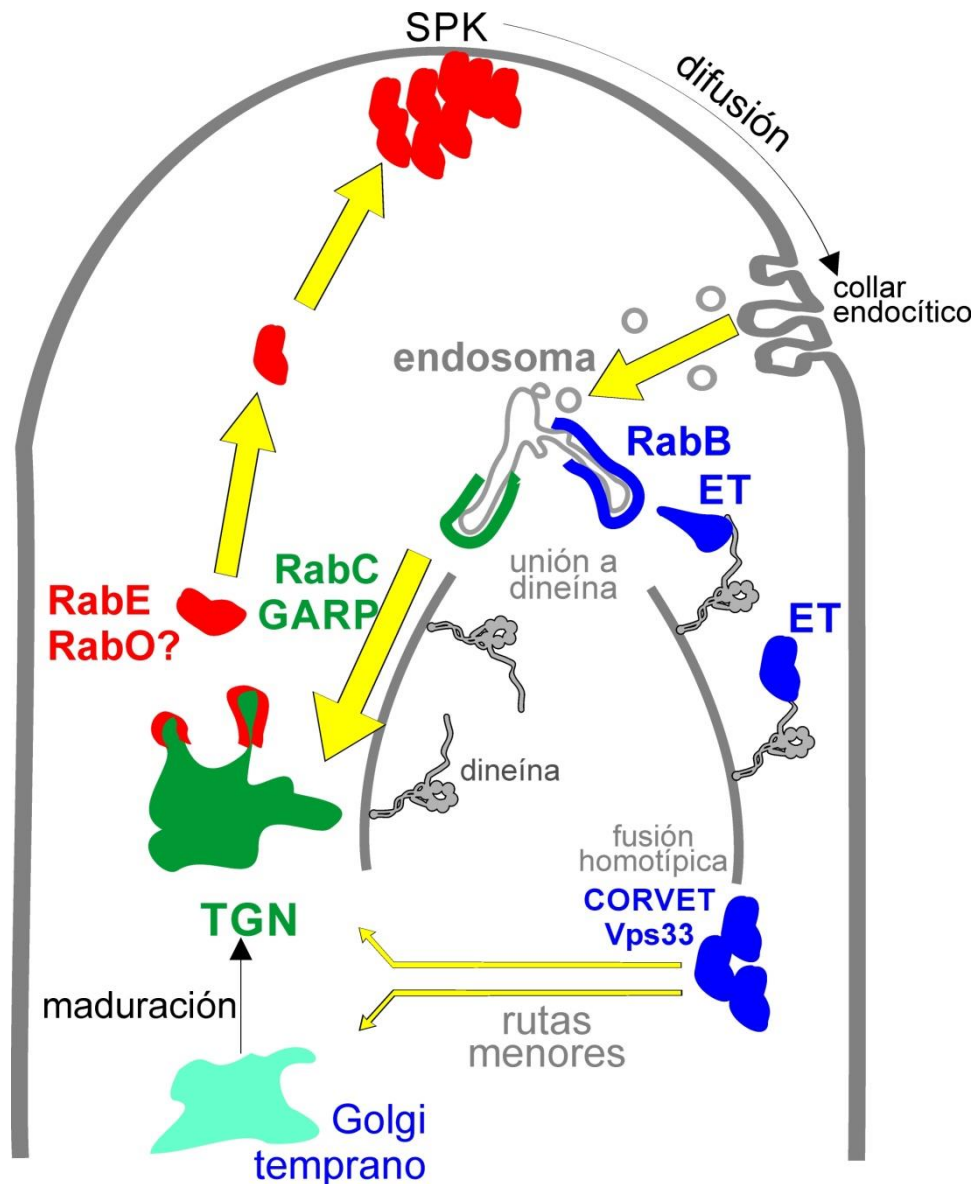
### 5.6.1.1. El requerimiento de dineína

La inactivación de la dineína provoca la acumulación de ChsB en un compartimento membranoso que se marca con FM4-64 poco tiempo después de la adición de este trazador de endocitosis (Figura R.44B). Esta observación nos lleva a concluir que existe un compartimento endosomal por el cual transita ChsB en su viaje al TGN desde la membrana plasmática (Figura D.1). Los endosomas tempranos, que contienen y requieren RabB (RAB5 en mamíferos) para funcionar, se alejan del ápice utilizando dineína [173]; sin embargo, es improbable que la “ruta RabB” medie el reciclaje de ChsB porque la localización de ChsB no está alterada en el mutante *rabBΔ* (Figura R.51). Este resultado sugiere que ChsB transita por membranas endosomales que están aguas arriba de los endosomas tempranos (= “endosomas RabB”).

Por otro lado, en ausencia de dineína funcional los endosomas tempranos se acumulan en la misma región subapical donde se concentra ChsB [156, 226, 282-285]. Proponemos la existencia de un endosoma de *sorting* que contenga al menos dos dominios diferentes, uno destinado al reciclaje al TGN (con ChsB) y el otro encargado de la degradación endocítica (con RabB) (Figura D.1). En ausencia de dineína, debido a la inexistencia de fuerzas mótiles que

## Discusión

resuelvan dichos dominios, ChsB y RabB podrían encontrarse en un mismo compartimento sin dominios definidos. En este escenario, ChsB estaría acumulado en un compartimento anormal con identidad mixta. SynA también se encuentra en estos endosomas anormales formados tras la inactivación de la dineína [156], lo que subraya las coincidencias en el tráfico de ChsB y SynA.



**Figura D.1. Modelo de reciclaje de ChsB.** ChsB viaja a la membrana plasmática en vesículas secretoras (en rojo), previa acumulación en el Spitzenkörper (SPK), y difunde en la membrana hasta que es capturado y endocitado por el collar endocítico de la región subapical. Las vesículas endocíticas, cargadas con ChsB, llegan a un endosoma de organización (*sorting endosome*). En este compartimento, los dominios enriquecidos con RabB adquieren identidad de endosomas tempranos (ET, en azul), se unen a dineína para transportarse en sentido basípeto y progresar en la ruta de degradación endocítica. Por su parte, ChsB se segrega en dominios diferentes (en verde), que se fusionan con el TGN en un proceso que implica a RabC, GARP y la dineína. Una vez en el TGN, ChsB se concentra en vesículas con RabE (en rojo), quizás con la cooperación de RabO, que se envían al Spitzenkörper (SPK). Además, deben existir rutas alternativas menores (flechas amarillas finas) entre los endosomas y el TGN o el Golgi temprano, lo que permite un reciclaje parcial en ausencia de GARP o RabC.

### 5.6.1.2. El transporte de ChsB desde los endosomas al TGN mediado por RabC/GARP

Para el transporte eficiente desde los endosomas de *sorting* al TGN en mamíferos, RAB6 (RabC en *A. nidulans* [38]) recluta al complejo de anclaje GARP a las membranas del Golgi [39]. Ni la delección de *vps52* (*Vps52* es una subunidad de GARP) ni *rabCΔ* provocan una deslocalización completa de ChsB del domo apical a 28°C (figura R.52A-B); sin embargo, a 37°C dicha deslocalización de ChsB sí es completa (Figura R.52). Esta deslocalización correlaciona con la redistribución de ChsB a vacuolas y, por lo tanto, es indicativa de que se produce un fallo en el reciclaje desde los endosomas al TGN; es decir, al no clasificarse ChsB para reciclaje desde los endosomas sigue la ruta de degradación endosomal, la cual termina en las vacuolas. El diferente grado de afectación a 28°C y 37°C puede deberse al hecho de que la extensión apical es mucho más rápida, lo que con toda probabilidad impone una mayor carga en la ruta reciclaje.

Un posible sustituto para la función de GARP que explicaría el reciclaje parcial de ChsB a 28°C sería el complejo COG (*conserved oligomeric Golgi*) [286], el cual puede actuar tanto en el Golgi temprano [242, 287, 288] como en el TGN [289]. Una posibilidad alternativa sería que la ruta biosintética de ChsB aportase suficiente enzima a 28°C como para detectarse en la membrana plasmática en ausencia de reciclaje endocítico. Sin embargo, esta posibilidad es improbable ya que los resultados obtenidos con el mutante *sarA6* sugieren que el aporte de ChsB al sistema por síntesis de *novo* en el estadio de hifas es bajo o inexistente (Figura R.53). En último lugar, es posible que, en ausencia de GARP, una proporción de ChsB viaje a la membrana plasmática directamente desde los endosomas de *sorting* por una ruta de reciclaje endocítico directo [41].

En resumen, nuestros resultados sugieren que la polarización de ChsB se puede mantener por varias vías, lo que pone de manifiesto la robustez del sistema de reciclaje endocítico que, por otro lado, parece crucial para el proceso de extensión apical a la vista de los defectos causados por la ausencia de GARP. De entre estas rutas, la mediada por RabC y GARP parece ser una ruta principal. Por tanto, la ruta de reciclaje seguida por ChsB (y probablemente SynA) es similar a la seguida por Snc1 en *S. cerevisiae*, la cual requiere Ypt6 (RabC en *A. nidulans*) y GARP [40].

### 5.6.2. El tráfico y las modificaciones postraduccionales de InuA y EglC

Hemos desarrollado un sistema de expresión regulable para estudiar la ruta de exocitosis de InuA y EglC, marcadas con HA<sub>3</sub> y GFP, respectivamente. En concreto, hemos aprovechado la regulación transcripcional de la expresión de InuA. En uno de los primeros estudios de la ruta secretora con mutantes condicionales, Schekman y colaboradores utilizaron

un sistema similar [235]. En presencia de glucosa como fuente de carbono apenas hay expresión de InuA, sin embargo si se utiliza sacarosa la expresión se incrementa considerablemente. Este nuevo método de regulación de la expresión en *A. nidulans*, mediante la integración del gen deseado en el locus de *inuA* puede ser útil para investigaciones futuras y presenta ventajas significativas respecto a los promotores regulables que actualmente se utilizan: no requiere un gran tiempo de inducción ni un cambio de la fuente de nitrógeno, como sí ocurre con el promotor *niiA<sup>P</sup>* [157] ni se necesita la utilización de fuentes de carbono pobres, como sí sucede con el uso del promotor *alcA<sup>P</sup>* [18].

### 5.6.2.1. La N-glicosilación de InuA

InuA es una inulinasa que contiene un total de 8 motivos de N-glicosilación Asn-X-Ser/Thr. De hecho, investigaciones previas demostraron que InuA se glicosila [232]. Efectivamente hemos determinado que el complejo patrón electroforético que InuA presenta se debe a la N-glicosilación que esta enzima, durante su viaje al exterior celular, adquiere. Esto lo hemos demostrado mediante la utilización de la enzima PNGasa F, que sólo elimina N-glicanos de las proteínas sustrato [239]. Tras dicho tratamiento, todas las especies de InuA tanto del micelio como del espacio extracelular se transforman en una banda que coincide en movilidad electroforética con la predicha para el producto de InuA procesado por la peptidasa señal (Figura R.59B-C).

La clasificación de las diferentes especies glicosiladas de InuA en dos grupos, glicosilación basal (GB) y glicosilación abundante (GA), nos permitió iniciar la investigación de un modo lógico y ordenado. Inicialmente demostramos que las formas GB, que se visualizan en *western-blot* como bandas discretas, corresponden a InuA con más o menos bloques de N-glicanos, al observar que las especies GB se desplazan a bandas con menor movilidad tras inhibir específicamente la N-glicosilación en el RE con tunicamicina. La adquisición de N-glicanos por parte de otros *cargos* también produce un patrón de bandas discretas en geles de acrilamida [235, 290]. Además, las especies GB se siguen produciendo cuando se bloquea la salida del RE, lo que confirma que se forman en dicho compartimento.

Posteriormente, utilizamos un panel de mutaciones condicionales o de delección de la ruta secretora para determinar los requerimientos genéticos de la glicosilación de InuA. Descubrimos que se requieren tres procesos para la conversión de InuA GB en InuA con glicosilación abundante (GA): la salida del RE (que bloqueamos con *sarA8*), la llegada al aparato de Golgi de las vesículas cargadas con InuA (*sedV<sup>ts</sup>* y *rabO<sup>ts</sup>*) y la función adecuada del Golgi temprano (*podB1*). Por lo tanto, concluimos que la conversión de GB en GA se produce por glicosilación en el aparato de Golgi, en el cual los N-glicanos añadidos en bloques en el RE se modifican considerablemente [4, 291]. Estas modificaciones en el Golgi se muestran en geles

de acrilamida como una señal difusa o *smear* tanto en el caso de InuA (Figura R.57C) como en otros *cargos* [235, 290]. Las proteínas HypB (Sec7) y Trs120 no son necesarias para que InuA adquiera un patrón de glicosilación intracelular normal. Sin embargo, el mutante *hypB5* a temperatura semipermissiva secreta InuA hipoglicosilada. Es posible que la ausencia de función de HypB afecte a la organización del Golgi temprano, reduciendo la eficiencia de glicosilación. Alternativamente, también podría ser necesaria cierta función del TGN para la glicosilación de InuA. Otra posibilidad es que, a temperatura semipermissiva, la actividad GEF de HypB esté totalmente inhibida (la sustitución que provoca la termosensibilidad se encuentra en el dominio GEF) mientras que otras funciones no estén afectadas. En esta línea, la inactivación selectiva de la función GEF podría alterar el Golgi temprano, por ejemplo al secuestrar gran cantidad de Arf1 en el TGN, que al no adquirir GTP no realiza su función y no se libera.

Las mutaciones *sarA8* y *rabO<sup>ts</sup>* presentan un aparato de Golgi parcialmente desorganizado a temperatura permisiva (capítulo I y [18]). A temperatura semipermissiva tanto *sarA8* como *rabO<sup>ts</sup>* provocan la secreción de las especies GB de InuA. Una explicación plausible es que la desorganización parcial del Golgi, causada por la incubación de estos mutantes a temperatura semipermissiva, impida la glicosilación pero permita el tráfico de InuA por el Golgi y su secreción. En cualquier caso, este resultado demuestra que las modificaciones en los N-glicanos de InuA que se producen en el Golgi no son un requisito para su secreción. La cinética de transporte de InuA en la ruta secretora podría no depender de su glicosilación. Esto concuerda con el efecto de la tunicamicina que, pese a inhibir parcialmente la glicosilación en el RE, no impide la secreción de InuA y sólo la reduce a concentraciones altas (Figura R.60).

### 5.6.2.2. Las modificaciones postraduccionales de EglC

Pese a que no hemos comprobado qué tipo de modificación postraducciona sufre EglC y que causa el patrón de bandas que presenta en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, es probable que la modificación principal sea la N-glicosilación, por su semejanza con el patrón de InuA. De hecho, hemos comprobado que la salida del RE es necesaria para la adquisición de las modificaciones que dan lugar a las especies moleculares de menor movilidad denominadas E<sub>2</sub>, lo que es consistente con que las formas E<sub>2</sub> se produzcan en el Golgi por modificación de las especies E<sub>1</sub>, formadas en el RE. Por tanto, aparentemente, InuA y EglC sufren modificaciones postraduccionales relativamente similares (GPI excluido). Por otro lado, EglC es una PA-GPI y el anclaje y la maduración del GPI son procesos necesarios para su salida del RE [2]. Pese al pequeño incremento en masa que supone la adición del GPI (~1.9 kDa) y la aún menor variación que conlleva su remodelado, es posible que en alguno de los mutantes utilizados en nuestros estudios éstos procesos no estén ocurriendo eficientemente. En el mutante *sarA6*, a 37°C existe un desplazamiento de la banda principal de E<sub>1</sub>, que podría corresponder a una

## Discusión

---

deficiencia en el remodelado del GPI. Esta interpretación, aunque por el momento especulativa, dejaría abierta la puerta a un posible requerimiento de SarA en el remodelado del GPI. Por otro lado, formalmente es posible que dicha banda correspondiese a EglC totalmente N-glicosilado y acumulado en el RE o en el Golgi a la espera de las glicosilaciones que la transformarían en E<sub>2</sub>, que podrían ocurrir de manera ralentizada por la desorganización del Golgi que causa *sarA6* a dicha temperatura.

### 5.6.2.3. La parte común de las rutas de exocitosis de InuA y EglC

La secreción de InuA y EglC requiere la formación de las vesículas COPII por parte de SarA y su correcta llegada y fusión con el aparato de Golgi, como demuestra la inhibición de la exocitosis en los mutantes condicionales de la GTPasa SarA y de la SNARE SedV (así como de RabO en el caso de InuA, no estudiado con EglC). De hecho, EglC se acumula en el RE en el mutante *sarA6* (Figura R.73). Estos resultados demuestran que InuA y EglC viajan al aparato de Golgi en vesículas COPII, donde se fusionan en un proceso que requiere la intervención de SedV y, al menos en el caso de InuA, también de RabO. Por tanto, InuA y EglC no se exocitan por una ruta secretora no convencional que no implique al Golgi [292-294]. Los datos también indican que ambos *cargos* atraviesan el TGN en su camino al exterior celular, ya que los reguladores esenciales del TGN HypB y Trs120 (TRAPPII) son necesarios para la secreción de InuA y, además, la inactivación de Trs120 impide la exocitosis de EglC y provoca su acumulación en estructuras intracelulares (Figura R.76B).

En los mutantes en los que InuA o EglC no se exocitan no hemos detectado por lo general un incremento considerable de los niveles intracelulares de proteína, con alguna excepción. Por ejemplo, en el mutante *sarA8* a 30°C, existe un incremento de las formas GB de InuA, sin embargo este incremento no se detecta a temperatura restrictiva, a la cual la secreción de InuA está totalmente inhibida (Figura R.61A). Creemos que en estas condiciones no aumentan los niveles de *cargo* retenido en el RE en el caso de *sarA8* porque debe de activarse la ruta de degradación de proteínas por estrés en el RE (ERAD) [295]. En el resto de casos, donde InuA se bloquea en fases posteriores, es posible que exista una parada general de la ruta, lo que provoque una inhibición de la síntesis/translocación de más proteína o una degradación continua del exceso de *cargo*.

### 5.6.2.4. La rama específica de InuA en la ruta secretora

Hemos demostrado que el regulador maestro de los endosomas tempranos, RabB y uno de sus efectores (Vps33) son específicamente esenciales para la secreción de InuA (Figura R.65). Los otros dos *cargos* estudiados, ChsB y EglC, no necesitan RabB para su exocitosis

(Figuras R.51 y R.78A-B). Estos resultados sugieren que InuA sigue una ruta de secreción especial.

En *S. cerevisiae*, se han descrito dos rutas diferenciadas de secreción desde el TGN [29, 30]. Una de ellas es independiente de la función de los endosomas y por ella viajan la PA-GPI Bgl2p y las proteínas integrales de membrana Snc1p y Pma1p [29, 30, 33]. La exocitosis de esta primera ruta se realiza a partir de vesículas de baja densidad [29, 30]. Por la segunda ruta se secretan, al menos, las enzimas solubles invertasa, fosfatasa ácida y exoglucanasa en vesículas de alta densidad [29, 30]. Para que funcione esta última ruta se necesita que haya transporte de vesículas de clatrina desde el TGN a los endosomas [29, 30, 33]. Si se bloquea este tráfico, por mutaciones en *CHC1*, *VPS1*, *PEP12* o *VPS4* [30, 33, 296], las enzimas solubles mencionadas se desvían hacia la otra ruta y se secretan en vesículas ligeras [30, 33]. Se ha propuesto que en esta segunda ruta el *cargo* viaja a los endosomas antes de ser secretado [30, 33]. Teniendo en consideración estas investigaciones, concluimos que la secreción de InuA en *A. nidulans* tiene características comunes con la ruta dependiente de endosomas de *S. cerevisiae*.

Una diferencia entre la secreción de InuA en *A. nidulans* y la secreción de las enzimas solubles antes mencionadas en *S. cerevisiae* es que, en el caso de *A. nidulans*, las mutaciones que afectan a los endosomas impiden la secreción de InuA, en vez de divertir el tráfico por otra ruta. Esta diferencia puede deberse a que en los mutantes que estamos utilizando en este trabajo (*rabBΔ* y *vps33<sup>ts</sup>*) no se impida el viaje a los endosomas (como sucede en los mutantes probados en *S. cerevisiae*), sino que, una vez en los endosomas, se imposibilite la salida de InuA de éstos.

RabB tiene una proteína paróloga, RabA, que puede, en parte, realizar sus funciones [174]. De hecho, la doble delección *rabAΔ rabBΔ* es letal [174]. RabA también se localiza en los endosomas tempranos y, pese a no ser esencial para la función de los endosomas [156, 174], es capaz de reclutar al complejo CORVET, aunque de un modo mucho más ineficiente que RabB [174]. La función de RabA podría permitir, en ausencia de RabB, la recepción de InuA por los endosomas anormales del mutante *rabBΔ*. Como consecuencia, InuA podría quedar atrapada en endosomas incapaces de exportar *cargo*. En segundo lugar, *vps33<sup>ts</sup>* a 42°C también impide la secreción de InuA, quizá porque su inactivación no es total o porque no se necesita para la recepción de tráfico biosintético por los endosomas (Vps45 podría sustituir a Vps33 en su ausencia [170]). Sin embargo, otra alternativa es que el sistema de secreción de InuA funcione de manera diferente al descrito en levadura para las enzimas invertasa, fosfatasa alcalina y exoglucanasa. Mientras que en *S. cerevisiae* el tráfico de esta ruta puede desviarse en caso de bloqueo, en *A. nidulans* el transporte a los endosomas podría ser una función esencial para la secreción de InuA. Además, hay que tener en cuenta que la maduración de los endosomas es esencial en *A. nidulans* [164], lo que sería consistente con una función secretora. En conclusión,

## Discusión

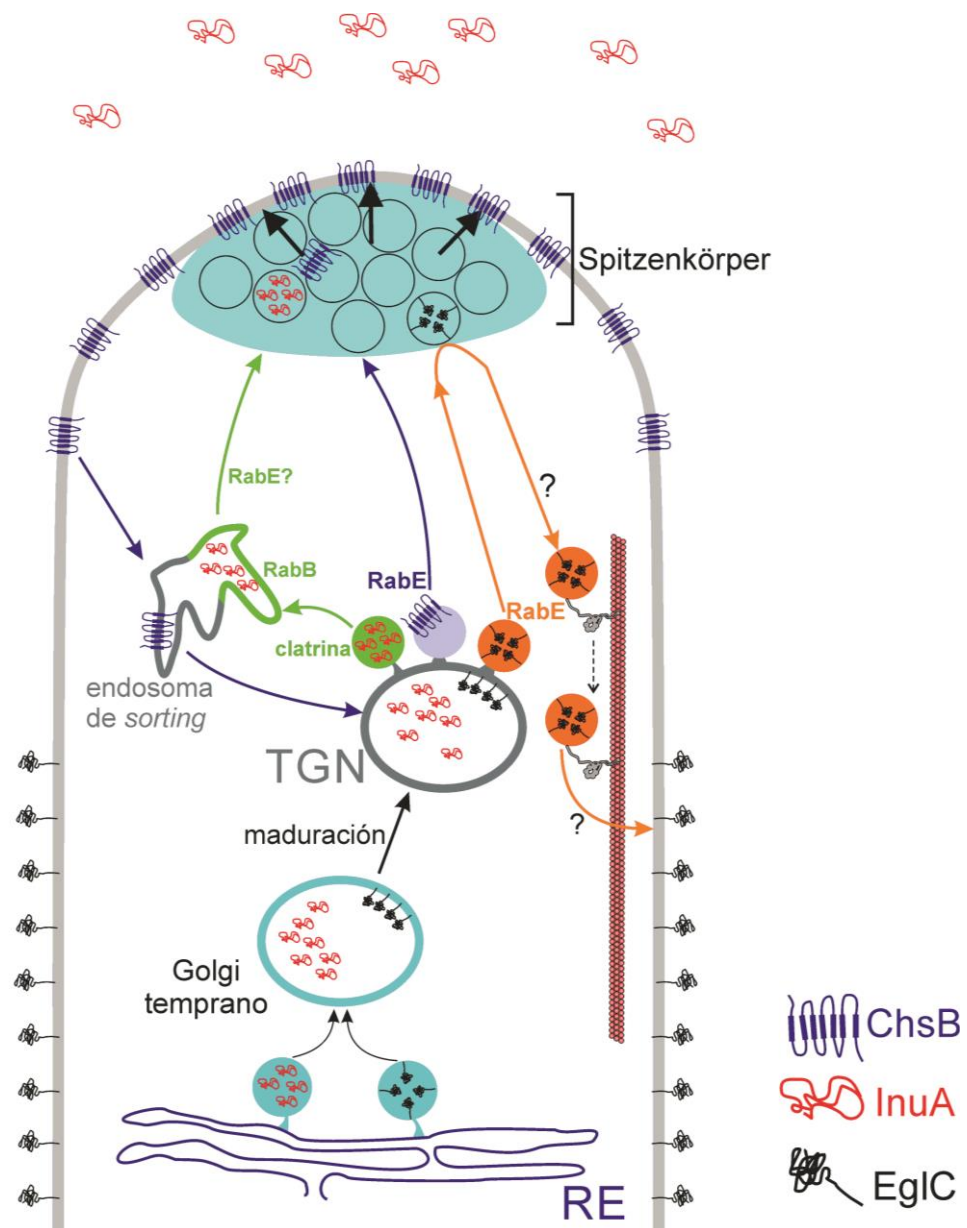
---

consideramos plausible que InuA se secrete por una ruta similar, pero no idéntica, a la de las vesículas densas de levadura y diferente a la ruta que toman EglC y ChsB desde el TGN.

Por otra parte, VpsT (cuyo ortólogo en *S. cerevisiae* es Vps10p) es un receptor que reconoce y envía hidrolasas desde el TGN al sistema endosomal y que podría ser un candidato para mediar el tráfico de InuA a los endosomas [38]. Sin embargo, la delección de *vpsT* no afecta a la secreción de InuA. Por tanto, el tráfico de InuA es independiente de VpsT y se mantiene la incógnita sobre el hipotético transporte que dirige InuA los endosomas. Además, la implicación endosomal en la secreción de InuA parece restringirse a los endosomas tempranos, como sugiere el hecho de que la secreción de InuA funciona a niveles normales en un mutante *rabSΔ*. En *S. cerevisiae*, ni Vps10p (ortólogo de VpsT) ni la función de los endosomas tardíos son necesarios para la ruta de exocitosis de las vesículas densas [30, 33].

Por tanto, proponemos un modelo por el que InuA viaja a los endosomas tempranos antes de ser exocitado (Figura D.2). Existen dos posibilidades, una de ellas es que InuA vuelva desde los endosomas tempranos al TGN para su exocitosis. La segunda es la secreción directa desde los endosomas a la membrana plasmática. Se trata de una posibilidad muy atractiva, ya que es un proceso que se ha descrito previamente en el reciclaje endocítico [41] y en la secreción apical [13] y basolateral [34, 35, 42] que ocurre en mamíferos. Es más, en mamíferos, RAB11 (homólogo de RabE) puede promover la exocitosis desde compartimentos endosomales [13]. Este dato podría explicar el requerimiento de Trs120 para la secreción de InuA, mediante la activación de RabE en endosomas. En el futuro será necesaria una investigación más detallada para tratar de cartografiar de manera precisa la ruta de secreción de InuA en la conexión TGN/endosomas. Sería informativo purificar los endosomas anormales de la cepa *rabBΔ* y detectar si están enriquecidos en InuA y otras enzimas solubles que normalmente se secreten, así como profundizar en la posible existencia de vesículas de secreción de distinta densidad.

Una pregunta que queda por responder es ¿por qué existe exocitosis a través de los endosomas? La respuesta puede estar en la naturaleza de los *cargos*. InuA es una enzima soluble que únicamente se necesita si la inulina es la principal fuente de carbono en el medio. De hecho, su síntesis está fuertemente regulada por la fuente de carbono. Por el contrario, tanto EglC como ChsB son enzimas que se expresan de un modo constitutivo y que, además, están implicadas en la síntesis de pared celular, proceso que ocurre en paralelo al crecimiento celular. Es posible que la exocitosis de EglC y ChsB desde el TGN (pese a sus diferencias: ChsB proviene de reciclaje endocítico y EglC de nueva síntesis en el RE), que es independiente de los endosomas, constituya una ruta directa y siempre en funcionamiento: si hay crecimiento celular se necesita la actividad de esta ruta para construir la pared. Por otro lado, la ruta por la que viaja InuA puede ser una ruta regulada, en la que el paso por los endosomas constituiría un nivel de



**Figura D.2. Modelo especulativo del tráfico de ChsB, InuA y EglC.** Según este modelo, **ChsB** trafica (flecha azules) por reciclaje endocítico desde un endosoma de sorting al TGN, en un proceso que implica a RabC, GARP y la dineína. En el TGN se concentra en vesículas RabE para viajar al Spitzenkörper, desde donde se exocita en la región apical (la Figura D.1 muestra con mayor detalle el modelo de reciclaje de ChsB). **InuA** y **EglC** se sintetizan en el RE, desde donde viajan al Golgi temprano en vesículas COPII distintas. La cisterna del Golgi temprano madura hasta alcanzar el estadio de TGN. En el TGN las rutas de **InuA** y **EglC** divergen. **InuA** (flechas verdes) viaja, en vesículas de clatrina, a los endosomas tempranos mediante un proceso probablemente dependiente de RabB y Vps33. Desde los endosomas tempranos InuA se secreta en vesículas RabE, pasando previamente por el Spitzenkörper. Por otro lado, siguiendo una ruta más directa de exocitosis, **EglC** (flechas naranjas) se concentra en vesículas RabE que viajan al Spitzenkörper, antes de ser enganchadas por microtúbulos y viajar en sentido basípeto. Finalmente **EglC** se exocita en regiones apico-distales. (Es posible que la separación de **EglC** e **InuA** en vesículas COPII diferentes implique que, en el Golgi, se encuentren también en cisternas diferentes).

## Discusión

---

regulación añadido al transcripcional, quizá de almacenamiento previo a su secreción. Otra posibilidad, a nuestro juicio menos plausible, es que las enzimas solubles como InuA necesiten modificaciones postraduccionales antes de ser secretadas, y que éstas se produzcan en los endosomas. Una tercera posibilidad es que InuA no viaje a los endosomas antes de secretarse, sino que se requiera un tráfico constante entre Golgi y endosomas para, de alguna manera, facilitar la exocitosis de InuA.

### 5.6.2.5. La ruta directa de secreción de EglC: ¿secreción “basolateral”?

A diferencia de InuA, para la exocitosis de EglC no se requiere la integridad de los endosomas tempranos, como demuestra su localización en la superficie celular en ausencia de *rabB* (Figura R.78A). EglC probablemente se exocita por una ruta más directa desde el TGN. Nuestros resultados indican que EglC se exocita desde el TGN en vesículas secretoras formadas por RabE, ya que la inactivación de una subunidad de TRAPP<sub>II</sub> (Trs120, que activa a RabE [36, 37]) impide la exocitosis de EglC-GFP-GPI y provoca su acumulación en estructuras internas, probablemente cisternas del TGN (Figura R.76B). Una característica particular de EglC (y de GelE, la otra PA-GPI estudiada en este trabajo) es que su disposición en la superficie celular es “antipolarizada”; es decir, con una mayor concentración en regiones apico-distales y una menor presencia en la región apical (Figura R.72A). Esta distribución, que también se ha observado en otros *cargos* en *A. nidulans*, como en la permeasa de aminoácidos AgtA [297], podría explicarse por una alta difusibilidad de las proteínas exocitadas en la región más apical de la membrana y el periplasma de las hifas y una menor capacidad de difusión en regiones apico-distales. De este modo, las proteínas del periplasma, o integrales de membrana que no sufriesen reciclaje endocítico, presentarían la localización “antipolarizada”. Sin embargo, esto no parece ser cierto para todas ellas, puesto que la SNARE SsoA se dispone homogéneamente en toda la membrana plasmática [12]. Otra posibilidad es que EglC se exocite por una ruta de secreción no apical. La localización parcial de EglC en el Spitzenkörper (Figura R.70) parece, en principio, incompatible con la secreción no apical; sin embargo, podría existir una ruta de secreción no apical desde el Spitzenkörper que estuviese mediada por transporte basípeto de las vesículas RabE en microtúbulos (Figura D.2) [15]. Esta hipotética ruta de secreción sería semejante a la secreción basolateral que ocurre en células epiteliales de mamífero y explicaría el hecho de que el ~24% de las vesículas RabE se desplazan en sentido basípeto [36], propulsadas por dineína sobre los microtúbulos [15]. En resumen, EglC viajaría desde el TGN al Spitzenkörper en vesículas RabE, donde estas vesículas se clasificarían para su envío en dineína/microtúbulos a regiones apico-distales, donde EglC se exocitaría (ver modelo en Figura D.2). Además esta ruta también daría cuenta de la localización de múltiples proteínas en el septo, entre ellas EglC y GelE. Según este modelo, el Spitzenkörper sería un centro organizador de varias vías de

secreción. De hecho, el Spitzenkörper de *A. nidulans* contiene diferentes tipos de vesículas [161].

Un resultado que podría arrojar luz sobre esta cuestión es el efecto de *rabDΔ* sobre EglC. En ausencia de la GTPasa RabD (cuyo homólogo en *S. cerevisiae* es Sec4p), EglC no se dispone de manera “antipolarizada” en la superficie celular, sino que EglC presenta una localización polarizada en el domo apical, semejante a la distribución de ChsB. Según nuestro modelo, este efecto podría ser debido al desvío de EglC hacia una ruta de secreción polarizada. RabD, como componente del complejo denominado exocisto, podría ser necesaria para una ruta de secreción “basolateral”, mientras que la ruta de secreción apical sería menos dependiente de RabD.

### 5.7. Discusión general y perspectivas de futuro

En los primeros capítulos de esta tesis hemos establecido el carácter transitorio y dinámico del aparato de Golgi y su relación fundamental con el RE, lo que reafirma los resultados de investigaciones realizadas con levaduras [43, 44] y células de mamífero [45, 46]. Los resultados obtenidos también ponen de manifiesto las diferencias existentes entre el Golgi temprano y el TGN. Sin embargo, las proteínas GEFs esenciales del Golgi temprano (GeaA) y del TGN (HypB) son, hasta cierto punto, intercambiables, puesto que una sustitución en GeaA permite el crecimiento de *A. nidulans* en ausencia de HypB. El análisis bioinformático y la delección sistemática de las GTPasas de la familia Arf/Sar y de sus proteínas reguladoras (GEFs y GAPs) demuestran el alto grado de conservación de estos interruptores moleculares de la ruta secretora y nos permiten tener una visión general del papel de estas proteínas en el tráfico de membranas en *A. nidulans*. Una vez establecidos estos hechos, nos dispusimos a investigar a los protagonistas del tráfico: los *cargos*.

Gracias al estudio del tráfico de ChsB, InuA y EglC hemos encontrado diferencias en la ruta que cada una de estas proteínas sigue para llegar a su destino final. En primer lugar, hemos demostrado que la localización de ChsB en la membrana apical de las hifas, lejos de necesitar un aporte continuo de enzima recién sintetizada, se mantiene por un reciclaje endocítico que requiere la endocitosis de ChsB en la región subapical de la membrana, su reciclaje desde endosomas al TGN (mediado, en parte, por la dineína, RabC y GARP) y su vuelta a la membrana plasmática desde el TGN. En la salida de ChsB del TGN está implicada la proteína HypB y probablemente el complejo TRAPPII y la GTPasa RabE. En segundo lugar, EglC realiza una ruta a la superficie celular que depende del continuo transporte al aparato de Golgi de vesículas COPII cargadas con EglC recién sintetizada en el RE, y de su exocitosis desde el Golgi, probablemente en vesículas con RabE. La expresión de ChsB y EglC es constitutiva y los

## Discusión

---

‘endosomas RabB’ no intervienen en su transporte. En tercer lugar, la expresión de InuA está regulada transcripcionalmente y su secreción está supeditada a la integridad de los endosomas tempranos (=‘endosomas RabB’), pero no de los endosomas tardíos, lo que sugiere que transita por los primeros antes de exocitarse.

*A. nidulans* debe coordinar la obtención de nutrientes del medio extracelular con su crecimiento por extensión apical y la síntesis de pared celular [17]. En su conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que podrían existir diferentes rutas de tráfico intracelular para satisfacer estas necesidades.

# **CONCLUSIONES**



1. La  $\alpha$ -hélice C-terminal de SarA es clave para su función/estabilidad.
2. La inactivación de SarA desorganiza los sitios de salida del retículo (ERES) y provoca la agregación de Sec23.
3. El bloqueo de la formación de las vesículas COPII provoca la desorganización del aparato de Golgi y la parada de la extensión apical. Este efecto es sólo compatible con el modelo de maduración de cisternas.
4. La desorganización del aparato de Golgi causada por el bloqueo del tráfico de salida del retículo endoplasmático (RE) provoca la reabsorción de las membranas del Golgi temprano en el RE y la disipación de las membranas del *trans*-Golgi (TGN).
5. El bloqueo del tráfico COPII tiene consecuencias morfogénicas en la región apical de las hifas de *Aspergillus nidulans*, que se traducen en la formación de globos apicales de ~10  $\mu$ m de diámetro.
6. Las proteínas de la familia Arf/Sar y sus reguladores realizan funciones esenciales y se encuentran altamente conservadas en *A. nidulans* con las de levaduras y humanos.
7. COPI y GeaA se localizan predominantemente en el Golgi temprano, siendo apenas detectables en el TGN.
8. Las proteínas de la familia GBF/Gea contienen un motivo serina-residuo aromático-residuo hidrofóbico ( $S\Omega\phi$ ) universalmente conservado en eucariotas. La sustitución Tyr1022Cys en el motivo  $S\Omega\phi$  de GeaA provoca la relocalización parcial al TGN y a la región apical de la membrana plasmática.
9. La sustitución Tyr1022Cys en el motivo conservado  $S\Omega\phi$  de GeaA permite la exocitosis y el crecimiento en ausencia de HypB.
10. La quitina sintasa ChsB se mantiene polarizada en el casquete apical de la membrana plasmática mediante una ruta indirecta de reciclaje endocítico que comporta su endocitosis en un anillo subapical de parches de actina, su viaje desde un compartimento endocítico al TGN mediado por dineína, RabC y el complejo GARP, y su salida del TGN en vesículas secretoras, de manera dependiente de HypB y Trs120.
11. La GTPasa RabO, que colocaliza con ChsB en el Spitzenkörper, es crítica para que ChsB se localice en la membrana plasmática.
12. La ruta de reciclaje endocítico de ChsB es independiente de RabB<sup>RAB5</sup> y del exómero.

## Conclusiones

---

13. InuA es una inulinasa que se secreta al exterior celular por una ruta que requiere la formación de las vesículas COPII, su llegada al aparato de Golgi, su paso por el TGN y la funcionalidad de los endosomas tempranos, pero no de los endosomas tardíos.

14. Las proteínas ancladas a glicosil fosfatidilinositol (GPI) EglC y GelE presentan una distribución “antipolarizada” en la superficie de las hifas.

15. La proteína anclada a GPI EglC probablemente se exocita por una ruta que implica la salida del RE en vesículas COPII, su paso por el Golgi temprano y el TGN y su exocitosis directa desde el TGN a la membrana plasmática de manera dependiente de Trs120.

16. En ausencia de RabD<sup>Sec4</sup> EglC se polariza al casquete apical.

# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Breitling, J. & Aebi, M., *N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(8): p. a013359.
2. Muñoz, M. & Riezman, H., *Trafficking of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins from the endoplasmic reticulum to the cell surface*. J Lipid Res, 2016. **57**(3): p. 352-60.
3. Miller, E.A. & Schekman, R., *COPII - a flexible vesicle formation system*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(4): p. 420-7.
4. Munro, S., *What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus?* FEBS Lett, 2001. **498**(2-3): p. 223-7.
5. Berger, E.G. & Rohrer, J., *Golgi glycosylation enzymes*, en *The Golgi Apparatus: State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery*, A.A. Mironov & M. Pavelka, Editors. 2008, Springer Vienna: Vienna. p. 161-189.
6. Hutagalung, A.H. & Novick, P.J., *Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 119-49.
7. Gillingham, A.K. & Munro, S., *The small G proteins of the Arf family and their regulators*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 579-611.
8. Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., & Novick, P., *GTPase networks in membrane traffic*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 637-59.
9. Allan, V. & Vale, R., *Movement of membrane tubules along microtubules in vitro: evidence for specialised sites of motor attachment*. J Cell Sci, 1994. **107** ( Pt 7): p. 1885-97.
10. Guo, Y., Sirkis, D.W., & Schekman, R., *Protein sorting at the trans-Golgi network*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 169-206.
11. Deborde, S., Gravotta, D., Lakkaraju, A., & Rodriguez-Boulan, E., *Golgi apparatus and epithelial cell polarity*, en *The Golgi Apparatus: State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery*, A.A. Mironov & M. Pavelka, Editors. 2008, Springer Vienna: Vienna. p. 563-579.
12. Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araújo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E.A., Penalva, M.A., Osmani, S.A., & Oakley, B.R., *The tip growth apparatus of Aspergillus nidulans*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(4): p. 1439-49.
13. Thuenauer, R., Hsu, Y.C., Carvajal-Gonzalez, J.M., Deborde, S., Chuang, J.Z., Romer, W., Sonnleitner, A., Rodriguez-Boulan, E., et al., *Four-dimensional live imaging of apical biosynthetic trafficking reveals a post-Golgi sorting role of apical endosomal intermediates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(11): p. 4127-32.
14. Donovan, K.W. & Bretscher, A., *Myosin-V is activated by binding secretory cargo and released in coordination with Rab/exocyst function*. Dev Cell, 2012. **23**(4): p. 769-81.
15. Peñalva, M.A., Zhang, J., Xiang, X., & Pantazopoulou, A., *Transport of fungal RAB11 secretory vesicles involves myosin-5, dynein/dynactin/p25, and kinesin-1 and is independent of kinesin-3*. Mol Biol Cell, 2017. **28**(7): p. 947-961.
16. Peñalva, M.A., Galindo, A., Abenza, J.F., Pinar, M., Calcagno-Pizarelli, A.M., Arst, H.N., & Pantazopoulou, A., *Searching for gold beyond mitosis: Mining intracellular membrane traffic in Aspergillus nidulans*. Cell Logist, 2012. **2**(1): p. 2-14.
17. Steinberg, G., Peñalva, M.A., Riquelme, M., Wosten, H.A., & Harris, S.D., *Cell Biology of Hyphal Growth*. Microbiol Spectr, 2017. **5**(2).
18. Pinar, M., Pantazopoulou, A., Arst, H.N., Jr., & Peñalva, M.A., *Acute inactivation of the Aspergillus nidulans Golgi membrane fusion machinery: correlation of apical extension arrest and tip swelling with cisternal disorganization*. Mol Microbiol, 2013. **89**(2): p. 228-48.
19. Shindiapina, P. & Barlowe, C., *Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(9): p. 1530-45.

## Bibliografía

---

20. Ivan, V., de Voer, G., Xanthakis, D., Spoorendonk, K.M., Kondylis, V., & Rabouille, C., *Drosophila Sec16 mediates the biogenesis of tER sites upstream of Sar1 through an arginine-rich motif*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4352-65.
21. Glick, B.S. & Nakano, A., *Membrane traffic within the Golgi apparatus*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 113-32.
22. Jackson, C.L., Walch, L., & Verbavatz, J.M., *Lipids and Their Trafficking: An Integral Part of Cellular Organization*. Dev Cell, 2016. **39**(2): p. 139-153.
23. Sharpe, H.J., Stevens, T.J., & Munro, S., *A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties*. Cell, 2010. **142**(1): p. 158-69.
24. Pantazopoulou, A. & Peñalva, M.A., *Organization and dynamics of the Aspergillus nidulans Golgi during apical extension and mitosis*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(20): p. 4335-47.
25. Yang, Y., El-Ganiny, A.M., Bray, G.E., Sanders, D.A., & Kaminskyj, S.G., *Aspergillus nidulans hypB encodes a Sec7-domain protein important for hyphal morphogenesis*. Fungal Genet Biol, 2008. **45**(5): p. 749-59.
26. Breakspear, A., Langford, K.J., Momany, M., & Assinder, S.J., *CopA:GFP localizes to putative Golgi equivalents in Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett, 2007. **277**(1): p. 90-7.
27. Papanikou, E., Day, K.J., Austin, J., & Glick, B.S., *COPI selectively drives maturation of the early Golgi*. Elife, 2015. **4**.
28. Fukuda, K., Yamada, K., Deoka, K., Yamashita, S., Ohta, A., & Horiuchi, H., *Class III chitin synthase ChsB of Aspergillus nidulans localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development*. Eukaryot Cell, 2009. **8**(7): p. 945-56.
29. Harsay, E. & Bretscher, A., *Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast*. J Cell Biol, 1995. **131**(2): p. 297-310.
30. Harsay, E. & Schekman, R., *A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 271-85.
31. Muñoz, M., Morsomme, P., & Riezman, H., *Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum*. Cell, 2001. **104**(2): p. 313-20.
32. Valdez-Taubas, J. & Pelham, H.R., *Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling*. Curr Biol, 2003. **13**(18): p. 1636-40.
33. Gurunathan, S., David, D., & Gerst, J.E., *Dynamain and clathrin are required for the biogenesis of a distinct class of secretory vesicles in yeast*. EMBO J, 2002. **21**(4): p. 602-14.
34. Bonifacino, J.S., *Adaptor proteins involved in polarized sorting*. J Cell Biol, 2014. **204**(1): p. 7-17.
35. Rodriguez-Boulan, E., Kreitzer, G., & Musch, A., *Organization of vesicular trafficking in epithelia*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(3): p. 233-47.
36. Pantazopoulou, A., Pinar, M., Xiang, X., & Peñalva, M.A., *Maturation of late Golgi cisternae into RabERAB11 exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo*. Mol Biol Cell, 2014.
37. Pinar, M., Arst, H.N., Jr., Pantazopoulou, A., Tagua, V.G., de Los Ríos, V., Rodríguez-Salarichs, J., Díaz, J.F., & Peñalva, M.A., *TRAPP II regulates exocytic Golgi exit by mediating nucleotide exchange on the Ypt31 ortholog RabERAB11*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(14): p. 4346-51.
38. Pantazopoulou, A. & Peñalva, M.A., *Characterization of Aspergillus nidulans RabC/Rab6*. Traffic, 2011. **12**(4): p. 386-406.
39. Bonifacino, J.S. & Hierro, A., *Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(3): p. 159-67.

40. Siniosoglou, S., Peak-Chew, S.Y., & Pelham, H.R., *Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p*. EMBO J, 2000. **19**(18): p. 4885-94.
41. MacDonald, C. & Piper, R.C., *Genetic dissection of early endosomal recycling highlights a TORC1-independent role for Rag GTPases*. J Cell Biol, 2017. **216**(10): p. 3275-3290.
42. Leitinger, B., Hille-Rehfeld, A., & Spiess, M., *Biosynthetic transport of the asialoglycoprotein receptor H1 to the cell surface occurs via endosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10109-13.
43. Losev, E., Reinke, C.A., Jellen, J., Strongin, D.E., Bevis, B.J., & Glick, B.S., *Golgi maturation visualized in living yeast*. Nature, 2006. **441**(7096): p. 1002-6.
44. Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K., & Nakano, A., *Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation*. Nature, 2006. **441**(7096): p. 1007-10.
45. Ward, T.H., Polishchuk, R.S., Caplan, S., Hirschberg, K., & Lippincott-Schwartz, J., *Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export*. J Cell Biol, 2001. **155**(4): p. 557-70.
46. Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., & Klausner, R.D., *Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic*. Cell, 1991. **67**(3): p. 601-16.
47. Johnson, A.E. & van Waes, M.A., *The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 799-842.
48. Craven, R.A., Egerton, M., & Stirling, C.J., *A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors*. EMBO J, 1996. **15**(11): p. 2640-50.
49. Jensen, D. & Schekman, R., *COPII-mediated vesicle formation at a glance*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 1): p. 1-4.
50. Bonifacino, J.S. & Glick, B.S., *The mechanisms of vesicle budding and fusion*. Cell, 2004. **116**(2): p. 153-66.
51. Goto, M., *Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions*. Biosci Biotechnol Biochem, 2007. **71**(6): p. 1415-27.
52. Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E., Terasaki, M., Siggia, E., et al., *Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells*. J Cell Biol, 1997. **139**(5): p. 1137-55.
53. Szul, T. & Sztul, E., *COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface*. Physiology (Bethesda), 2011. **26**(5): p. 348-64.
54. Mellman, I. & Simons, K., *The Golgi complex: in vitro veritas?* Cell, 1992. **68**(5): p. 829-40.
55. Popoff, V., Adolf, F., Brugger, B., & Wieland, F., *COPI budding within the Golgi stack*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(11): p. a005231.
56. Wang, C.W., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R., *Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast*. J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 973-83.
57. Brandizzi, F. & Barlowe, C., *Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(6): p. 382-92.
58. Rossanese, O.W., Soderholm, J., Bevis, B.J., Sears, I.B., O'Connor, J., Williamson, E.K., & Glick, B.S., *Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in Pichia pastoris and Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 69-81.
59. Connerly, P.L., Esaki, M., Montegna, E.A., Strongin, D.E., Levi, S., Soderholm, J., & Glick, B.S., *Sec16 is a determinant of transitional ER organization*. Curr Biol, 2005. **15**(16): p. 1439-47.

## Bibliografía

---

60. Nakano, A. & Muramatsu, M., *A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus.* J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2677-91.
61. Sato, K. & Nakano, A., *Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting.* FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2076-82.
62. Lee, M.C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R., *Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle.* Cell, 2005. **122**(4): p. 605-17.
63. Barlowe, C. & Schekman, R., *SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER.* Nature, 1993. **365**(6444): p. 347-9.
64. Futai, E., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R., *GTP/GDP exchange by Sec12p enables COPII vesicle bud formation on synthetic liposomes.* EMBO J, 2004. **23**(21): p. 4146-55.
65. Weissman, J.T., Plutner, H., & Balch, W.E., *The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export.* Traffic, 2001. **2**(7): p. 465-75.
66. Wendeler, M.W., Paccaud, J.P., & Hauri, H.P., *Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum.* EMBO Rep, 2007. **8**(3): p. 258-64.
67. Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R., *Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles.* Cell, 2003. **114**(4): p. 497-509.
68. Baines, A.C. & Zhang, B., *Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway.* Trends Biochem Sci, 2007. **32**(8): p. 381-8.
69. Bonfanti, L., Mironov, A.A., Jr., Martinez-Menarguez, J.A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H.J., et al., *Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation.* Cell, 1998. **95**(7): p. 993-1003.
70. Oka, T. & Nakano, A., *Inhibition of GTP hydrolysis by Sar1p causes accumulation of vesicles that are a functional intermediate of the ER-to-Golgi transport in yeast.* J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 425-34.
71. Morsomme, P. & Riezman, H., *The Rab GTPase Ypt1p and tethering factors couple protein sorting at the ER to vesicle targeting to the Golgi apparatus.* Dev Cell, 2002. **2**(3): p. 307-17.
72. Cai, Y., Chin, H.F., Lazarova, D., Menon, S., Fu, C., Cai, H., Sclafani, A., Rodgers, D.W., et al., *The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes.* Cell, 2008. **133**(7): p. 1202-13.
73. Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J.C., et al., *TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23.* Nature, 2007. **445**(7130): p. 941-4.
74. Wang, W., Sacher, M., & Ferro-Novick, S., *TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p.* J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 289-96.
75. Hardwick, K.G. & Pelham, H.R., *SED5 encodes a 39-kD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex.* J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 513-21.
76. Barlowe, C. & Helenius, A., *Cargo Capture and Bulk Flow in the Early Secretory Pathway.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2016. **32**: p. 197-222.
77. Spang, A., Herrmann, J.M., Hamamoto, S., & Schekman, R., *The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum.* Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 1035-45.

- 
78. Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P., & Kreis, T.E., *Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin*. Cell, 1991. **64**(3): p. 649-65.
79. Watson, P.J., Frigerio, G., Collins, B.M., Duden, R., & Owen, D.J., *Gamma-COP appendage domain - structure and function*. Traffic, 2004. **5**(2): p. 79-88.
80. Yu, W., Lin, J., Jin, C., & Xia, B., *Solution structure of human zeta-COP: direct evidences for structural similarity between COP I and clathrin-adaptor coats*. J Mol Biol, 2009. **386**(4): p. 903-12.
81. Lee, C. & Goldberg, J., *Structure of coatomer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats*. Cell, 2010. **142**(1): p. 123-32.
82. Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A., & Rothman, J.E., *ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein*. Cell, 1991. **67**(2): p. 239-53.
83. Yu, X., Breitman, M., & Goldberg, J., *A structure-based mechanism for Arf1-dependent recruitment of coatomer to membranes*. Cell, 2012. **148**(3): p. 530-42.
84. Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., & Chabre, M., *N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange*. Biochemistry, 1997. **36**(15): p. 4675-84.
85. Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., & Paris, S., *Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor*. J Biol Chem, 1996. **271**(3): p. 1573-8.
86. Paczkowski, J.E., Richardson, B.C., & Fromme, J.C., *Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis*. Trends Cell Biol, 2015.
87. Farquhar, M.G. & Palade, G.E., *The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage*. J Cell Biol, 1981. **91**(3 Pt 2): p. 77s-103s.
88. Glick, B.S. & Luini, A., *Models for Golgi traffic: a critical assessment*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(11): p. a005215.
89. Pelham, H.R. & Rothman, J.E., *The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin?* Cell, 2000. **102**(6): p. 713-9.
90. Marsh, B.J., Volkman, N., McIntosh, J.R., & Howell, K.E., *Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5565-70.
91. Patterson, G.H., Hirschberg, K., Polishchuk, R.S., Gerlich, D., Phair, R.D., & Lippincott-Schwartz, J., *Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1055-67.
92. Pfeffer, S.R., *How the Golgi works: a cisternal progenitor model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 19614-8.
93. Bigay, J. & Antonny, B., *Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity*. Dev Cell, 2012. **23**(5): p. 886-95.
94. van Meer, G., Voelker, D.R., & Feigenson, G.W., *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
95. Andersen, O.S. & Koeppe, R.E., 2nd, *Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 107-30.
96. McMahon, H.T. & Boucrot, E., *Membrane curvature at a glance*. J Cell Sci, 2015. **128**(6): p. 1065-70.
97. Simons, K. & Ikonen, E., *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
98. Bigay, J., Casella, J.F., Drin, G., Mesmin, B., & Antonny, B., *ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif*. EMBO J, 2005. **24**(13): p. 2244-53.
-

## Bibliografía

---

99. Johansen, J., Ramanathan, V., & Beh, C.T., *Vesicle trafficking from a lipid perspective: Lipid regulation of exocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. Cell Logist, 2012. **2**(3): p. 151-160.
100. Kearns, B.G., McGee, T.P., Mayinger, P., Gedvilaite, A., Phillips, S.E., Kagiwada, S., & Bankaitis, V.A., *Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 101-5.
101. Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., & Holthuis, J.C., *Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(4): p. 1632-42.
102. Sheetz, M.P. & Singer, S.J., *Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(11): p. 4457-61.
103. Chen, C.Y. & Graham, T.R., *An arf1Delta synthetic lethal screen identifies a new clathrin heavy chain conditional allele that perturbs vacuolar protein transport in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1998. **150**(2): p. 577-89.
104. Klemm, R.W., Ejsing, C.S., Surma, M.A., Kaiser, H.J., Gerl, M.J., Sampaio, J.L., de Robillard, Q., Ferguson, C., et al., *Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network*. J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 601-12.
105. Bagnat, M., Chang, A., & Simons, K., *Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(12): p. 4129-38.
106. Santiago-Tirado, F.H., Legesse-Miller, A., Schott, D., & Bretscher, A., *PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast*. Dev Cell, 2011. **20**(1): p. 47-59.
107. Silberstein, S. & Gilmore, R., *Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase*. FASEB J, 1996. **10**(8): p. 849-58.
108. Bause, E., *Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes*. Biochem J, 1983. **209**(2): p. 331-6.
109. Imperiali, B. & Rickert, K.W., *Conformational implications of asparagine-linked glycosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 97-101.
110. Imperiali, B. & O'Connor, S.E., *Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure*. Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**(6): p. 643-9.
111. Wormald, M.R. & Dwek, R.A., *Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability*. Structure, 1999. **7**(7): p. R155-60.
112. Paulson, J.C., *Glycoproteins: what are the sugar chains for?* Trends Biochem Sci, 1989. **14**(7): p. 272-6.
113. Guan, J.L., Machamer, C.E., & Rose, J.K., *Glycosylation allows cell-surface transport of an anchored secretory protein*. Cell, 1985. **42**(2): p. 489-96.
114. Helenius, A. & Aebi, M., *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2364-9.
115. Trombetta, E.S. & Helenius, A., *Lectins as chaperones in glycoprotein folding*. Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(5): p. 587-92.
116. Thiele, C., Gerdes, H.H., & Huttner, W.B., *Protein secretion: puzzling receptors*. Curr Biol, 1997. **7**(8): p. R496-500.
117. Morelle, W., Bernard, M., Debeaupuis, J.P., Buitrago, M., Tabouret, M., & Latge, J.P., *Galactomannoproteins of Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(7): p. 1308-16.
118. Deshpande, N., Wilkins, M.R., Packer, N., & Nevalainen, H., *Protein glycosylation pathways in filamentous fungi*. Glycobiology, 2008. **18**(8): p. 626-37.
119. Costachel, C., Coddeville, B., Latge, J.P., & Fontaine, T., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored fungal polysaccharide in Aspergillus fumigatus*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 39835-42.

- 
120. Wennerberg, K., Rossman, K.L., & Der, C.J., *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
  121. Behnia, R., Panic, B., Whyte, J.R., & Munro, S., *Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(5): p. 405-13.
  122. Chen, K.Y., Tsai, P.C., Hsu, J.W., Hsu, H.C., Fang, C.Y., Chang, L.C., Tsai, Y.T., Yu, C.J., et al., *Syt1p promotes activation of Arl1p at the late Golgi to recruit Imh1p*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 20): p. 3478-89.
  123. Panic, B., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Williams, R.L., & Munro, S., *Structural basis for Arl1-dependent targeting of homodimeric GRIP domains to the Golgi apparatus*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 863-74.
  124. Tsai, P.C., Hsu, J.W., Liu, Y.W., Chen, K.Y., & Lee, F.J., *Arl1p regulates spatial membrane organization at the trans-Golgi network through interaction with Arf-GEF Gea2p and flippase Drs2p*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. E668-77.
  125. Hoyt, M.A., Stearns, T., & Botstein, D., *Chromosome instability mutants of Saccharomyces cerevisiae that are defective in microtubule-mediated processes*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(1): p. 223-34.
  126. Wright, Z.C., Singh, R.K., Alpino, R., Goldberg, A.F., Sokolov, M., & Ramamurthy, V., *ARL3 regulates trafficking of prenylated phototransduction proteins to the rod outer segment*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(10): p. 2031-2044.
  127. Strom, S.P., Clark, M.J., Martinez, A., Garcia, S., Abelazeem, A.A., Matynia, A., Parikh, S., Sullivan, L.S., et al., *De Novo Occurrence of a Variant in ARL3 and Apparent Autosomal Dominant Transmission of Retinitis Pigmentosa*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150944.
  128. Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L., & Chabre, M., *A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 481-4.
  129. Peyroche, A., Paris, S., & Jackson, C.L., *Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 479-81.
  130. Mouratou, B., Biou, V., Joubert, A., Cohen, J., Shields, D.J., Geldner, N., Jurgens, G., Melancon, P., et al., *The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf*. BMC Genomics, 2005. **6**: p. 20.
  131. Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S., & Nakayama, K., *GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat*. Traffic, 2002. **3**(7): p. 483-95.
  132. Stalder, D. & Antonny, B., *Arf GTPase regulation through cascade mechanisms and positive feedback loops*. FEBS Lett, 2013. **587**(13): p. 2028-35.
  133. McDonold, C.M. & Fromme, J.C., *Four GTPases differentially regulate the Sec7 Arf-GEF to direct traffic at the trans-golgi network*. Dev Cell, 2014. **30**(6): p. 759-67.
  134. Mandiyan, V., Andreev, J., Schlessinger, J., & Hubbard, S.R., *Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta*. EMBO J, 1999. **18**(24): p. 6890-8.
  135. Papanikou, E. & Glick, B.S., *Golgi compartmentation and identity*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **29**: p. 74-81.
  136. Crottet, P., Meyer, D.M., Rohrer, J., & Spiess, M., *ARF1.GTP, tyrosine-based signals, and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate constitute a minimal machinery to recruit the AP-1 clathrin adaptor to membranes*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3672-82.
  137. Lee, I., Drake, M.T., Traub, L.M., & Kornfeld, S., *Cargo-sorting signals promote polymerization of adaptor protein-1 in an Arf-1.GTP-independent manner*. Arch Biochem Biophys, 2008. **479**(1): p. 63-8.
-

## Bibliografía

---

138. Costaguta, G., Duncan, M.C., Fernandez, G.E., Huang, G.H., & Payne, G.S., *Distinct roles for TGN/endosome epsin-like adaptors Ent3p and Ent5p*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(9): p. 3907-20.
139. Hirschberg, K., Miller, C.M., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E.D., Phair, R.D., & Lippincott-Schwartz, J., *Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells*. J Cell Biol, 1998. **143**(6): p. 1485-503.
140. Bard, F. & Malhotra, V., *The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 439-55.
141. Puertollano, R., van der Wel, N.N., Greene, L.E., Eisenberg, E., Peters, P.J., & Bonifacino, J.S., *Morphology and dynamics of clathrin/GGA1-coated carriers budding from the trans-Golgi network*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(4): p. 1545-57.
142. Paczkowski, J.E., Richardson, B.C., Strassner, A.M., & Fromme, J.C., *The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain*. EMBO J, 2012. **31**(21): p. 4191-203.
143. Castillon, G.A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T.M., & Riezman, H., *Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast*. Traffic, 2009. **10**(2): p. 186-200.
144. Watanabe, R., Funato, K., Venkataraman, K., Futerman, A.H., & Riezman, H., *Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49538-44.
145. Maeda, Y., Tashima, Y., Houjou, T., Fujita, M., Yoko-o, T., Jigami, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T., *Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): p. 1497-506.
146. Rivier, A.S., Castillon, G.A., Michon, L., Fukasawa, M., Romanova-Michaelides, M., Jaensch, N., Hanada, K., & Watanabe, R., *Exit of GPI-anchored proteins from the ER differs in yeast and mammalian cells*. Traffic, 2010. **11**(8): p. 1017-33.
147. Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., & Zurzolo, C., *Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins*. J Cell Biol, 2004. **167**(4): p. 699-709.
148. Paladino, S., Sarnataro, D., Tivodar, S., & Zurzolo, C., *Oligomerization is a specific requirement for apical sorting of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins but not for non-raft-associated apical proteins*. Traffic, 2007. **8**(3): p. 251-8.
149. Castillon, G.A., Michon, L., & Watanabe, R., *Apical sorting of lysoGPI-anchored proteins occurs independent of association with detergent-resistant membranes but dependent on their N-glycosylation*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(12): p. 2021-33.
150. Simons, K. & van Meer, G., *Lipid sorting in epithelial cells*. Biochemistry, 1988. **27**(17): p. 6197-202.
151. Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., & Ugalde, U., *Aspergillus nidulans asexual development: making the most of cellular modules*. Trends Microbiol, 2010. **18**(12): p. 569-76.
152. Todd, R.B., Davis, M.A., & Hynes, M.J., *Genetic manipulation of Aspergillus nidulans: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction*. Nat Protoc, 2007. **2**(4): p. 811-21.
153. Dyer, P.S. & O'Gorman, C.M., *Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from Aspergillus species*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(1): p. 165-92.
154. Yoshimi, A., Miyazawa, K., & Abe, K., *Cell wall structure and biogenesis in Aspergillus species*. Biosci Biotechnol Biochem, 2016. **80**(9): p. 1700-11.
155. Taheri-Talesh, N., Xiong, Y., & Oakley, B.R., *The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in Aspergillus nidulans*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31218.

156. Abenza, J.F., Pantazopoulou, A., Rodríguez, J.M., Galindo, A., & Peñalva, M.A., *Long-distance movement of Aspergillus nidulans early endosomes on microtubule tracks*. Traffic, 2009. **10**(1): p. 57-75.
157. Hervás-Aguilar, A. & Peñalva, M.A., *Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(10): p. 1504-18.
158. Lucena-Agell, D., Galindo, A., Arst, H.N., Jr., & Peñalva, M.A., *Aspergillus nidulans Ambient pH Signaling Does Not Require Endocytosis*. Eukaryot Cell, 2015. **14**(6): p. 545-53.
159. Peñalva, M.A., *A lipid-managing program maintains a stout Spitzenkorper*. Mol Microbiol, 2015.
160. Takeshita, N., Evangelinos, M., Zhou, L., Serizawa, T., Somera-Fajardo, R.A., Lu, L., Takaya, N., Nienhaus, G.U., et al., *Pulses of Ca<sup>2+</sup> coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(22): p. 5701-5706.
161. Schultzhause, Z., Yan, H., & Shaw, B.D., *Aspergillus nidulans flippase DnfA is cargo of the endocytic collar and plays complementary roles in growth and phosphatidylserine asymmetry with another flippase, DnfB*. Mol Microbiol, 2015.
162. Peñalva, M.A., *Tracing the endocytic pathway of Aspergillus nidulans with FM4-64*. Fungal Genet Biol, 2005. **42**(12): p. 963-75.
163. Peñalva, M.A., *Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward*. Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(6): p. 684-92.
164. Abenza, J.F., Galindo, A., Pantazopoulou, A., Gil, C., de los Ríos, V., & Peñalva, M.A., *Aspergillus RabB Rab5 integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(15): p. 2756-69.
165. Lee, S.C. & Shaw, B.D., *Localization and function of ADP ribosylation factor A in Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **283**(2): p. 216-22.
166. Pantazopoulou, A., *The Golgi apparatus: insights from filamentous fungi*. Mycologia, 2016. **108**(3): p. 603-22.
167. Pinar, M., Pantazopoulou, A., & Peñalva, M.A., *Live-cell imaging of Aspergillus nidulans autophagy: RAB1 dependence, Golgi independence and ER involvement*. Autophagy, 2013. **9**(7): p. 1024-43.
168. Levine, T.P. & Munro, S., *Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterol-binding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(6): p. 1633-44.
169. Markina-Iñarrairaegui, A., Pantazopoulou, A., Espeso, E.A., & Peñalva, M.A., *The Aspergillus nidulans peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67154.
170. López-Berges, M.S., Pinar, M., Abenza, J.F., Arst, H.N., Jr., & Peñalva, M.A., *The Aspergillus nidulans syntaxin PepA(Pep12) is regulated by two Sec1/Munc-18 proteins to mediate fusion events at early endosomes, late endosomes and vacuoles*. Mol Microbiol, 2016. **99**(1): p. 199-216.
171. Gremillion, S.K., Harris, S.D., Jackson-Hayes, L., Kaminskyj, S.G., Loprete, D.M., Gauthier, A.C., Mercer, S., Ravita, A.J., et al., *Mutations in proteins of the Conserved Oligomeric Golgi Complex affect polarity, cell wall structure, and glycosylation in the filamentous fungus Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol, 2014. **73**: p. 69-82.
172. Whittaker, S.L., Lunness, P., Milward, K.J., Doonan, J.H., & Assinder, S.J., *sodVIC is an alpha-COP-related gene which is essential for establishing and maintaining polarized growth in Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol, 1999. **26**(3): p. 236-52.
173. Abenza, J.F., Galindo, A., Pinar, M., Pantazopoulou, A., de los Ríos, V., & Peñalva, M.A., *Endosomal maturation by Rab conversion in Aspergillus nidulans is coupled to dynein-mediated basipetal movement*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(10): p. 1889-901.

## Bibliografía

---

174. Zhang, J., Zhuang, L., Lee, Y., Abenza, J.F., Peñalva, M.A., & Xiang, X., *The microtubule plus-end localization of Aspergillus dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 20): p. 3596-604.
175. Cove, D.J., *The induction and repression of nitrate reductase in the fungus Aspergillus nidulans*. Biochim Biophys Acta, 1966. **113**(1): p. 51-6.
176. Mooney, J.L. & Yager, L.N., *Light is required for conidiation in Aspergillus nidulans*. Genes Dev, 1990. **4**(9): p. 1473-82.
177. Araújo-Bazán, L., Peñalva, M.A., & Espeso, E.A., *Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol, 2008. **67**(4): p. 891-905.
178. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
179. Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., & Davies, R.W., *Transformation by integration in Aspergillus nidulans*. Gene, 1983. **26**(2-3): p. 205-21.
180. McCluskey, K., *The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules*. Adv Appl Microbiol, 2003. **52**: p. 245-62.
181. Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., & Oakley, B.R., *Fusion PCR and gene targeting in Aspergillus nidulans*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 3111-20.
182. Bolte, S. & Cordelieres, F.P., *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. J Microsc, 2006. **224**(Pt 3): p. 213-32.
183. Robert, X. & Gouet, P., *Deciphering key features in protein structures with the new ENDScript server*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Web Server issue): p. W320-4.
184. Barlowe, C.K. & Miller, E.A., *Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway*. Genetics, 2013. **193**(2): p. 383-410.
185. Sims, A.H., Gent, M.E., Lanthaler, K., Dunn-Coleman, N.S., Oliver, S.G., & Robson, G.D., *Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by Aspergillus nidulans and the unfolded-protein response in vivo*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2737-47.
186. Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., et al., *Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome*. Nature, 2002. **418**(6896): p. 387-91.
187. Osmani, A.H., Oakley, B.R., & Osmani, S.A., *Identification and analysis of essential Aspergillus nidulans genes using the heterokaryon rescue technique*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2517-26.
188. Mackay, E.M. & Pateman, J.A., *The regulation of urease activity in Aspergillus nidulans*. Biochem Genet, 1982. **20**(7-8): p. 763-76.
189. Huang, M., Weissman, J.T., Beraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I.A., et al., *Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export*. J Cell Biol, 2001. **155**(6): p. 937-48.
190. Saraste, M., Sibbald, P.R., & Wittinghofer, A., *The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(11): p. 430-4.
191. Via, A., Ferre, F., Brannetti, B., Valencia, A., & Helmer-Citterich, M., *Three-dimensional view of the surface motif associated with the P-loop structure: cis and trans cases of convergent evolution*. J Mol Biol, 2000. **303**(4): p. 455-65.
192. Schlacht, A. & Dacks, J.B., *Unexpected ancient paralogues and an evolutionary model for the COPII coat complex*. Genome Biol Evol, 2015.
193. Sato, K., Sato, M., & Nakano, A., *Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes*, in Mol Biol Cell 2003. p. 3605-16.

- 
194. Ishii, M., Suda, Y., Kurokawa, K., & Nakano, A., *COPI is essential for Golgi cisternal maturation and dynamics*. J Cell Sci, 2016. **129**(17): p. 3251-61.
195. Hamer, E.C., Moore, C.B., & Denning, D.W., *Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(2): p. 181-4.
196. Saito, Y., Yamanushi, T., Oka, T., & Nakano, A., *Identification of SEC12, SED4, truncated SEC16, and EKS1/HRD3 as multicopy suppressors of ts mutants of Sar1 GTPase*. J Biochem, 1999. **125**(1): p. 130-7.
197. Lee, S.C., Schmidtke, S.N., Dangott, L.J., & Shaw, B.D., *Aspergillus nidulans ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(8): p. 1278-88.
198. Lee, S.C. & Shaw, B.D., *ArfB links protein lipidation and endocytosis to polarized growth of Aspergillus nidulans*. Commun Integr Biol, 2008. **1**(1): p. 51-2.
199. McMahan, C., Studer, S.M., Clendinen, C., Dann, G.P., Jeffrey, P.D., & Hughson, F.M., *The structure of Sec12 implicates potassium ion coordination in Sar1 activation*. J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43599-606.
200. Tusnady, G.E. & Simon, I., *Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction*. J Mol Biol, 1998. **283**(2): p. 489-506.
201. Stearns, T., Kahn, R.A., Botstein, D., & Hoyt, M.A., *ADP ribosylation factor is an essential protein in Saccharomyces cerevisiae and is encoded by two genes*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(12): p. 6690-9.
202. Benjamin, J.J., Poon, P.P., Drysdale, J.D., Wang, X., Singer, R.A., & Johnston, G.C., *Dysregulated Arl1, a regulator of post-Golgi vesicle tethering, can inhibit endosomal transport and cell proliferation in yeast*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(13): p. 2337-47.
203. Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C., & Schekman, R., *SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus*. J Biol Chem, 1988. **263**(24): p. 11711-7.
204. Harris, S.D., Morrell, J.L., & Hamer, J.E., *Identification and characterization of Aspergillus nidulans mutants defective in cytokinesis*. Genetics, 1994. **136**(2): p. 517-32.
205. Kaminskyj, S.G. & Hamer, J.E., *hyp loci control cell pattern formation in the vegetative mycelium of Aspergillus nidulans*. Genetics, 1998. **148**(2): p. 669-80.
206. Zhao, X., Lasell, T.K., & Melancon, P., *Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 119-33.
207. Ackema, K.B., Sauder, U., Solinger, J.A., & Spang, A., *The ArfGEF GBF-1 Is Required for ER Structure, Secretion and Endocytic Transport in C. elegans*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67076.
208. Chantalat, S., Courbeyrette, R., Senic-Matuglia, F., Jackson, C.L., Goud, B., & Peyroche, A., *A novel Golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(6): p. 2357-71.
209. Panic, B., Whyte, J.R., & Munro, S., *The ARF-like GTPases Arl1p and Arl3p act in a pathway that interacts with vesicle-tethering factors at the Golgi apparatus*. Curr Biol, 2003. **13**(5): p. 405-10.
210. Lee, H.H., Park, J.S., Chae, S.K., Maeng, P.J., & Park, H.M., *Aspergillus nidulans sod(VI)C1 mutation causes defects in cell wall biogenesis and protein secretion*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **208**(2): p. 253-7.
211. Rambourg, A., Clermont, Y., Jackson, C.L., & Kepes, F., *Effects of brefeldin A on the three-dimensional structure of the Golgi apparatus in a sensitive strain of Saccharomyces cerevisiae*. Anat Rec, 1995. **241**(1): p. 1-9.
212. Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., Bloom, G.S., Kreis, T.E., & Klausner, R.D., *Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2295-306.
-

## Bibliografía

---

213. Borgia, P.T., Iartchouk, N., Riggle, P.J., Winter, K.R., Koltin, Y., & Bulawa, C.E., *The chsB gene of Aspergillus nidulans is necessary for normal hyphal growth and development*. Fungal Genet Biol, 1996. **20**(3): p. 193-203.
214. Takeshita, N., Wernet, V., Tsuizaki, M., Grun, N., Hoshi, H.O., Ohta, A., Fischer, R., & Horiuchi, H., *Transportation of Aspergillus nidulans Class III and V Chitin Synthases to the Hyphal Tips Depends on Conventional Kinesin*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125937.
215. Morton, W.M., Ayscough, K.R., & McLaughlin, P.J., *Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 376-8.
216. Bretscher, A., *Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(11): p. 6849-53.
217. Adams, A.E., Botstein, D., & Drubin, D.G., *Requirement of yeast fimbrin for actin organization and morphogenesis in vivo*. Nature, 1991. **354**(6352): p. 404-8.
218. Upadhyay, S. & Shaw, B.D., *The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol, 2008. **68**(3): p. 690-705.
219. Kaksonen, M., Sun, Y., & Drubin, D.G., *A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization*. Cell, 2003. **115**(4): p. 475-87.
220. Kurtz, A.K. & Mayo, S.T., *Pearson Product Moment Coefficient of Correlation*, en *Statistical Methods in Education and Psychology*. 1979, Springer New York: New York, NY. p. 192-277.
221. Lewis, M.J., Nichols, B.J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., & Pelham, H.R., *Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 23-38.
222. Sanchez-Leon, E., Bowman, B., Seidel, C., Fischer, R., Novick, P., & Riquelme, M., *The Rab GTPase YPT-1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkorper microvesicles in Neurospora crassa*. Mol Microbiol, 2015. **95**(3): p. 472-90.
223. Xu, P., Baldrige, R.D., Chi, R.J., Burd, C.G., & Graham, T.R., *Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport*. J Cell Biol, 2013. **202**(6): p. 875-86.
224. Lopez-Berges, M.S., Arst, H.N., Pinar, M., & Penalva, M.A., *Genetic studies on the physiological role of CORVET in Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett, 2017.
225. Xiang, X., Qiu, R., Yao, X., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A., & Zhang, J., *Cytoplasmic dynein and early endosome transport*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(17): p. 3267-80.
226. Zhang, J., Qiu, R., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A., & Xiang, X., *HookA is a novel dynein-early endosome linker critical for cargo movement in vivo*. J Cell Biol, 2014. **204**(6): p. 1009-26.
227. Hettema, E.H., Lewis, M.J., Black, M.W., & Pelham, H.R., *Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes*. EMBO J, 2003. **22**(3): p. 548-57.
228. Bonifacino, J.S. & Rojas, R., *Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 568-79.
229. Conibear, E. & Stevens, T.H., *Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 305-23.
230. Siniosoglou, S. & Pelham, H.R., *Vps51p links the VFT complex to the SNARE Tlg1p*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48318-24.
231. Siniosoglou, S. & Pelham, H.R., *An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes*. EMBO J, 2001. **20**(21): p. 5991-8.
232. Chen, J.S., Saxton, J., Hemming, F.W., & Peberdy, J.F., *Purification and partial characterization of the high and low molecular weight form (S- and F-form) of*

- invertase secreted by Aspergillus nidulans*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1296**(2): p. 207-18.
233. Vainstein, M.H. & Peberdy, J.F., *Solubilisation of a cell wall bound invertase in Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett, 1990. **59**(3): p. 265-9.
234. Nagem, R.A., Rojas, A.L., Golubev, A.M., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Neustroev, K.N., & Polikarpov, I., *Crystal structure of exo-inulinase from Aspergillus awamori: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition*. J Mol Biol, 2004. **344**(2): p. 471-80.
235. Esmon, B., Novick, P., & Schekman, R., *Compartmentalized assembly of oligosaccharides on exported glycoproteins in yeast*. Cell, 1981. **25**(2): p. 451-60.
236. Ettalibi, M. & Baratti, J.C., *Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from aspergillus ficuum*. Enzyme Microb Technol, 2001. **28**(7-8): p. 596-601.
237. Vainstein, M.H. & Peberdy, J.F., *Regulation of invertase in Aspergillus nidulans: effect of different carbon sources*. J Gen Microbiol, 1991. **137**(2): p. 315-21.
238. Gibson, R.K. & Peberdy, J.F., *Fine structure of protoplasts of Aspergillus nidulans*. J Gen Microbiol, 1972. **72**(3): p. 529-38.
239. Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., & Plummer, T.H., Jr., *Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases*. Anal Biochem, 1989. **180**(2): p. 195-204.
240. Miller, V.J. & Ungar, D., *Re'COG'nition at the Golgi*. Traffic, 2012. **13**(7): p. 891-7.
241. Whyte, J.R. & Munro, S., *The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic*. Dev Cell, 2001. **1**(4): p. 527-37.
242. Ungar, D., Oka, T., Krieger, M., & Hughson, F.M., *Retrograde transport on the COG railway*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(2): p. 113-20.
243. Yoon, J., Aishan, T., Maruyama, J., & Kitamoto, K., *Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filamentous fungus Aspergillus oryzae via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene Aovps10*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(17): p. 5718-27.
244. de Groot, P.W., Brandt, B.W., Horiuchi, H., Ram, A.F., de Koster, C.G., & Klis, F.M., *Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol, 2009. **46 Suppl 1**: p. S72-81.
245. Hurtado-Guerrero, R., Schuttelkopf, A.W., Mouyna, I., Ibrahim, A.F., Shepherd, S., Fontaine, T., Latge, J.P., & van Aalten, D.M., *Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling*. J Biol Chem, 2009. **284**(13): p. 8461-9.
246. Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 14882-9.
247. Martinez-Nunez, L. & Riquelme, M., *Role of BGT-1 and BGT-2, two predicted GPI-anchored glycoside hydrolases/glycosyltransferases, in cell wall remodeling in Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol, 2015. **85**: p. 58-70.
248. Mouyna, I., Morelle, W., Vai, M., Monod, M., Lechenne, B., Fontaine, T., Beauvais, A., Sarfati, J., et al., *Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol, 2005. **56**(6): p. 1675-88.
249. Receveur-Brechot, V., Czjzek, M., Barre, A., Roussel, A., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., & Rouge, P., *Crystal structure at 1.45-A resolution of the major allergen endo-beta-1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome*. Proteins, 2006. **63**(1): p. 235-42.

## Bibliografía

---

250. Ortiz, D., Medkova, M., Walch-Solimena, C., & Novick, P., *Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast.* J Cell Biol, 2002. **157**(6): p. 1005-15.
251. Yamanushi, T., Hirata, A., Oka, T., & Nakano, A., *Characterization of yeast sar1 temperature-sensitive mutants, which are defective in protein transport from the endoplasmic reticulum.* J Biochem, 1996. **120**(2): p. 452-8.
252. Saito, Y., Kimura, K., Oka, T., & Nakano, A., *Activities of mutant Sar1 proteins in guanine nucleotide binding, GTP hydrolysis, and cell-free transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus.* J Biochem, 1998. **124**(4): p. 816-23.
253. Manzano-Lopez, J., Perez-Linero, A.M., Aguilera-Romero, A., Martin, M.E., Okano, T., Silva, D.V., Seeberger, P.H., Riezman, H., et al., *COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation.* Curr Biol, 2015. **25**(2): p. 152-62.
254. Cole, G.T., *Patterns of development in conidial fungi / Garry T. Cole and Robert A. Samson*, ed. R.A. Samson. 1979, London ; San Francisco: Pitman.
255. Wilson, R.A. & Talbot, N.J., *Under pressure: investigating the biology of plant infection by Magnaporthe oryzae.* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(3): p. 185-95.
256. Staib, P. & Morschhauser, J., *Chlamydospore formation in Candida albicans and Candida dubliniensis--an enigmatic developmental programme.* Mycoses, 2007. **50**(1): p. 1-12.
257. Shannon, J.L., *Scanning and transmission electron microscopy of Candida albicans chlamydospores.* J Gen Microbiol, 1981. **125**(1): p. 199-203.
258. BAINBRIDGE, B.P.V.A.B.W., *The Relevance of a Study of a Temperature-sensitive Ballooning Mutant of Aspergillus nidulans Defective in Mannose Metabolism to our Understanding of Mannose as a Wall Component and Carbon/Energy Source* 1978.
259. Markham, P. & Bainbridge, B.W., *Effect of choline deprivation on the growth, morphology and ultrastructure of a choline-requiring mutant of Aspergillus nidulans.* FEMS Microbiology Letters, 1992. **90**(3): p. 217-222.
260. Tao, L., Gao, N., Chen, S., & Yu, J.-H., *The choC gene encoding a putative phospholipid methyltransferase is essential for growth and development in Aspergillus nidulans.* Current Genetics, 2010. **56**(3): p. 283-296.
261. Ruohola, H. & Ferro-Novick, S., *Sec53, a protein required for an early step in secretory protein processing and transport in yeast, interacts with the cytoplasmic surface of the endoplasmic reticulum.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8468-72.
262. Glick, B.S. & Malhotra, V., *The curious status of the Golgi apparatus.* Cell, 1998. **95**(7): p. 883-9.
263. Gerich, B., Orci, L., Tschochner, H., Lottspeich, F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Wieland, F., & Harter, C., *Non-clathrin-coat protein alpha is a conserved subunit of coatamer and in Saccharomyces cerevisiae is essential for growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3229-33.
264. Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., & O'Shea, E.K., *Global analysis of protein localization in budding yeast.* Nature, 2003. **425**(6959): p. 686-91.
265. Valdivia, R.H., Baggott, D., Chuang, J.S., & Schekman, R.W., *The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins.* Dev Cell, 2002. **2**(3): p. 283-94.
266. Foote, C. & Nothwehr, S.F., *The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast.* J Cell Biol, 2006. **173**(4): p. 615-26.
267. Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S.F., & Graham, T.R., *P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3526-35.

- 
268. Barfield, R.M., Fromme, J.C., & Schekman, R., *The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(23): p. 4985-96.
269. Ritz, A.M., Trautwein, M., Grassinger, F., & Spang, A., *The prion-like domain in the exomer-dependent cargo Pin2 serves as a trans-Golgi retention motif*. Cell Rep, 2014. **7**(1): p. 249-60.
270. Daboussi, L., Costaguta, G., & Payne, G.S., *Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(3): p. 239-48.
271. Jones, B., Jones, E.L., Bonney, S.A., Patel, H.N., Mensenkamp, A.R., Eichenbaum-Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., et al., *Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 29-31.
272. Hoyt, M.A., Macke, J.P., Roberts, B.T., & Geiser, J.R., *Saccharomyces cerevisiae PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability*. Genetics, 1997. **146**(3): p. 849-57.
273. Peyroche, A., Courbeyrette, R., Rambourg, A., & Jackson, C.L., *The ARF exchange factors Gea1p and Gea2p regulate Golgi structure and function in yeast*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 12): p. 2241-53.
274. Hsu, N.Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., et al., *Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication*. Cell, 2010. **141**(5): p. 799-811.
275. Mazaki, Y., Nishimura, Y., & Sabe, H., *GBF1 bears a novel phosphatidylinositol-phosphate binding module, BP3K, to link PI3Kgamma activity with Arf1 activation involved in GPCR-mediated neutrophil chemotaxis and superoxide production*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(13): p. 2457-67.
276. Roncero, C., Sanchez-Diaz, A., & Valdivieso, M.-H., *Chitin Synthesis and Fungal Cell Morphogenesis*, en *Biochemistry and Molecular Biology*, D. Hoffmeister, Editor. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 167-190.
277. Schuster, M., Martin-Urdiroz, M., Higuchi, Y., Hacker, C., Kilaru, S., Gurr, S.J., & Steinberg, G., *Co-delivery of cell-wall-forming enzymes in the same vesicle for coordinated fungal cell wall formation*. Nat Microbiol, 2016. **1**: p. 16149.
278. Bouchet, J., McCaffrey, M.W., Graziani, A., & Alcover, A., *The functional interplay of Rab11, FIP3 and Rho proteins on the endosomal recycling pathway controls cell shape and symmetry*. Small GTPases, 2016: p. 1-6.
279. Chen, S.H., Chen, S., Tokarev, A.A., Liu, F., Jedd, G., & Segev, N., *Ypt31/32 GTPases and their novel F-box effector protein Rcy1 regulate protein recycling*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 178-92.
280. Horgan, C.P., Hanscom, S.R., Jolly, R.S., Futter, C.E., & McCaffrey, M.W., *Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 2): p. 181-91.
281. Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., & Parton, R.G., *Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 913-24.
282. Bielska, E., Schuster, M., Roger, Y., Berepiki, A., Soanes, D.M., Talbot, N.J., & Steinberg, G., *Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes*. J Cell Biol, 2014. **204**(6): p. 989-1007.
283. Egan, M.J., Tan, K., & Reck-Peterson, S.L., *Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport*. J Cell Biol, 2012. **197**(7): p. 971-82.
284. Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., & Steinberg, G., *A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends*. EMBO J, 2006. **25**(11): p. 2275-86.
285. Zhang, J., Yao, X., Fischer, L., Abenza, J.F., Penalva, M.A., & Xiang, X., *The p25 subunit of the dynactin complex is required for dynein-early endosome interaction*. J Cell Biol, 2011. **193**(7): p. 1245-55.
-

## Bibliografía

---

286. Ha, J.Y., Chou, H.T., Ungar, D., Yip, C.K., Walz, T., & Hughson, F.M., *Molecular architecture of the complete COG tethering complex*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(8): p. 758-60.
287. Suvorova, E.S., Duden, R., & Lupashin, V.V., *The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins*. J Cell Biol, 2002. **157**(4): p. 631-43.
288. Willett, R., Ungar, D., & Lupashin, V., *The Golgi puppet master: COG complex at center stage of membrane trafficking interactions*. Histochem Cell Biol, 2013. **140**(3): p. 271-83.
289. Laufman, O., Hong, W., & Lev, S., *The COG complex interacts directly with Syntaxin 6 and positively regulates endosome-to-TGN retrograde transport*. J Cell Biol, 2011. **194**(3): p. 459-72.
290. Gaynor, E.C. & Emr, S.D., *COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants*. J Cell Biol, 1997. **136**(4): p. 789-802.
291. Xu, C. & Ng, D.T., *Glycosylation-directed quality control of protein folding*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(12): p. 742-52.
292. Bruns, C., McCaffery, J.M., Curwin, A.J., Duran, J.M., & Malhotra, V., *Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion*. J Cell Biol, 2011. **195**(6): p. 979-92.
293. Malhotra, V., *Unconventional protein secretion: an evolving mechanism*. EMBO J, 2013. **32**(12): p. 1660-4.
294. Cruz-Garcia, D., Curwin, A.J., Popoff, J.F., Bruns, C., Duran, J.M., & Malhotra, V., *Remodeling of secretory compartments creates CUPS during nutrient starvation*. J Cell Biol, 2014. **207**(6): p. 695-703.
295. Thibault, G. & Ng, D.T., *The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
296. Rothman, J.H. & Stevens, T.H., *Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway*. Cell, 1986. **47**(6): p. 1041-51.
297. Apostolaki, A., Erpapazoglou, Z., Harispe, L., Billini, M., Kafasla, P., Kizis, D., Peñalva, M.A., Scazzocchio, C., et al., *AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of Aspergillus nidulans, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis*. Eukaryot Cell, 2009. **8**(3): p. 339-52.