

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

**Respuesta al estrés catiónico en *Aspergillus nidulans*:
estudio del proceso de señalización del factor transcripcional SlmA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Mellado Maroñas

Director

Eduardo Antonio Espeso Fernández

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**Respuesta al estrés catiónico en *Aspergillus nidulans*:
estudio del proceso de señalización del factor
transcripcional SltA**



Tesis Doctoral

Laura Mellado Maroñas

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**Respuesta al estrés catiónico en *Aspergillus nidulans*:
estudio del proceso de señalización del factor
transcripcional SltA**



Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

Laura Mellado Maroñas

Madrid, 2014

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Eduardo A. Espeso Fernández
Científico Titular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC bajo la dirección del Dr. Eduardo A. Espeso Fernández, Científico titular del CSIC.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos de la Dirección general de Investigación a través de los proyectos BFU (2009)-08701 y BFU (2012)-33142 y por una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del MICINN a la doctoranda Laura Mellado Maroñas.

ABREVIATURAS

aa:	Aminoácido
Af:	<i>Aspergillus fumigatus</i>
cf:	Concentración final
CDS:	"Coding sequence" (Secuencia codificante)
Ckl:	"Casein kinase I" (Caseína quinasa I)
Crz:	"Calcineurin-responsive zinc finger protein"
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DBD:	"DNA binding domain" (Domino de union a DNA)
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilen diamino tetra-acético
ESCRT:	"Endosomal sorting complex required for transport"
FfK:	"Filamentous fungal kinase" (Quinasas de hongos filamentosos)
Fig.:	Figura
FT:	Factor transcripcional
gDNA:	Ácido desoxirribonucleico genómico
GFP:	"Green fluorescent protein" (proteína fluorescente verde)
HA:	Residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana
HEPES:	Ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperazinetanosulfónico
HMM:	"Hidden Markov Model" (Modelo oculto de Markov)
Hxq:	Hexoquinasa
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb:	Kilobases
kDa:	kiloDalton
MCA:	Medio completo de <i>Aspergillus</i>
mCh:	"Monomeric cherry fluorescent protein" (proteína rojo cereza fluorescente monomérica)
min:	Minutos
MFA:	Medio de fermentación de <i>Aspergillus</i>
MMA:	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i>
MMA*:	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i> adaptado
MMR:	Medio mínimo de regeneración
MMR-TOP:	Medio mínimo de regeneración-TOP
MOPS:	Ácido 3-[N-Morfolino]-propanosulfónico
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
Myc:	Residuos 408-439 de la proteína p62c-myc humana
NES:	"Nuclear export sequences (señal de exportación nuclear)
Nrf1:	"Nuclear factor-erythroid 2 -related factor 1"
ORF:	"Open reading frame" (fase de lectura abierta)
PABA:	Ácido p-aminobenzoico
PAGE:	"Polyacrylamide gel electrophoresis" (Electroforesis en gel de poliacrilamida)

pb:	Par de bases
PEG:	Polietilenglicol
PCR:	<i>"Polymerase chain reaction"</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PkcA	<i>"Protein kinase C alpha type"</i> (Proteína quinasa C tipo <i>alpha</i>)
PSA:	Persulfato amónico
p/v:	peso/volumen
rpm:	Revoluciones por minuto
RNA:	Ácido ribonucleico
RNAsa:	Ribonucleasa
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
TCA:	Ácido tricloroacético
TEMED:	N, N, N, N-tetrametilendiamina
MPT:	Modificación postraducciona
Tris:	Tris (hidroximetil)-aminometano
UAS:	<i>"Upstream activation sequence"</i> (Secuencia corriente arriba activadora)
UTR:	<i>"Untranslated region"</i> (región no traducida)
UV:	Ultravioleta
Vps:	<i>"Vesicular sorting protein"</i>
v/v:	volumen/volumen
Zf:	Zinc finger (dedo de zinc)
Zf-ACR:	<i>"zinc-finger-adjacent conserved region"</i> (región conservada adyacente al dedo de zinc)

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

Índice

Resumen	3
Summary	15
Introducción	
1. <i>Aspergillus nidulans</i>	29
2. Homeostasis de cationes	32
2.1. Regulación génica por estrés ambiental mediada por PacC	33
2.2 Regulación génica por estrés ambiental mediada por CrzA	35
2.3 Regulación génica por estrés ambiental mediada por SlrA	37
2.4 Las modificaciones postraduccionales como mecanismo de regulación de la actividad de los factores transcripcionales.....	39
3. Antecedentes al trabajo elaborado en esta tesis doctoral sobre el gen <i>sltB</i>	43
Objetivos	47
Materiales y Métodos	
1. Medios y condiciones de cultivo	53
1.1 Medios y condiciones de cultivo para <i>Aspergillus nidulans</i>	53
1.2 Soluciones y suplementos para medios de <i>Aspergillus</i>	55
1.3. Ensayos de estrés osmótico	56
2. Condiciones y medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	57
3. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados	57
3.1 Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	57
3.2 Plásmidos	60
3.3 Oligonucleótidos	62
3.4. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	65
4. Técnicas específicas utilizadas en <i>Aspergillus nidulans</i>	65
4.1 Obtención de cepas mediante transformación	65
4.2 Obtención de cepas diploides	66
4.3 Obtención de cepas mediante cruce.....	67
5. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....	68

5.1 Construcción de casetes de transformación para generar cepas mutantes de <i>A. nidulans</i>	68
5.2 Mutagénesis dirigida <i>in vitro</i>	71
5.3 Aislamiento de DNA genómico de <i>A. nidulans</i>	71
5.4 “Southern- blot”	72
5.5 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	73
5.6 Extracción de RNA total de <i>A. nidulans</i>	73
5.7 “Northern-blot”	74
6. Aislamiento y manipulación de proteínas de <i>A. nidulans</i>	75
6.1 Extracción de proteína total.....	75
6.2 Ensayo de inmunodetección de proteínas, Western-blot	76
6.3. Ensayo <i>in vitro</i> de desfosforilación	77
7. Fraccionamiento subcelular	78
8. Análisis del contenido interno y del flujo de cationes alcalinos mediante espectroscopía de absorción atómica (AA).....	79
8.1 Medida del contenido interno de K ⁺ y Li ⁺	79
8.2 Medida del flujo de salida de Li ⁺	80
9. Microscopía de fluorescencia	80
10. Herramientas bioinformáticas	81

Resultados: Capítulo 1 .Análisis funcional del gen *sltB*

1.1 Análisis funcional del gen <i>sltB</i>	85
1.1.1. Generación del alelo nulo <i>sltB</i>	85
1.1.2. Generación del mutante nulo <i>sltA</i> y el doble mutante nulo <i>sltB;sltA</i>	85
1.1.3. SltA y SltB, dos miembros de la ruta Slt	86
1.2. Análisis del contenido interno y de los flujos de cationes alcalinos	88
1.2.1. Requerimiento de K ⁺ en el crecimiento de las cepas Δ <i>sltA</i> y Δ <i>sltB</i>	88
1.2.2 Determinación del contenido interno de K ⁺ en las cepas mutantes Δ <i>sltA</i> y Δ <i>sltB</i> ..	89

1.2.3. Determinación del contenido interno y el flujo de salida del catión Li ⁺ en las cepas mutantes <i>ΔsltA</i> y <i>ΔsltB</i>	91
--	----

Resultados: Capítulo 2. La proteína SltB

2.1. Posibles dominios funcionales en SltB	98
2.2 Distribución filogenética de los posibles homólogos de SltB.....	101

Resultados: Capítulo 3. La proteólisis como mecanismo molecular de señalización

3.1. Estudio funcional de formas etiquetadas de SltA y SltB	107
3.1.1 Construcción de cepas que expresan formas etiquetadas de SltA y/o SltB.....	107
3.1.2 Formas de la proteína SltA presentes en la célula	107
3.1.3 Diferentes formas de SltB también están presentes en la célula	109
3.2. Relación funcional entre las diferentes formas celulares de SltA y SltB.....	113
3.3 SltA, el efector final de la ruta Slt.....	115
3.4 Estudio funcional de los dominios de SltB	118
3.4.1 Estudio funcional del dominio pseudoquinasa de SltB (SltB ^{Psk})	118
3.4.2 Estudio funcional del dominio proteasa de SltB (SltB ^{Prot})	123
3.5 Estudio de la triada catalítica de SltB	129
3.6 Generación de un alelo mutante de SltA que mimetiza la forma de 32 kDa.....	132
3.7 Expresión condicional de formas truncadas SltA ^{32kDa}	135
3.8 Estudio de la relación funcional entre SltA ^{32 kDa} y SltB	137

Resultados: Capítulo 4. La señalización del sistema Slt en respuesta al estrés

4.1 Efecto del estrés por cationes y de la alcalinización en la señalización de las proteínas SltA y SltB.	143
4.2 Efecto del estrés sobre la transcripción de los genes <i>sltA</i> y <i>sltB</i>	145
4.3 Modificación postraducciona de SltA ^{32kDa}	149

Resultados: Capítulo 5. Estudios adicionales del sistema Slt

A) Determinación de la localización celular de SltA y SltB	153
5.1 Localización celular de SltA	153
5.2 Localización celular de SltB	159

B) Estudio de la relación entre SltA, CrzA y PacC.....	162
5.3 La sensibilidad a la alcalinización del medio causada por la ausencia de función SltA no puede ser suprimida por la activación constitutiva de PacC.....	163
5.4 Evidencia de la ausencia de relación entre las funciones y la señalización de CrzA y de SltA.....	165
C) Estudio de la posible función de PskA en el sistema Slt de respuesta a estrés catiónico.	167
Discusión	
1. Del modelo genético al modelo molecular	173
2. Naturaleza y dinámica de la señalización de las proteínas Slt	177
3. La actividad proteasa de SltB	179
4. Regulación de la actividad de SltA. Regiones funcionales	183
5. Búsqueda de nuevos componentes de la ruta Slt.....	188
Conclusiones	193
Bibliografía	197

Resumen

1. Introducción

La habilidad de las células para sentir y responder adecuadamente a los cambios ambientales es esencial para la continuidad de los procesos metabólicos necesarios para la vida. Los estreses abióticos son causados por elementos naturales no producidos directamente por los organismos. Entre ellos, y que resultan más interesantes para este trabajo, es la presencia de elevadas concentraciones extracelulares de cationes mono y divalentes, y el pH ambiental, el cual es un efecto directo de la concentración de iones hidrógeno [1]

Los microorganismos han desarrollado sistemas homeostáticos que les permiten mantener las concentraciones intracelulares de iones relativamente constantes en respuesta a cambios en las condiciones externas. Estos han sido clasificados según su capacidad para tolerar diferentes concentraciones de iones, y entre ellos, destaca el organismo modelo utilizado en esta tesis *Aspergillus nidulans*, capaz de tolerar cantidades moderadas de un amplio rango de cationes, desde concentraciones de uno molar de sodio o potasio, hasta concentraciones del orden milimolar de manganeso o hierro [2], así como un amplio rango de valores de pH ambiental, desde pH 2,5 hasta 10,5 [3].

En *A. nidulans* la respuesta a pH ambiental está regulada por los factores de transcripción PacC, CrzA y SltA. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Rim101p y Crz1p, PacC y CrzA respectivamente, median la respuesta a pH alcalino, y este último también está involucrado en la regulación de los cationes intracelulares. Sin embargo, en *A. nidulans* esta función reguladora se reparte entre SltA y CrzA [2]. SltA pertenece a la clase de factores de transcripción con dedos de zinc como dominio de unión a DNA, y cuya distribución filogenética es específica de hongos filamentosos, mientras que PacC y CrzA muestran una distribución filogenética más extensa.

SltA complementa los defectos de la mutación *sltA1*, como sensibilidad a NaCl, arginina, luz UV y al agente alquilante N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina [4]. SltA comparte significativa similitud con el factor transcripcional Ace1 de *Hypocrea jecorina* (~ 58 %) pero sus funciones son muy diferentes; mientras que Ace1 controla la utilización de celulosa [5], SltA controla la respuesta a estrés abiótico. Estudios más extensos desarrollados por el grupo han revelado que la delección del gen *sltA* causa sensibilidad a pH alcalino, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Li^+ y Cs^+ , pero no a calcio [2] Además, la pérdida de este gen da lugar a una reducción en la expresión del homólogo de ENA1, ATPasa de Na^+ de *S. cerevisiae*, y también a un aumento en la expresión del intercambiador vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ VcxA, homólogo de VCX1 en la levadura.

La actividad biológica de muchas proteínas, entre ellas los factores de transcripción, es regulada por modificaciones postraduccionales, las cuales tienen una naturaleza muy variada

pudiendo ser reversibles o irreversibles [6]. De entre todas ellas, la fosforilación y la proteólisis son de interés en este trabajo y pueden ser moduladas en respuesta a señales extracelulares.

2. Objetivos

El objetivo de estudio de esta tesis doctoral es el proceso de señalización del factor transcripcional SltA del organismo modelo *Aspergillus nidulans*, que media la respuesta a estrés abiótico. Adicionalmente, se ha descubierto un nuevo elemento de la ruta Slt, la proteína SltB, mediante un trabajo previo donde se puso de manifiesto la relación de las rutas Slt y endocítica de *A. nidulans* [7]. Esta tesis doctoral supone el comienzo del estudio de SltB y su implicación en la homeostasis de cationes y tolerancia de la alcalinidad.

Para cumplir estos objetivos principales se han abordado tres líneas de trabajo:

- 1) Estudiar los mecanismos de señalización, activación y regulación del factor transcripcional SltA.
- 2) Caracterizar la proteína señalizadora SltB, así como su función en la célula.
- 3) Determinar la relación funcional entre SltA y SltB, y con otros elementos conocidos implicados en la respuesta catiónica y el pH ambiental.

3. Resultados

El apartado de Resultados está dividido en cinco capítulos. En el primer capítulo se realiza un análisis funcional del producto del gen *sltB*. La delección de este gen mostró que no era esencial para el desarrollo del hongo, y reveló una interacción genética con el gen *sltA*, siendo el fenotipo de sensibilidad a ciertas sales y a la alcalinidad de las cepas portadoras de uno o ambos alelos nulos indistinguibles entre sí. Este hecho, junto con la similar distribución filogenética y su relación con la ruta endocítica, llevó a proponer el modelo inicial de trabajo donde ambas proteínas formarían parte de la misma ruta de señalización. Así, SltA se mantendría en un estado inactivo y, tras la acción de SltB, cambiaría a un estado activo que daría lugar a una respuesta transcripcional específica.

En el capítulo 2 se desarrolla un análisis bioinformático con la secuencia de la proteína SltB con el objetivo de identificar el tipo de proteína y la familia a la que pertenecía. Los alineamientos realizados entre los diferentes ortólogos de *Aspergillus*, permitieron obtener la predicción de dos dominios conservados en su secuencia: la región amino terminal mostraba un alto grado de similitud con proteínas quinasas, y la región más carboxilo terminal aparecía identificada como una proteasa de la familia tripsina, del tipo serina o cisteína. La base de

datos de peptidasas MEROPS indicó que el dominio proteasa pertenecía a la familia de peptidasas S64, del tipo Serina, y que se caracterizan por contener en su secuencia la triada catalítica His-Asp-Ser [8]. Se propusieron los residuos de histidina 1008/1033, aspártico 1036 y serina 1142 como los candidatos para formar parte del centro catalítico del dominio proteasa de SltB.

A continuación se realizó un análisis más exhaustivo del hipotético dominio quinasa de SltB, donde se determinó que esta región no contenía los residuos catalíticos definidos como esenciales en las familias de quinasas eucariotas [9]. Una revisión del trabajo bioinformático realizado nos llevó a proponer a esta región de SltB como una pseudoquinasa.

En el capítulo tres se describe cómo mediante diversas estrategias de genética clásica y biología molecular se han generado formas mutantes etiquetadas de SltA y SltB, determinándose así un mecanismo de regulación postraduccional por proteólisis. El etiquetado de SltA en su extremo C-terminal permitió visualizar tres formas de esta proteína: SltA^{78kDa} y SltA^{32kDa} que, a su vez, está en equilibrio con una forma modificada de la misma. Respecto a SltB, una versión de la proteína doblemente etiquetada, tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal, demostró la existencia de los dos dominios sugeridos mediante los análisis bioinformáticos.

La expresión de *sltB* depende de la actividad reguladora de la transcripción de SltA, puesto que no se detectó la quimera SltB::GFP en los extractos proteicos correspondientes a una cepa nula *sltA*. Puesto que este hecho era incompatible con el modelo lineal de trabajo propuesto, este se adaptó a los nuevos datos obtenidos, poniendo de manifiesto interacciones cruzadas entre ambas proteínas. Expresando de forma regulada una versión etiquetada de SltB en una cepa nula *sltA*, se demostró que SltA es el efector final de la ruta de señalización, y que el procesamiento proteolítico de SltB es independiente de la acción de SltA.

Mediante la generación y estudio de cepas mutantes, se demostró que el dominio pseudoquinasa de SltB es suficiente y determinante para que se produzca la proteólisis de SltA. Así mismo, el dominio proteasa de SltB está involucrado en la proteólisis de la propia proteína, requisito previo para que se lleve a cabo el corte proteolítico de SltA. Mediante la generación de cepas diploides, se ha propuesto que la proteólisis de SltB tiene lugar en configuración *cis*, intramolecular, puesto que no se ha podido complementar la actividad de SltB en *trans*.

Se ha realizado un estudio de la triada catalítica de SltB mediante un proceso de mutagénesis dirigida *in vitro* sobre la secuencia genómica de *sltB*. Se reemplazaron los aminoácidos histidina 1033 y serina 1142 por residuos de alanina en ambos casos, y se fusionaron a la proteína fluorescente GFP. La ausencia de la serina 1142 dio lugar a la pérdida

de función de la proteína, lo que se correspondía con la ausencia de proteólisis de SltB y en consecuencia, de SltA.

La expresión condicionada del alelo SltA^{32kDa} con el promotor de tiamina, permite tener una función parcial de la proteína. Se ha estudiado cómo afecta la ausencia de la forma SltA^{78kDa} a la expresión del gen *sltB*, y el papel de la forma SltA^{32kDa} en la regulación de la expresión de *sltB*. Se determinó que SltA^{32kDa} tenía un efecto epistático frente a la ausencia de SltB, y que esta forma promovía positivamente la expresión de *sltB*, por lo que se ha sugerido que SltA debe ser el efector final de la ruta Slt, que la modificación postraduccional que ocurre en SltA^{32kDa} no es dependiente de SltB y que la actividad primaria de SltB parece quedar restringida exclusivamente a nivel de la proteólisis de SltA.

En el siguiente capítulo se estudió el efecto del estrés por cationes y la alcalinización en la señalización de las proteínas SltA y SltB. Para ello, se determinó si existían cambios postraduccionales en las proteínas SltA y SltB cuando el micelio fue cultivado en diferentes condiciones de estrés osmótico y de pH. No se observaron diferencias en los niveles de cada una de estas formas entre las diferentes condiciones de estrés analizadas y con respecto a la ausencia de los mismos. Este resultado mostraba que la señalización de SltA y SltB, entendida como la existencia del corte proteolítico, era independiente del estrés abiótico que hubiera en el medio de cultivo. Estos resultados sugieren una señalización aparentemente constitutiva del sistema.

Se han llevado a cabo análisis de expresión de *sltA* y *sltB* determinándose que la expresión de *sltB* depende de la actividad SltA, puesto que se detectaron unos niveles de transcrito de *sltB* muy bajos en una cepa nula *sltA*. En concordancia con la cantidad y formas de proteína detectadas en los ensayos de estrés por cationes y alcalinización del medio, no se observó variación en los niveles de expresión de ambos genes en las diferentes condiciones de estrés estudiadas.

Ensayos de desfosforilación *in vitro* con la fosfatasa del fago λ , permitieron concluir que la banda con una movilidad intermedia entre SltA^{78kDa} y SltA^{32kDa} detectada en los extractos proteicos se correspondía con una forma fosforilada de SltA^{32kDa}, que coexiste con otra forma no fosforilada de la misma y con la forma completa SltA^{78kDa}.

La parte final de esta tesis engloba los estudios adicionales de SltA y SltB. Mediante la fusión de un epítipo fluorescente a SltB se demostró que esta proteína presenta una localización preferentemente citoplásmica, aparentemente excluida de los núcleos y orgánulos, y que esta se mantiene inalterada independientemente del dominio expresado. La distribución celular de SltA se estudió mediante un experimento de fraccionamiento

subcelular, encontrándose mayoritariamente a esta proteína en las fracciones que contienen el material nuclear y en la asociada a otros elementos celulares de gran tamaño, siendo muy bajos los niveles de SltA libre en el citoplasma.

Finalmente se han llevado a cabo estudios funcionales entre SltA, CrzA y PacC, en la respuesta a pH alcalino, en busca de una posible relación con la proteasa de PacC, PalB, y con la calcineurina, fosfatasa de CrzA. Los resultados obtenidos sugieren mecanismos de regulación independientes entre dichos factores transcripcionales.

4. Discusión

En esta tesis doctoral se ha investigado sobre los mecanismos reguladores de la expresión génica que permiten al hongo tolerar elevadas concentraciones de cationes y la alcalinización del pH ambiental. En particular el trabajo se ha centrado en determinar cómo el factor transcripcional SltA es señalizado mediante la actividad de la proteína SltB. Este apartado se organiza en cinco puntos donde se profundiza en los resultados obtenidos desde el punto de vista de su mecanismo y función biológica.

I) Del modelo genético al modelo molecular. El modelo inicial de trabajo era directo y simple. Puesto que SltA es un factor transcripcional, éste debería ser el efector final de la ruta Slt. Así, SltB sería la proteína señalizadora que promovería un cambio postraduccional en SltA haciendo que esta proteína pase de una forma inactiva a otra transcripcionalmente activa. Dicha forma regularía la expresión del conjunto de genes específico de su función. El trabajo molecular desarrollado a lo largo de este trabajo ha demostrado que la regulación de este sistema es más compleja, existiendo interacciones cruzadas entre ambas proteínas pero donde SltA es el regulador final de esta ruta señalizadora.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer dos modelos de rutas reguladoras para describir el papel de SltA y SltB en la homeostasis de cationes y pH ambiental. El primero situaría ambas proteínas como elementos de una ruta de carácter específico, la ruta Slt; y el segundo los integraría dentro de otra ruta más general o red de rutas, siendo estos los últimos efectores ante los estreses ambientales estudiados.

II) Naturaleza y dinámica de la señalización de las proteínas Slt. Determinados factores de transcripción son activados para que puedan mediar su acción en el núcleo. Algunos se modifican mediante proteólisis, dando lugar a formas alternativas donde se eliminan ciertas partes de la proteína para ganar o perder actividad. Ejemplos de factores de transcripción regulados por proteólisis son PacC y Stp1/2. En este trabajo se demuestra que SltA también es un factor transcripcional regulado mediante proteólisis limitada. SltA en su forma nativa tiene

un tamaño estimado de 78kDa (SltA^{78kDa}) y es detectable en cualquier condición de cultivo. Sin embargo no es la única forma en la célula y se aprecia, cuando se utilizan formas etiquetadas en su extremo C-terminal, la aparición de dos formas que hemos denominado como SltA^{32kDa}. Una de dichas bandas es una versión modificada mediante fosforilación de la forma SltA^{32kDa}.

La forma SltA^{78kDa} es funcional y proponemos que la proteólisis de SltA supone la existencia en la célula de una nueva forma funcional de SltA, dado que conserva el dominio de unión a DNA. La forma SltA^{78kDa} se requiere para que el gen *sltB* se exprese.

La proteína SltB también está sujeta a un proceso proteolítico. El análisis de la estructura primaria de SltB propone, al menos, dos dominios bien definidos. Un dominio pseudoquinasa y un dominio proteasa. El dominio pseudoquinasa es esencial para que se lleve a cabo la proteólisis de SltA. El dominio proteasa está implicado en, al menos, la escisión y liberación de ambos dominios en SltB. En este estudio no ha sido posible determinar la localización en la célula donde ocurre este proceso de señalización. No obstante todas las formas de SltB estudiadas mantienen una localización preferentemente citoplásmica. El etiquetado de SltA para su seguimiento en la célula ha dado lugar a formas no funcionales. Como alternativa, se procedió al análisis de la distribución celular de SltA mediante el fraccionamiento subcelular. Este análisis sitúa a una parte del contenido celular de SltA (ambas formas) en el citoplasma y otra parte en el núcleo. La fracción citoplásmica de SltA podría deberse a la formación de complejos proteicos de gran tamaño o a una asociación con estructuras membranosas. Esta porción de SltA podría ser aquella que recibiese la señalización o estuviese en proceso de ello. El hecho de que las pseudoquinasas pueden mediar en la formación de heterocomplejos y la necesidad de la actividad SltB^{psk} para la proteólisis de SltA, sugiere que SltA sería reclutado por SltB^{psk} (dominio pseudoquinasa) a un compartimento/estructura donde debe residir la actividad proteasa que actúa sobre el factor transcripcional.

III) La actividad proteasa de SltB. El papel propuesto inicialmente para la proteína SltB se ha visto modificado continuamente a lo largo del desarrollo de esta tesis. Primeramente el modelo genético visualizaba la actividad de SltB como iniciadora de la activación de SltA. La necesidad de la actividad de SltB en la señalización de SltA definió una relación directa entre la actividad propuesta para su dominio proteasa y la proteólisis del factor transcripcional. Sin embargo, la genética clásica nos proporcionó un nuevo modelo molecular al caracterizar la proteína mutante del alelo *sltB56*.

La proteína codificada por el alelo *sltB56* está truncada en el aminoácido 477, conteniendo gran parte del dominio pseudoquinasa. El fenotipo de dicha mutación es una

pérdida parcial de función, lo que explicamos posteriormente al determinar la existencia de proteólisis en SltA. Este resultado descartaba a SltB como proteasa de SltA. Nuevamente la genética clásica proporcionó un mutante de pérdida de función, *sltB53*. La proteína mutante SltB53 se visualiza en su forma nativa y en dicho fondo genético, SltA tampoco es proteolizado a su forma de SltA^{32kDa}. Por tanto, SltB se debe auto-proteolizar y dicho proceso rinde la separación de ambos dominios funcionales en SltB. El dominio pseudoquinasa es el necesario para transmitir la señalización de SltA.

Aunque existen ejemplos descritos de proteínas pseudoquinasas, como la titina o VNK, que mantienen una actividad catalítica remanente [10], no se le ha podido atribuir una implicación en la fosforilación de SltA^{32kDa}, puesto que esta sigue fosforilada en un fondo genético mutante Δ *sltB*. Como ya se ha mencionado, un posible papel para el dominio pseudoquinasa de SltB podría ser el de reclutar a los elementos necesarios para que se produzca la proteólisis de SltA, ya que se han descrito proteínas pseudoquinasa con esta función de “scaffold”.

El análisis de la secuencia del dominio proteasa sugiere una cierta similitud entre SltB y la proteína de *S. cerevisiae* Ssy5p. Esta proteína se ha clasificado como un posible miembro de la familia de serín proteasas tipo tripsina, señalando a los residuos H465, D545 y S640 como los elementos de la triada catalítica [11]. Los alineamientos realizados entre Ssy5 y SltB identificaban la posible triada catalítica en SltB, compuesta por los residuos H1008/1033, D1036 y S1142. Mediante genética en reverso hemos podido demostrar que la sustitución de los residuos H1033 y Ser 1142 por alanina causa la pérdida parcial o total de función de SltB, respectivamente. Ambos fenotipos son debidos a la reducción, en el primer caso, o a la ausencia de proteólisis de SltB y como consecuencia la alteración de la proteólisis de SltA. Así, definimos al residuo Ser 1142 de SltB como un elemento funcional y esencial de la posible triada catalítica del dominio proteasa de SltB y por ello clasificamos a SltB dentro del grupo serina-proteasa.

IV) Regulación de la actividad de SltA. Regiones funcionales. Existen interacciones regulatorias de la expresión y señalización de las proteínas Slt, que indican que la forma SltA^{78kDa} debe ser funcional para promover la transcripción del gen *sltB*. En este sentido, se ha podido comprobar cómo la forma de SltA^{78kDa} puede mediar la expresión de las diferentes formas no funcionales de SltB generadas en este estudio. De acuerdo con ello, el análisis del promotor de *sltB* muestra la presencia de secuencias candidatas a ser dianas del factor SltA. También se ha demostrado que la expresión condicionada de la forma que mimetiza a SltA^{32kDa} (*thiA::sltA^{Met400}*) permite la expresión de *sltB* en unos niveles similares a los observados en un

fondo silvestre. Estos resultados muestran un papel positivo en la regulación de la expresión de *sltB* por SltA, al que activa la propia proteína SltB.

El análisis de las formas mutantes obtenidas mediante genética clásica y las generadas en este estudio nos permiten definir dos regiones funcionales en SltA. La similitud entre el fenotipo mostrado por el mutante *sltA1* y el mutante Δ *sltA* pusieron de manifiesto la importancia de los últimos 116 aminoácidos de la secuencia proteica de SltA. Sin embargo, el grado de conservación de esta región es muy divergente entre los homólogos de SltA en las diferentes especies del género *Aspergillus* identificados hasta la fecha. Esta región C-terminal de SltA podría haber sido adquirida como ventaja evolutiva frente a los diferentes ortólogos descritos, adquiriendo una función reguladora en *cis* adicional. En este sentido, la modificación por fosforilación determinada en la forma de SltA^{32kDa} y en las formas truncadas generadas SltA^{Arg331} y SltA^{Met400} señalan a esta región C-terminal como candidata a contener los residuos o elementos implicados en su fosforilación, apoyando así esta hipótesis.

La región amino terminal de SltA (SltA^{46kDa}) podría tener un papel regulador sobre su actividad, como se describe para muchos de los factores de transcripción eucariotas (e.g. Stp1 o Nrf1, *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 1*).

V) Búsqueda de nuevos componentes de la ruta Slt. Una de las dificultades encontradas en el conocimiento de este sistema regulador ha sido la falta de elementos adicionales a SltA y SltB. Se ha demostrado que al menos deben participar dos proteínas más en este proceso señalizador, una proteasa y una quinasa, ambas mediando su acción sobre SltA. Estas dos proteínas podrían ser o no específicas de la ruta Slt. Se ha realizado una búsqueda *in silico* de genes candidatos que pudieran codificar para estos dos elementos de la ruta Slt. Así se identificó en la base de datos de proteínas de *A. nidulans* la secuencia de la proteína denominada PskA, una pseudoquinasa con alto grado de similitud al dominio pseudoquinasa de SltB y también específica de hongos filamentosos. Sin embargo, tras generar una cepa portadora del alelo nulo de este gen no pudimos demostrar su relación con la ruta Slt.

La identificación de la quinasa y la proteasa de SltA podría hacerse mediante la búsqueda de mutantes supresores del fenotipo letal causado por la delección de genes *vps* [7]. Hasta el momento no se han encontrado mutaciones en otros *loci* diferentes a los correspondientes a *sltA* o *sltB*, por lo que es necesario poner a punto un proceso de obtención y selección de mutantes *slt* que nos permita encontrar nuevos elementos del sistema.

Dado que sólo se conocen dos efectores de la respuesta a estrés salino y pH alcalino en *A. nidulans*, SltA y SltB, no podemos descartar que estos fueran moduladores en *trans* de una

ruta o rutas de respuesta a estrés general. Dado que SltA está involucrado en diferentes procesos celulares (homeostasis de cationes, pH ambiental, conidiación y metabolismo secundario), la propuesta en la conexión entre diferentes cascadas de señalización podría darse por las modificaciones postraduccionales que regulasen la actividad global de SltA. Esta idea se describe para otros factores transcripcionales de metazoos, como es el caso del factor de transcripción FOXO de la familia *Forkhead* [12]. Este FT puede modular la especificidad del proceso celular en el que interviene en respuesta a diferentes señales mediante sus modificaciones postraduccionales. Un papel similar podrían tener las modificaciones por proteólisis y fosforilación determinadas para SltA. En este sentido, se debería estudiar el estado de modificación postraducciona en el que se encuentra SltA en otras condiciones de estudio para las que se ha determinado su función.

5. Conclusiones

- 1) SltA y SltB son elementos de una misma ruta de señalización por estrés catiónico y pH ambiental, donde SltA es el efector final de la ruta y SltB es la proteína señalizadora.
- 2) SltA y SltB presentan una distribución filogenética restringida al subfilo *Pezizomicotina*.
- 3) SltA está sometida al menos a dos modificaciones postraduccionales. Un proceso de proteólisis que determina la existencia de dos formas fisiológicas de SltA, SltA^{78kDa} y SltA^{32kDa}, y un proceso de fosforilación de la forma SltA^{32kDa} que determina la existencia de la tercera forma caracterizada de SltA.
- 4) SltB es una proteína con dos dominios hipotéticamente funcionales identificados en su secuencia, un dominio pseudoquinasa en la región N-terminal y un dominio con actividad proteasa en el extremo C-terminal.
- 5) SltB también es modificada postraduccionalmente por proteólisis, liberando los dos dominios hallados en su secuencia.
- 6) El dominio proteasa se requiere para la propia proteólisis de SltB, sugiriendo un mecanismo de regulación por auto-proteólisis. El residuo Serina 1142 es un buen candidato a formar parte del centro catalítico de este dominio. El dominio pseudoquinasa media la proteólisis de SltA.
- 7) La expresión de SltB es dependiente de la actividad de SltA.
- 8) La señalización de SltA y SltB podría ser constitutiva, independiente del estímulo ambiental.

- 9) SltB presenta una distribución celular citoplasmática, y la expresión de sus dominios de forma independiente no altera dicha localización celular.
- 10) SltA, PacC y CrzA median rutas de señalización por pH ambiental diferentes.

6. Referencias

- [1] Serrano R. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 1996; 165: 1-52.
- [2] Spielvogel A, Findon H, Arst HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P, Stahl U, Meyer V, Espeso EA. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 2008; 414: 419-429.
- [3] Rossi A, Arst HN, Jr. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 54: 51-53.
- [4] O'Neil J.D. Cloning of a novel gene encoding a C2H2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Mycol Res* 2002; 106: 491-498.
- [5] Saloheimo A, Aro N, Ilmen M, Penttila M. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 2000; 275: 5817-5825.
- [6] Benayoun BA, Veitia RA. A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 189-197.
- [7] Calcagno-Pizarelli AM, Hervas-Aguilar A, Galindo A, Abenza JF, Peñalva MA, Arst HN, Jr. Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. *J Cell Sci* 2011; 124: 4064-4076.
- [8] Polgar L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2161-2172.
- [9] Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 1995; 9: 576-596.
- [10] Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR. Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 443-452.
- [11] Abdel-Sater F, El BM, Urrestarazu A, Vissers S, Andre B. Amino acid signaling in yeast: casein kinase I and the Ssy5 endoprotease are key determinants of endoproteolytic activation of the membrane-bound Stp1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9771-9785.

[12] Butt A, Kaleem A, Iqbal Z, Walker-Nasir E, Saleem M, Shakoori AR, Nasir-ud-Din, . Functional Regulation of DNA Binding of FOXO1 by Post Translational Modifications: *In silico* Study. Pakistan J Zool 2011, 43[6], 1167-1175.

Summary

1. Introduction

The ability of cells to sense and respond properly to environmental changes is essential for most metabolic processes of which life depends. Abiotic stresses although caused by natural elements these are not directly produced by organisms. Among them, and more interesting for this work, are high extracellular concentrations of mono and divalent cations, and environmental pH, which is a direct effect of the monovalent cation hydrogen [1].

Microorganisms have developed homeostatic systems which allow them to maintain intracellular ion concentration relatively constant in response to changes in external conditions. These organisms are classified according to their ability to tolerate different concentrations of ions, and among them, the model organism *Aspergillus nidulans* used in this thesis, can tolerate moderate amounts of a wide range of cations, from one molar concentrations of sodium or potassium up to millimolar concentrations of manganese or iron [2], as well as a wide range of environmental pH values, ranging from 2.5 to 10.5 values [3].

In *A. nidulans* tolerance to an alkaline pH requires the activities of three principal transcription factors: PacC, CrzA and SlmA. In *Saccharomyces cerevisiae* Rim101p and Crz1p (PacC and CrzA, respectively), mediate the response to alkaline pH, and the latter is also involved in the regulation of cation homeostasis. However, in *A. nidulans* this regulatory function is shared between SlmA and CrzA [2]. SlmA belongs to zinc-finger transcription factors family. Whereas SlmA phylogenetic distribution is specific to filamentous fungi, CrzA and PacC are widely distributed among fungal kingdom.

Defects in SlmA function, such as in the *sltA1* mutant, cause sensitivity to NaCl, arginine, UV light and the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine [4]. SlmA shares significant similarity to Ace1 transcription factor from *Hypocrea jecorina* (~ 58%) but their functions are very different; while Ace1 controls cellulose utilization [5], SlmA mediates the response to abiotic stress. More extensive studies carried out by the research group have shown that *sltA* deletant shows sensitivity to alkaline pH, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Li⁺ and Cs⁺, but not to calcium [2]. Moreover, the deletant displayed reduced expression of a homologue ENA1, Na⁺-ATPase of *S. cerevisiae*, and also up-regulation of vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger VcxA, VCX1 homologue in yeast.

The biological activity of many proteins, including transcription factors, is regulated by post-translational modifications, which are very varied and can be reversible or irreversible [6]. These include phosphorylation and proteolysis, which are interesting for this work and can be modulated in response to extracellular signals.

2. Objectives

The main focus of this thesis is the study of the signaling process of SltA in the model organism *Aspergillus nidulans*, which mediates the response to abiotic stress. Additionally, we have discovered a new element of the Slt stress response pathway, SltB, through a previous work that showed a relationship between Slt and endocytic pathways in *A. nidulans* [7]. This doctoral thesis is the starting point for the study of SltB protein and its function in the regulatory pathway after cation homeostasis and alkalinity tolerance. Three lines of research were proposed to pursue this main objective:

- 1) Study the signaling, activation and regulation mechanisms of the transcriptional factor SltA.
- 2) Characterize the signaling process of SltB and its cell function.
- 3) Determine the functional relationship between SltA and SltB, and other known elements involved in the response to cation and environmental pH.

3. Results

The Results section is divided into five chapters. In the first chapter approaches a functional analysis of the SltB gene product. Deletion of *sltB* was not essential to the fungal development, but revealed a genetic interaction with *sltA* gene, because the sensitive phenotype to a number of salts and alkaline pH caused by deletion each gene was indistinguishable. This finding together with the similar phylogenetic distribution and its relationship with the endocytic pathway, led us to propose a initial working model where both proteins form part of the same signaling pathway. In this model, SltA would be arrested in an inactive state but changing to an active state after the action of SltB, and then promoting a specific transcriptional response.

In the second chapter a bioinformatic analysis of SltB protein sequence was conducted to identify the type and family to which SltB belongs. Multiple alignments performed among different *Aspergillus* orthologs, showed a prediction of two conserved functional domains in its sequence. The amino-terminal region displayed high similarity to non-functional protein kinases, and the carboxyl terminal region was identified as a trypsin-like family of serine/cysteine protease. Analysis of this domain using the MEROPS peptidase database classified SltB into the peptidase family S64 having a catalytic serine-type. The predicted active site residues for members of this family are His-Asp-Ser [8]. Histidine 1008/1033, Aspartic 1036 and Serine 1142 residues were proposed as candidates to take part in the catalytic centre of SltB protease domain. Next detailed bioinformatic analyses of the putative protein kinase

domain in SltB were carried out and determined that this region does not contain those essential catalytic residues defined in eukaryotic kinase families [9]. We propose this region as a pseudokinase protein.

Chapter three describes classical genetics and molecular biology strategies to analyse this regulatory pathway. Mutant forms of SltA and SltB were constructed and experiments determined the existence of posttranslational regulatory mechanism for both proteins involving a proteolytic step. C-terminal labelling of SltA allowed the identification of three forms for this protein: SltA^{78kDa} and SltA^{32kDa} that, in turn, is in equilibrium with a modified form. A double-labelled SltB protein, both at the amino and carboxyl terminal regions, demonstrated the existence of two separate fractions which might contain those domains identified by bioinformatic analyses.

Expression of *sltB* gene depends on the SltA transcriptional regulatory activity, since a SltB::GFP chimera was not detected in protein extracts of a null *sltA* strain. This fact was inconsistent with the proposed linear working model. A new model was presented to integrate this data showing cross-interactions between both proteins. Expression of SltB in a SltA-independent manner in a *sltA* null background demonstrated that SltA is the final effector of this regulatory pathway, and that proteolytic activation of SltB is independent of SltA activity.

Through the generation and study of mutant strains, it was shown that SltB pseudokinase domain is enough for the process of SltA proteolysis. We identified mutations in the SltB protease domain blocking its proteolysis, suggesting a mechanism of self-catalysis. This proteolytic step in SltB is a prerequisite for the proteolytic cleavage of SltA. Generating diploid strains it has been proposed SltB proteolysis could occur *in cis* configuration, intramolecular, since failed to complement SltB activity *in trans*.

We studied the catalytic triad of SltB through an *in vitro* mutagenesis process on the genomic sequence of *sltB*. Both histidine 1033 and serine 1142 amino acids were replaced by alanine residues, and these mutant versions of SltB were fused to the fluorescent protein GFP. The absence of serine 1142 resulted in the loss of the protein function, which corresponded with the absence of proteolysis of SltB and, consequently, of SltA.

Conditional expression of the allele SltA^{32kDa} with the thiamine promoter, gave rise a partial function of the protein. It has been studied the effect of the absence of SltA^{78kDa} on *sltB* gene expression and the role of SltA^{32kDa} in regulating *sltB* expression. It was determined that SltA^{32kDa} is epistatic to the absence of *sltB* gene and, as a final effector, also promotes *sltB* expression. The posttranslational modification which occurs in SltA^{32kDa} is not SltB-dependent and the main activity of SltB is likely to be exclusively restricted to the SltA proteolysis.

In chapter four, the effects of stresses caused by cations and alkalinization in SlmA and SlmB proteins were studied. For this purpose, the presence of posttranslational changes in both SlmA and SlmB proteins was determined in mycelia cultured under different pH and osmotic stress conditions. No differences in the levels of each form were observed under those stress conditions analyzed. This result showed that signalling of SlmA and SlmB, as proteolytic cleavage, is independent of the abiotic stress present in the culture medium. These results suggest that Slm proteins are under a constitutive signalling system.

A SlmA and SlmB expression analysis showed that *slmB* expression depends on the SlmA activity. A notable reduction of SlmB transcript levels were detected in RNA extracted from a null *slmA* strain. According to the amount and forms of protein detected in the mycelium cultured under different pH and osmotic stress conditions experiments, no variation in both genes expression levels in the different stress conditions tested was observed.

In vitro dephosphorylation tests with Lambda protein phosphatase allowed to conclude that the intermediate band with a mobility between SlmA^{78kDa} and SlmA^{32kDa} detected in the protein extracts corresponded with a phosphorylated form of SlmA^{32kDa}, which coexists with another non-phosphorylated SlmA^{32kDa} form together with the native form SlmA^{78kDa}.

The final part of this thesis is dedicated to the additional studies of SlmA and SlmB. Using a fluorescent-tagged version of SlmB we showed a predominantly cytoplasmic localization for this protein. SlmB is apparently excluded from the nuclei and organelles, and its distribution remains unaffected independently of which domain is expressed. In contrast, SlmA cell distribution was studied by means of a subcellular fractionation experiment. Most notably, cytoplasmic levels of SlmA are very low. SlmA is mainly in the nuclear fraction but also associated with other large cellular elements.

Finally, we have carried out genetic and functional studies between SlmA, CrzA and PacC transcription factors. Mainly looking at the response to alkaline pH, primarily searching for a possible connection to PalB, the protease of PacC, and to the calcineurin signalling, the phosphatase of CrzA. The overall results suggested independent regulatory mechanisms between these transcription factors.

4. Discussion

In this thesis has been studied the regulatory mechanisms of gene expression that allow the fungus tolerate high concentrations of cations and ambient pH alkalinization. In particular, the work has focused on determining how the transcriptional factor SlmA is

signalled through the activity of the SltB protein. This section is organized into five points which delves into the results from the point of view of its mechanism and biological function.

I) From the genetic model to the molecular model. The initial working model was direct and simple. Since SltA is a transcriptional factor, this might be a final effector of Slt pathway. Thus, SltB would predictably be a signaling element that promotes a post-translational change in SltA transforming it into an active transcriptional form. This form would regulate the expression of the specific set of genes. The molecular work developed during this work has shown that the regulation of this system is more complex, there is a cross-link involving interactions of both proteins but SltA is the final regulatory element.

These results allow us to propose two models of regulatory pathways to describe the role of SltA and SltB in cation homeostasis and environmental pH. The first would place both proteins as elements of a specific pathway, the Slt pathway; and the second would integrate into a more general pathway or network, which are the last effectors to the environmental stresses studied.

II) Nature and dynamics of signaling Slt proteins. Various transcription factors are activated to mediate its action in the nucleus. Some are modified by proteolysis, leading to alternative forms where parts of the protein are eliminated to gain or lose a functional activity. Examples of transcription factors regulated by proteolysis are PacC and Stp1/2. This work shows that SltA is also a transcriptional factor regulated by limited proteolysis. The estimated size of SltA native form is 78kDa (SltA^{78kDa}) and it is detectable in any culture condition. However, it is not the only form in the cell. Two forms, named as SltA^{32kDa}, were identified after tagging this protein at the C-terminal end. One such forms is a phosphorylated SltA^{32kDa}.

The native form SltA^{78kDa} is functional. We propose that proteolysis of SltA renders a new functional SltA form in the cell, since it retains the DNA binding domain. The SltA^{78kDa} form is required for *sltB* gene expression.

SltB protein is also subject to proteolytic cleavage. The analysis of the primary structure of SltB proposes at least two distinct domains, a pseudokinase domain and a protease domain. The pseudokinase domain is essential to accomplish the proteolysis of SltA. The protease domain is involved in at least the cleavage and release of the two domains in SltB. In this study has not been possible to determine the part of the cell where the signalling process occurs. However, all forms of SltB studied preferably maintain a cytoplasmic localisation. Labelling of SltA for determining its cell distribution resulted in non functional forms. Alternatively, an analysis was made of the cellular distribution of SltA by subcellular fractionation. This analysis places a portion of the cellular content of SltA (both forms) in the

cytoplasm and partly in the nucleus. The SltA cytoplasmic fraction may be due to the formation of large protein complexes or association with membrane structures. This portion could receive the signalling or were in the process of it. The fact that pseudokinases may mediate formation of heterocomplexes and the need of SltB^{psk} activity for proteolysis of SltA, suggests SltA would be recruited by SltB^{psk} in a compartment/structure in which must contain the protease activity acting on the transcription factor.

III) SltB protease activity. The initial role proposed for SltB protein has been continuously modified throughout the progress of this thesis. Firstly, the genetic model visualized SltB activity as a trigger of the activation of SltA. The need of SltB activity for signaling SltA defined a direct relationship between the proposed activity for its protease domain and the proteolysis of the transcriptional factor. However, classical genetics provided a new molecular model to characterize the mutant protein of allele *sltB56*. The protein encoded by the *sltB56* allele is truncated at amino acid 477, containing largely of the pseudokinase domain. The phenotype of this mutation is a partial loss of function, which we explain later determining existence of proteolysis of SltA. This result discarded SltB as the protease of SltA.

Classical genetics again provided a loss of function mutant, *sltB53*. The mutant protein SltB53 is visualized in its native form, and in this genetic background, SltA is not proteolysed to SltA^{32kDa}. Therefore, SltB must be self-proteolysed and this process should render the separation of the two functional domains in SltB. The pseudokinase domain is needed to transmit SltA signalling. Although there are examples described in pseudokinases proteins such as Titin or VNK, which maintain a remainder catalytic activity [10], it could not be attributed to SltB^{psk} an involvement in the phosphorylation of SltA^{32kDa}, since this is phosphorylated in a *sltB* null genetic background. As already mentioned, a possible role for SltB pseudokinase domain could be to recruit the necessary elements for SltA proteolysis, as it has been described a scaffold function for pseudokinase proteins.

Sequence analysis of the protease domain suggests a certain similarity between SltB and Ssy5p protein from *S. cerevisiae*. This protein has been classified as a possible member of the family of trypsin-like serine proteases, pointing to the H465, D545 and S640 residues as elements of the catalytic triad [11]. Alignments made between SltB and Ssy5 sequences identified the possible catalytic triad in SltB composed of H1008/1033, D1036 and S1142 residues. Using reverse genetics we have demonstrated that substitution of H1033 and Ser 1142 to alanine residues causes partial or total loss of function of SltB, respectively. Both phenotypes are due to the reduction, in the first case, or the absence of proteolysis of SltB and consequently altering the proteolysis of SltA. Thus, we define Ser 1142 of SltB sequence as a

functional and essential residue of the putative catalytic triad of SltB protease domain and therefore, we classify SltB within the serine protease group.

IV) Regulation of the SltA activity. Functional regions. There are regulatory interactions of the expression and signaling of Slt proteins, indicating that the form SltA^{78kDa} must be functional to promote the transcription of *sltB* gene. In this regard, it has been shown how the form SltA^{78kDa} mediates the expression of several non-functional forms of SltB. Accordingly, analysis SltB promoter shows putative target sequences for SltA factor. It has also been shown that the conditional expression of the form that mimics SltA^{32kDa} (*thiA::sltA^{Met400}*) allows equivalent levels of SltB than in a wild type background. These results show a positive role for SltA regulating the expression of *sltB*, which is activated by the SltB protein itself.

Analysis of mutant forms obtained by classical genetics, and those generated in this study, allow us to define two functional regions in SltA protein. The similar phenotype displayed by Δ *sltA* and *sltA1* mutants highlighted the importance of the last 116 amino acids of the protein sequence of SltA. However, the degree of conservation of this region is very divergent between SltA homologs in different species of the genus *Aspergillus* identified to date. This C-terminal region of SltA might have been acquired as an evolutionary advantage over the different orthologs described, acquiring additional regulatory function in *cis*. In this regard, modification determined for SltA^{32kDa} by phosphorylation and truncated forms generated, SltA^{Met400} and SltA^{Arg331}, indicate C-terminal region as a candidate to contain the elements involved in the phosphorylation, thus supporting this hypothesis

The amino terminal region of SltA (SltA^{46kDa}) could have a regulatory role on its activity, as described for many eukaryotic transcription factors (eg Stp1 or NRF1, *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 1*).

V) Finding new components of the Slt pathway. One of the difficulties in understanding this regulatory system has been the lack of additional elements to SltA and SltB. It has been demonstrated that at least two proteins are involved in this signalling process, a protease and a kinase, both of them mediating its action on SltA. These two proteins could be or not specific of Slt pathway. Has been performed *in silico* searches for candidate genes that could encode these two elements of the Slt pathway. Thus, we identified in the *A. nidulans* protein database the protein sequence called PskA, a pseudokinase with high similarity to the SltB pseudokinase domain, and specific to filamentous fungi too. However, after generating a strain carrying the null allele of this gene, we could not prove their relationship to Slt pathway.

The identification of the kinase and protease of SltA could be done by searching for suppressor mutants of the lethal phenotype caused by the deletion of *vps* genes [7]. So far, no

mutations have been found in different *loci* from those corresponding to SltA or SltB, so it is necessary to develop a process for obtaining and selecting *slt*⁻ mutants that allows us to find new elements of the system.

Since only two effectors of the response to salt stress and alkaline pH in *A. nidulans* are known, SltA and SltB, we cannot discard that these were *trans* modulators of a general stress response pathway. As SltA is involved in different cellular processes (cation homeostasis, environmental pH, conidiation and secondary metabolism), the proposal on the connection between different signaling cascades could occur by posttranslational modifications that would regulate the overall SltA activity. This idea is described for other transcription factors metazoans, such as FOXO1, belongs to the Forkhead family of transcription factors [12]. This TF can modulate the specificity of cellular process that is involved in response to different signals by their posttranslational modifications. A similar role could have the modifications by proteolysis and phosphorylation determined for SltA. In this regard, it should be studied the state of post-translational modification of SltA in other study conditions for which function has been determined.

5. Conclusions

- 1) SltA and SltB are elements of the same signaling pathway by cation stress and environmental pH, where SltA is the final effector of the pathway and SltB is the signalling protein.
- 2) SltA and SltB have a restricted phylogenetic distribution to subphylum *Pezizomycotina*.
- 3) SltA is subjected to at least two post-translational modifications. A proteolysis process which determines the existence of two physiological forms of SltA, SltA^{78kDa} and SltA^{32kDa}, and a phosphorylation process of SltA^{32kDa} form that determines the existence of the third SltA form characterized.
- 4) SltB is a protein with two putative functional domains identified in the sequence, a pseudokinase domain in the N-terminal region and a domain with protease activity at the C-terminus.
- 5) Also SltB is post-translationally modified by proteolysis, releasing the two domains found in its sequence.
- 6) The protease domain is required for proteolysis SltB itself, suggesting a mechanism of self-regulation by proteolysis. The Serine 1142 residue is a good candidate to be part of the catalytic center of this domain. The pseudokinase domain mediates the proteolysis of SltA.

- 7) SltB expression is dependent on the activity of SltA.
- 8) Signaling of SltA and SltB could be constitutive, independent of environmental stimulus.
- 9) SltB has a cytoplasmic cellular distribution, and the independent expression of its domains does not alter cellular localization.
- 10) SltA, CrzA and PacC mediate different pH-responsive signaling pathways.

6. References

- [1] Serrano R. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 1996; 165, 1-52.
- [2] Spielvogel A, Findon H, Arst HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P, Stahl U, Meyer V, Espeso EA. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 2008; 414: 419-429.
- [3] Rossi A, Arst HN, Jr. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 54: 51-53.
- [4] O'Neil J.D. Cloning of a novel gene encoding a C2H2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Mycol Res* 2002; 106: 491-498.
- [5] Saloheimo A, Aro N, Ilmen M, Penttila M. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 2000; 275: 5817-5825.
- [6] Benayoun BA, Veitia RA. A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 189-197.
- [7] Calcagno-Pizarelli AM, Hervas-Aguilar A, Galindo A, Abenza JF, Peñalva MA, Arst HN, Jr. Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. *J Cell Sci* 2011; 124: 4064-4076.
- [8] Polgar L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2161-2172.
- [9] Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 1995; 9: 576-596.
- [10] Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR. Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 443-452.
- [11] Abdel-Sater F, El BM, Urrestarazu A, Vissers S, Andre B. Amino acid signaling in yeast: casein kinase I and the Ssy5 endoprotease are key determinants of endoproteolytic activation of the membrane-bound Stp1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9771-9785.
- [12] Butt A, Kaleem A, Iqbal Z, Walker-Nasir E, Saleem M, Shakoori AR, Nasir-ud-Din, . Functional Regulation of DNA Binding of FOXO1 by Post Translational Modifications: *In silico* Study. *Pakistan J Zool* 2011; 43[6], 1167-1175.

Introducción

1. *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans (*Emericella nidulans*) es un hongo filamentoso ascomiceto, del subfilo *Pezizomycotina*, perteneciente a la familia *Trichocomaceae/ Aspergillaceae* [6;8;9].

El genoma de *Aspergillus nidulans* se publicó en 2005, contiene 30 millones de pares de bases y un número estimado de 10700 genes organizados en ocho cromosomas [10]. En las bases de datos del Instituto Broad (<http://www.broad.mit.edu/>) o del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (<http://www.aspergillusgenome.org/>) quedan recogidos gran parte de los datos disponibles sobre la organización y la expresión de los genes y elementos reguladores que componen el genoma de este organismo.

Desde el punto de vista morfológico, las células vegetativas de *Aspergillus nidulans*, denominadas hifas, son tubulares y crecen de forma hiperpolarizada por extensión apical y ramificación lateral [11]. Estas hifas se entrecruzan, pudiendo llegar ocasionalmente a fusionarse (anastomosis), formando una red entramada denominada micelio la cual se expande simétricamente y radialmente por lo que este organismo forma colonias circulares y regulares cuando crece sobre medio sólido.

En cuanto a su organización celular, *Aspergillus* es un organismo cenocítico, sus células son sincitios multinucleados, generalmente haploides, y están divididas por septos perforados que permiten el intercambio selectivo de nutrientes y efectores entre los compartimentos celulares. Generalmente en una colonia determinada todos los núcleos de cada hifa contienen el mismo material genético y por ello, a estas cepas se las denomina homocariontes. En los heterocariontes conviven en un mismo citoplasma núcleos con dotación genética diferente.

Pueden distinguirse cuatro fases en el ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* [12;13]: fase de crecimiento vegetativo, reproducción asexual, reproducción sexual y ciclo parasexual (Fig. 11). El ciclo vegetativo del hongo comienza con la germinación de una conidiospora o espora de reproducción asexual, con el establecimiento de la polaridad de dicha célula [14]. A un punto determinado de la membrana plasmática del conidio se recluta una maquinaria molecular específica que deposita de forma continuada componentes de la membrana plasmática y pared celular en dicho punto. Esta incesante deposición de material da lugar a que la espора emita el denominado tubo germinativo (estadio de germínula) y continúe el crecimiento en dicha dirección (polarizado).

Las conidiosporas se producen en estructuras aéreas especializadas y complejas denominadas conidióforos [15]. La conidiospora es uninucleada y todas las esporas que provienen de una colonia homocariótica comparten la misma información genética [16].

Dependiendo del tipo de micelio en el cual se generen las esporas, estas pueden ser haploides (n) o diploides ($2n$). Las colonias generadas a partir de conidias haploides manifiestan el fenotipo causado por las mutaciones recesivas viables. Las conidias diploides nos permiten mantener mutaciones de pérdida de función en genes esenciales o identificar mutaciones dominantes o relaciones de epistasia entre diferentes *loci*.

A. nidulans es un hongo homotálico, es decir, posee los dos genes necesarios para su apareamiento (HMG y α). Esta dotación génica permite el desarrollo de estructuras reproductoras sexuales en las que pueden participar dos cepas diferentes o incluso dos células de la misma colonia. Durante el ciclo sexual se forman diferentes células especializadas, como las células de Hülle, pero quizás la fase más importante comienza cuando dos hifas homocarióticas se fusionan mediante anastomosis y se genera una célula heterocariótica. Los distintos núcleos se fusionan (cariogamia) y se genera un núcleo diploide transitorio. Este diploide o cigoto posteriormente se divide por meiosis dando lugar a cuatro productos meióticos que, a su vez, se dividen mitóticamente resultando en ocho ascosporas dentro de una misma asca. Antes de que las ascosporas maduren totalmente sucede una nueva división nuclear pero no celular. Debido a este proceso cada asca madura contiene ocho ascosporas binucleadas y haploides. El cuerpo fructífero donde se encuentra el conjunto de ascas recubiertas por una pared es una estructura esférica denominada cleistotecio. Cuando el cleistotecio se rompe, las ascosporas se liberan y, si las condiciones ambientales son favorables, germinan comenzando así un nuevo ciclo de vida vegetativo [6].

El ciclo parasexual se caracteriza por la fusión de hifas vegetativas y el intercambio de material celular por anastomosis, dando lugar a individuos heterocarióticos que poseen núcleos haploides de distinta dotación genética. Adicionalmente se puede producir la fusión de los núcleos haploides para dar lugar a estirpes diploides. La dotación cromosómica n se reestablece por haploidización [6]. Así como los diploides permiten la obtención de alelos nulos de genes viables, la técnica del "heterokaryon rescue" ha permitido el estudio de los mismos dado que en muchos casos existe complementación por heterocariosis de la pérdida de función de genes esenciales [17;18].

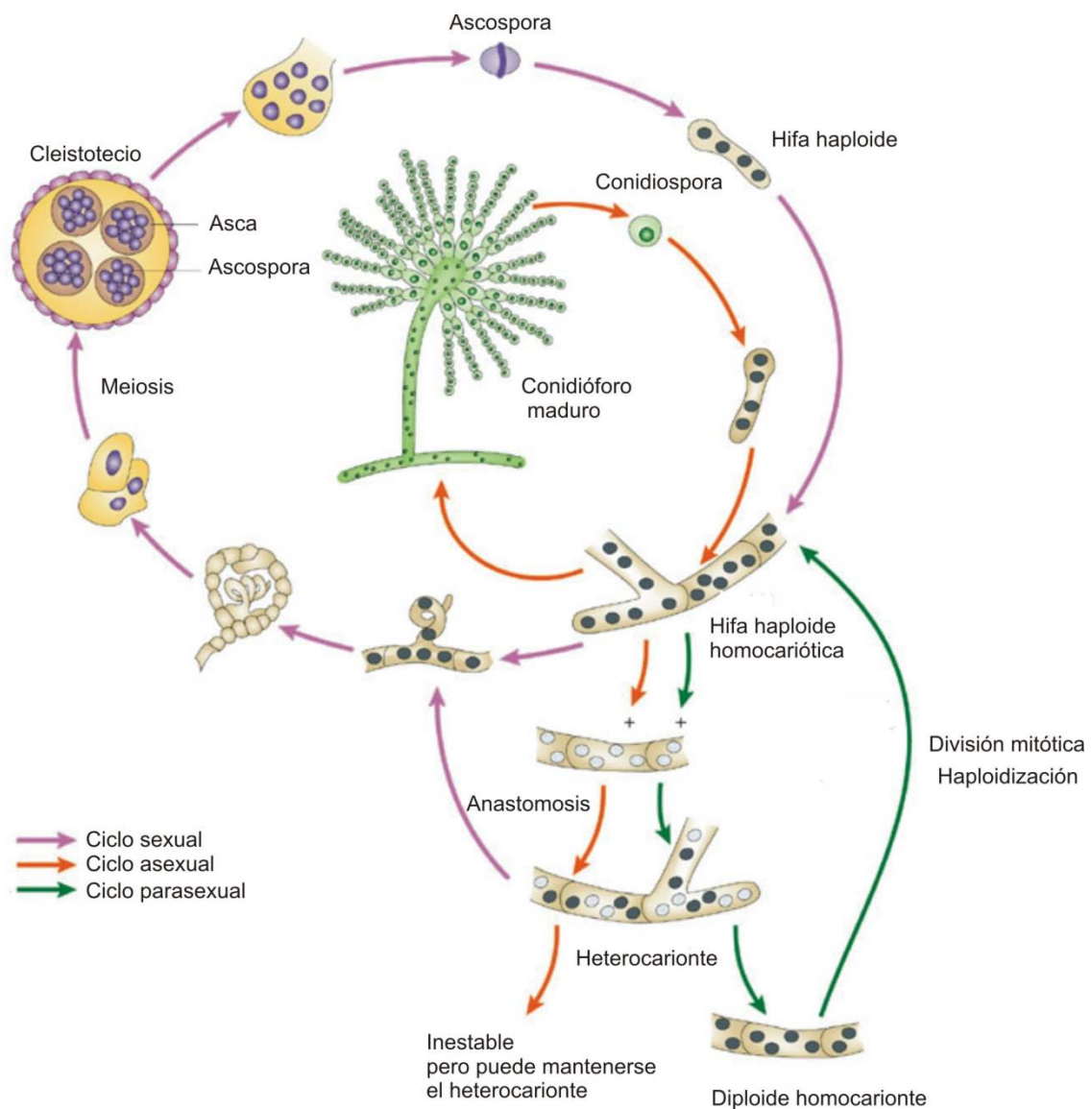


Fig. 11. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Tomado y modificado de [2]. Las distintas fases de cada ciclo se representan con flechas de diferente color. El ciclo sexual está señalado con flechas moradas, y se detallan los pasos más importantes que terminan en la producción de las ascosporas, binucleadas y con dotación genética n . El ciclo asexual está representado con flechas naranjas. Comienza con la germinación de la espóra, conidiospora (uninucleada) o ascospóra (binucleada), y haploide. Las conidiosporas se forman en hifas aéreas especializadas, en una estructura multicelular compleja denominada conidióforo. Finalmente, este organismo puede atravesar un ciclo de vida parasexual (flechas verdes) donde, tras la anastomosis de dos hifas, dos núcleos se fusionan y se forma una estirpe diploide. La dotación cromosómica n se reestablece por haploidización, suceso poco frecuente que puede inducirse mediante agentes despolimerizantes de microtúbulos. En los núcleos $2n$ puede existir recombinación mitótica, pero el máximo exponente de variación genética ocurre tras el proceso de haploidización con un nuevo reparto de cromosomas en los núcleos n de las nuevas células haploides que coexistirán hasta que transcurra un paso por el ciclo de reproducción asexual [6].

2. Homeostasis de cationes

La homeostasis de cationes es un proceso altamente regulado que permite mantener las concentraciones intracelulares de iones estables y relativamente constantes en respuesta a cambios en las condiciones externas. Esta composición intracelular de cationes consiste en concentraciones relativamente altas de potasio (10^{-1} M) y de magnesio (10^{-3} M), concentraciones moderadas de sodio (10^{-2} M) y concentraciones muy bajas de protones (10^{-7} M) y calcio (10^{-7} M), en relación a la concentración extracelular [19]. La tolerancia al estrés salino se consigue mediante complejas rutas homeostáticas que involucran el tráfico de los iones a través de las membranas y barreras biológicas [20].

Aspergillus nidulans es un organismo con una gran versatilidad metabólica y fisiológica que le permite sobrevivir en una gran variedad de ambientes. Esto es posible gracias a la efectividad de los mecanismos de regulación de la homeostasis, que operan tanto a nivel postraduccional (receptores de señales y transportadores de membrana que mantienen un gradiente de concentración de iones a través de las membranas) como a nivel transcripcional (factores de transcripción implicados en la expresión de genes que regulan respuestas a corto y largo plazo). En el trabajo desarrollado por Harris *et al* [21] se describe una relación de todas las proteínas conocidas hasta ese momento posiblemente involucradas en la homeostasis de iones en *A. nidulans*. Un ejemplo de la capacidad de adaptación de este organismo es el amplio rango de valores de pH ambiental que puede tolerar, desde pH 2,5 hasta 10,5 [22]. La eficiente homeostasis intracelular y la existencia de un sistema regulador de la expresión génica aseguran que los genes cuyos productos de transcripción han de desarrollar sus funciones en el medio extracelular se transcriban sólo al pH óptimo de actuación de las proteínas que codifican. Así por ejemplo, las fosfatasas ácidas o alcalinas extracelulares sólo se sintetizan cuando el pH extracelular es ácido o alcalino, respectivamente.

El regulador clave de la expresión génica en respuesta a la alcalinización del medio en *A. nidulans* es el factor de transcripción PacC. Sin embargo, este no es el único gen regulador que media una respuesta a pH ambiental alcalino. Se han identificado otros genes reguladores implicados en esta respuesta génica: *crzA* (*CRZ1* en *S. cerevisiae*) y *sltA*, cuya distribución filogenética está restringida al subfilo *Pezizomycotina* [1]. Los factores de transcripción CrzA y SltA son responsables además de la tolerancia al estrés salino en este organismo. Adicionalmente se ha descrito otro factor de transcripción en *A. nidulans*, *msnA* (*Msn2* en *S. cerevisiae*) involucrado en la respuesta a altas concentraciones de sal y cuyo mecanismo de acción permanece sin caracterizar [23]. En *A. parasiticus* y *A. flavus* se ha descrito que la

pérdida de este factor transcripcional incrementa la producción de conidias, aflatoxinas y ácido kójico [24].

2.1. Regulación génica por estrés ambiental mediada por PacC

El factor transcripcional PacC y los productos de los seis genes *pal* (*palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI*) componen la ruta de señalización por pH ambiental descrita por primera vez en *A. nidulans* [25;26]. Además, en la transducción de la señal de pH participan proteínas de los complejos ESCRT (“*endosomal sorting complex required for transport*”) pertenecientes a la ruta endocítica [27].

La señalización de PacC se desencadena por la señal de pH alcalino, transducida por la ruta *pal* y que da lugar al cambio conformacional de PacC, pasando de su forma inactiva a su forma activa. PacC activo es un represor de “genes ácidos” (aquellos que se expresan preferentemente a pH ácido) como la fosfatasa ácida, *pacA*, y la permeasa de GABA, *gabA*, y un activador de “genes alcalinos” (aquellos que se expresan preferentemente a pH básico), como *palD*, *ipnA* y *prtA* (Fig. I2, panel A) [4;28-30].

PacC es un factor de transcripción que contiene un dominio de unión a DNA formado por tres dedos de zinc tipo C₂H₂, que reconoce la secuencia consenso 5'-GCCARG (siendo R una purina) [30;31]. Existen tres formas de PacC en la célula, denominadas en función de su peso molecular: PacC⁷² (72 kDa), PacC⁵³ (53 kDa) y PacC²⁷ (27 kDa). El producto primario de transducción se denomina PacC⁷². PacC⁵³ y PacC²⁷ son el resultado de la proteólisis de la región C-terminal de PacC⁷². La activación de PacC⁷² en respuesta a la alcalinización del medio requiere dos cortes proteolíticos. El primero convierte PacC⁷² a PacC⁵³, y es dependiente de pH ambiental alcalino y de la integridad de la ruta *pal*, por lo que se le denomina “corte señalizador”. Esta reacción es catalizada por la proteasa PalB, produciéndose el corte en una región conservada de 24 residuos denominada “signaling protease box” (caja de la proteasa señalizadora). El segundo corte proteolítico es sobre PacC⁵³, independiente de pH ambiental y llevado a cabo por el proteasoma [32]. PacC²⁷, la forma completamente procesada de PacC, incluye el dominio de unión a DNA en su extremo N-terminal y es la forma activa, siendo la responsable de la activación y represión de los genes estructurales [33] (Fig. I2, panel B).

Además de modular su actividad transcripcional, el procesamiento proteolítico determina la localización celular de PacC [34]. En ausencia de señal de pH alcalino, la forma PacC⁷² se localiza principalmente en el citoplasma aunque una cierta proporción puede detectarse en el interior del núcleo. En respuesta a la alcalinización del medio, se desencadena

el procesamiento proteolítico que promueve la translocación nuclear tanto del intermediario PacC⁵³ como de la forma transcripcionalmente activa PacC²⁷.

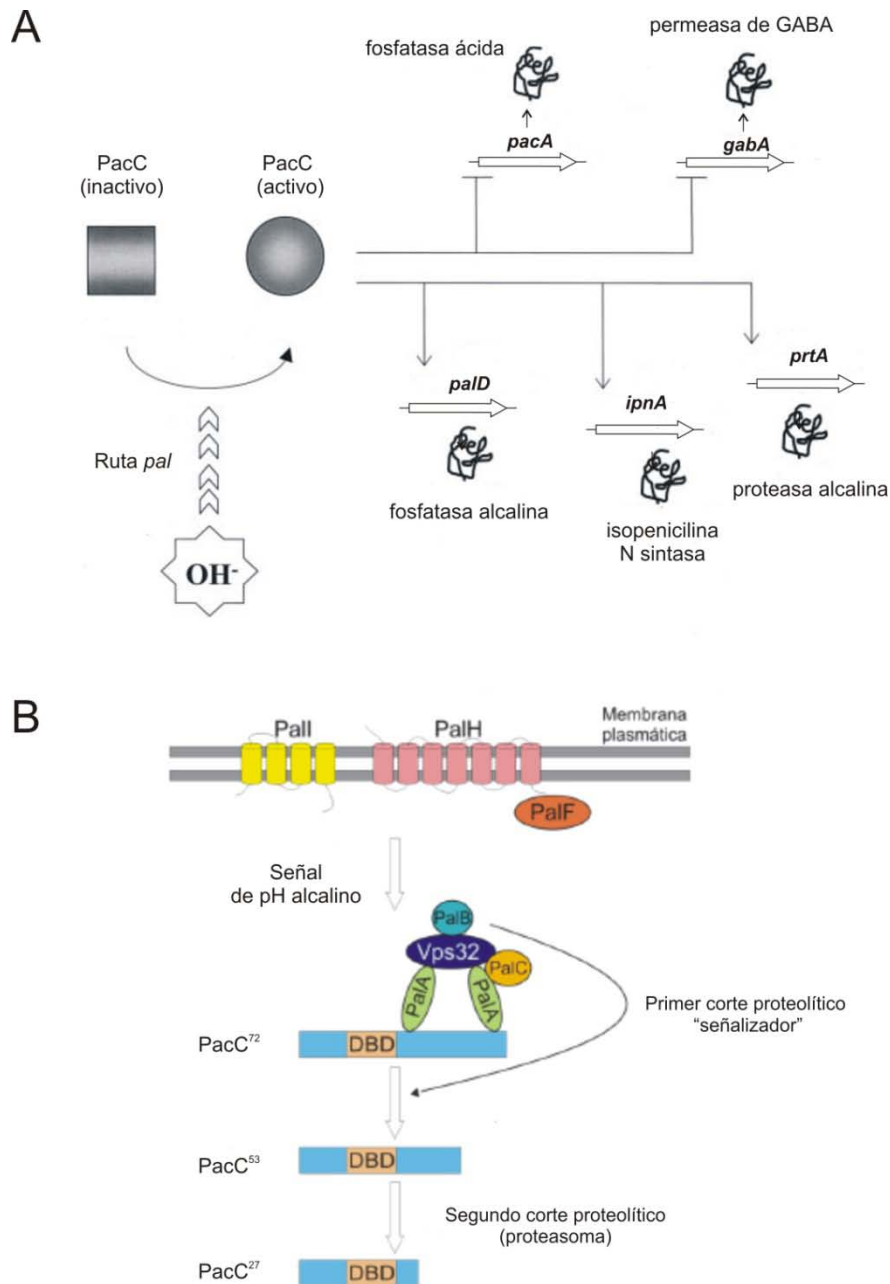


Fig. I2. Mecanismo de señalización de PacC. A) En respuesta a la señal de pH alcalino transducida por la ruta Pal, PacC pasa de una conformación inactiva a una activa. En su estado activo PacC tiene una función dual, actúa reprimiendo los "genes ácidos", tales como *pacA* y *gabA*, y activando los "genes alcalinos" como *palD*, *ipnA* y *prtA*. Tomado y modificado de [4]. B) La ruta de señalización de pH alcalino comienza a nivel de la membrana plasmática a través del complejo formado por las proteínas integrales de membrana Pall y PalH, y la arrestina PalF. La señal se transmite mediante la maquinaria endocítica al complejo formado por las proteínas PalA, PalB y PalC que interaccionan con la proteína Vps32, que a su vez puede formar parte del complejo ESCRT perteneciente al sistema de endocitosis. La activación de la ruta Pal desencadena el procesamiento proteolítico de PacC en dos pasos, siendo el primero dependiente de pH y de la actividad de la cistein-proteasa PalB (ver texto).

2.2 Regulación génica por estrés ambiental mediada por CrzA

La proteína CrzA pertenece a la familia de factores transcripcionales denominada "calcineurin-responsive-zinc fingers", Crz. Concretamente su dominio de unión a DNA está constituido por tres dedos de zinc, dos de ellos son del tipo C_2H_2 y el tercer dedo de zinc presenta una estructura atípica CCHC [1].

En *S. cerevisiae*, Crz1p, es esencial en la tolerancia al estrés catiónico por Ca^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Li^+ , la elevación del pH o la exposición prolongada a la luz [35-37]. Cualquiera de estos estímulos desencadena la respuesta celular que produce la activación transcripcional de Crz1p [38]. Sin embargo, en *A. nidulans* la tolerancia al estrés catiónico se reparte entre las proteínas CrzA y SltA, de manera que CrzA es esencial en la tolerancia a los cationes Ca^{2+} y Mn^{2+} , mientras que SltA lo es para el crecimiento en presencia de los cationes Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Mg^{2+} o Mn^{2+} . Al contrario que *sltA*, la pérdida de función en *crzA* no produce hipersensibilidad al antibiótico neomicina [1], fenotipo cuyo origen biológico/molecular se desconoce pero que se ha utilizado de forma estandarizada para medir la actividad de PacC [30]. Para que el hongo pueda crecer correctamente en medio a pH alcalino es esencial tanto el papel de CrzA como el de SltA (Fig. 13).

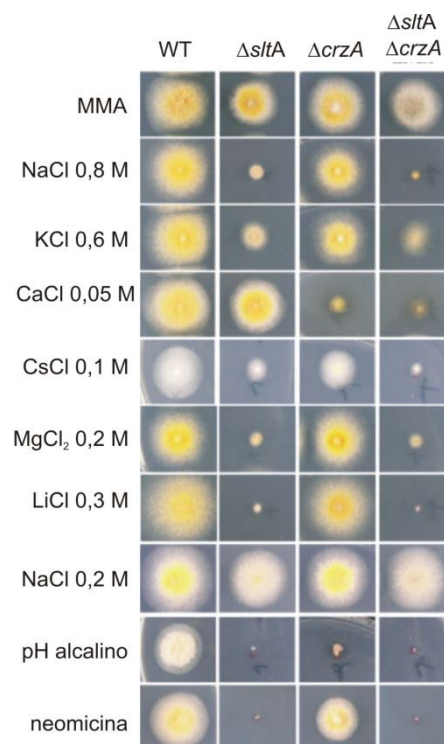


Fig. 13. Fenotipo de sensibilidad a diferentes condiciones de estrés abiótico mostrado por las cepas de *A. nidulans* portadoras de alelos nulos de los genes *sltA* y/o *crzA*. Tomado y modificado de [1].

CrzA actúa como activador de la expresión génica tanto a niveles basales como en respuesta al estrés por calcio [39]. Los estudios realizados en el laboratorio han permitido caracterizar los mecanismos que regulan la señalización de CrzA [5] y demostrar que de forma análoga a la ruta de señalización de Crz1p en *S. cerevisiae*, CrzA modifica su localización celular en respuesta al estímulo de estrés [1;5].

CrzA es una fosfoproteína que se encuentra en un estado fosforilado en el citoplasma en ausencia de estímulo de estrés ambiental. La exposición a un número determinado de estreses ambientales produce un aumento en los niveles citosólicos de calcio que da lugar a la desfosforilación de CrzA, y a la consecuente migración del factor transcripcional al interior nuclear donde se acumula y se desencadena la respuesta transcripcional. Este mecanismo es reversible, ya que el restablecimiento de la forma fosforilada de CrzA produce su redistribución por el citoplasma. La desfosforilación de CrzA está mediada por la calcineurina, una fosfatasa cuya actividad depende directamente de la presencia de calcio. En el proceso de fosforilación de CrzA participan al menos dos quinasas, CkiA, proteína homóloga de CKI ("Casein kinase I") y GskA, proteína homóloga de GSK3 ("glycogen-synthase-3 β kinase") (Fig. 14)[5].

Entre los genes que están regulados por CrzA se incluyen los que codifican para el transportador vacuolar de antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ de baja afinidad, *vcxA* [1] o los que codifican para los homólogos descritos en *S. cerevisiae* con actividad Ca^{2+} -ATPasa de tipo P o relacionadas con el transporte del calcio [39].

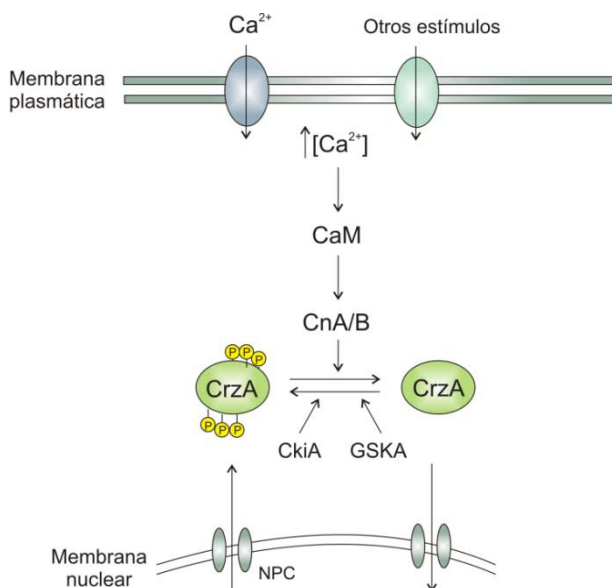


Fig. 14. Modelo de regulación de CrzA. Los estímulos extracelulares de estrés producen un aumento de los niveles de calcio intracelular, debido a la entrada de este a través de los canales de la membrana plasmática y a su liberación desde los orgánulos internos. El calcio acumulado se une a la proteína calmodulina (CaM) y a la subunidad B, reguladora (CnB), de la calcineurina, induciendo cambios conformacionales en la subunidad A, catalítica (CnA), de la calcineurina que favorecen su actividad fosfatasa. La desfosforilación de CrzA mediada por la calcineurina promueve su migración nuclear, donde se acumula y desencadena la respuesta transcripcional necesaria. Este mecanismo es reversible, ya que la fosforilación de CrzA, mediada al menos por la proteína "casein-kinase-I", CkiA y "Glycogen synthase kinase 3 β ", GskA, promueve su redistribución por el citoplasma. NPC: complejo del poro nuclear.

2.3 Regulación génica por estrés ambiental mediada por SltA

El gen *sltA* codifica para un factor de transcripción cuyo dominio de unión a DNA consiste en tres dedos de zinc del tipo C_2H_2 y que se localiza en el extremo C-terminal de la proteína [1]. Este gen, también llamado *stzA*, fue identificado por primera vez por O'Neil y colaboradores [40] mediante el aislamiento de la mutación *sltA1*. Esta mutación sustituye el codon codificante para el triptófano 502 por un codón de parada dando lugar a la pérdida del extremo C-terminal de la proteína. La caracterización inicial del mutante *sltA1* mostró un fenotipo de sensibilidad a determinados estreses abióticos como altos niveles de NaCl, la arginina, luz UV y al agente alquilante N-Metil-N'-Nitrosoguanidina (MNNG). Estudios de crecimiento llevados a cabo por Clement y colaboradores [41] con cepas *sltA1* sugerían que los fenotipos de sensibilidad a sal y a arginina se debían a defectos en el mismo gen.

Un posible homólogo del factor de transcripción SltA en *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) fue previamente identificado como Ace1, un represor de la transcripción de los genes que codifican para la celulasa y xilanasas [42]. Las secuencias de aminoácidos de SltA y Ace1 comparten su mayor grado de similitud en el dominio de unión a DNA, por lo que no es extraño que se unan a la misma secuencia consenso en el DNA, 5'-AGGCA-3' [1].

Previamente el grupo de trabajo había demostrado que SltA muestra una función activadora de la expresión génica de *enaA* y una función represora de los genes *vcxA*, *pmcA* y *pmcB* [1;43]. Los genes *ENA1-4* en *S. cerevisiae* codifican para Na^+ -ATPasas de tipo P que permiten la tolerancia al estrés salino controlando los niveles citoplasmáticos de Na^+ . El gen *VCX1* de *S. cerevisiae* (*vcxA* en *A. nidulans*) codifica para un transportador vacuolar de antiporte Ca^{2+}/H^+ de baja afinidad mientras que *PMC1* (*pmcA* y *pmcB* en *A. nidulans*) codifica para una Ca^{2+} -ATPasa de alta afinidad. Ambas proteínas Vcx1p y Pmc1p participan en la regulación de las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} [44]. La sensibilidad al sodio de las cepas Δ *sltA* podría explicarse en parte por la baja expresión de la Na^+ -ATPasa EnaA.

Otro aspecto interesante de la función SltA es la relación génica con HalA. HalA es una quinasa de la familia NPR ("nitrogen permease reactivator") y que participa en la regulación de la homeostasis de diferentes cationes [45]. La delección simultánea de los genes *sltA* y *halA* ocasiona un fenotipo denominado "auxotrofia de calcio" [43]. La base biológica y fisiológica de este fenotipo se desconoce, pero se ha hipotetizado que es debido a una inadecuada regulación del contenido intracelular del calcio. Las proteínas HalA y SltA son necesarias para la correcta expresión de algunos de los transportadores vacuolares de calcio, *pmcA* y *pmcB*. El incremento en la expresión de estos transportadores, la elevación del volumen vacuolar y la necesidad de una elevada concentración del catión calcio en el medio para una completa

supresión del fenotipo del doble mutante $\Delta halA \Delta sltA$, sugirió la existencia de bajos niveles de calcio en el citoplasma en dicho fondo genético. La pérdida de función *pmcA* y *pmcB* suprime el elevado requerimiento de calcio en esta cepa doble mutante, mostrando así el papel de las vacuolas en la homeostasis de calcio en *A. nidulans*. Sin embargo la regulación del balance de cationes en el doble mutante debe ser compleja. Así, empleando métodos de genética clásica y genética en reverso se han identificado mutaciones que suprimen la auxotrofia de calcio en los genes *nhaA* (*NHA1* en levadura) y *trkB* (*TRK1* en levadura), que codifican para un transportador de membrana de antiporte Na^+/H^+ y un transportador de K^+ de alta afinidad, respectivamente [43;46]. En este sentido, también hemos observado cómo el calcio es capaz de suprimir un gran número de defectos causados por la delección de *sltA* en estadios tempranos del crecimiento.

En un trabajo reciente del grupo [47] se ha propuesto la participación de SltA en el desarrollo morfológico y en la síntesis de la micotoxina esterigmatocistina en *A. nidulans*. La delección del gen *sltA* ocasiona una considerable reducción en los niveles del transcrito de *brlA* cuando se induce el ciclo reproductivo asexual. BrlA es un factor de transcripción clave en la conidiación, por lo que esta cepa manifiesta un reducido número de conidias. Además se estudió la expresión de *sltA* en los ciclos de vida vegetativo, asexual y sexual determinándose una fuerte expresión en todos ellos, acentuada en el ciclo de vida vegetativo. Respecto a su implicación en el ciclo sexual, se determinó que una cepa $\Delta sltA$ no daba lugar a la formación de cleistotecios y la producción de células de Hülle estaba claramente reducida. En cuanto a la biosíntesis de esterigmatocistina, una micotoxina de estructura similar a la aflatoxina, se ha detectado una menor producción de esta en cepas *sltA*⁻ y se ha determinado una expresión de genes implicados en su síntesis, *afIR* y *stcU*, SltA-dependiente, otorgando así a SltA un papel en la regulación de metabolitos secundarios.

Además se ha propuesto una función para SltA dentro del sistema de tráfico intracelular de endomembranas. La interacción genética entre mutaciones en SltA y en la quinasa HalA no es única dado que se ha observado también una interacción genética con mutantes en diferentes genes *vps* (“*vacuolar protein sorting*”). El fenotipo letal que resulta de las delecciones en algunos de los genes *vps* puede ser suprimido mediante mutaciones de pérdida de función en *sltA*. Aprovechando este análisis genético se ha podido descubrir a *sltB*, un nuevo *locus* de la ruta Slt y que se detallará en el siguiente apartado.

La descripción de la ruta de señalización de SltA es el objetivo principal de esta tesis, así como la caracterización de la proteína señalizadora SltB.

2.4 Las modificaciones postraduccionales como mecanismo de regulación de la actividad de los factores transcripcionales

Las proteínas son las efectoras de gran parte de las funciones celulares y su función está a su vez regulada a múltiples niveles, que incluyen su síntesis y degradación, su localización intracelular y modificaciones postraduccionales [48]. La modificación postraduccional de proteínas supone un mecanismo fundamental de regulación de su actividad biológica, y su naturaleza puede ser muy variada. De entre todas ellas, se describen a continuación la fosforilación y la proteólisis por su interés con este trabajo.

2.4.1 Fosforilación como mecanismo de regulación

La fosforilación es un proceso reversible en el que se produce la unión covalente de un grupo fosfato al grupo hidroxilo de una serina, treonina o tirosina. Este grupo fosfato procede principalmente del ATP. Esta reacción es catalizada por dos grandes familias de quinasas, las Serina/treonina proteínas quinasas y las tirosina proteínas quinasas [49]. La reversibilidad de esta modificación se debe a la actividad de proteínas fosfatasas, que eliminan los grupos fosfato de su sustrato dando lugar a la liberación de una molécula de ión fosfato y la aparición de un grupo hidroxilo en el lugar en el que se encontraba esterificado el grupo fosfato. Esto supone que la proteína "regresa" al estado nativo anterior a su modificación.

Un estudio realizado en células HeLa en el 2006 [50] reveló que la fosforilación es la modificación más frecuente (más de 6000 sitios de fosforilación identificados en más de 2000 proteínas analizadas), pero lo más interesante es que una gran proporción de estas modificaciones son moduladas en respuesta a señales extracelulares. Un ejemplo de ello en hongos es el modelo de señalización del factor transcripcional Crz1p, basado en un mecanismo de fosforilación - desfosforilación que determina su localización y función celular en respuesta a unas determinadas señales extracelulares. En condiciones de ausencia de estrés Crz1p se encuentra en el citoplasma fosforilado, proceso en el que intervienen la quinasa Hrr25p y quinasas de la familiar PKA ("*cAMP-dependent protein kinase A*") [51;52]. La exposición a estrés ambiental produce un aumento en los niveles de calcio citosólico, lo que da lugar a la desfosforilación de Crz1p por la calcineurina, acumulándose este factor transcripcional en el núcleo. Tanto en Crz1p como en CrzA en *A. nidulans*, se ha demostrado que la ausencia de actividad fosfatasa calcineurina da lugar a una pérdida de función del factor transcripcional, por lo tanto en este caso la desfosforilación juega un papel positivo en la activada del factor transcripcional. En otros casos, la fosforilación produce el efecto contrario y se necesita para

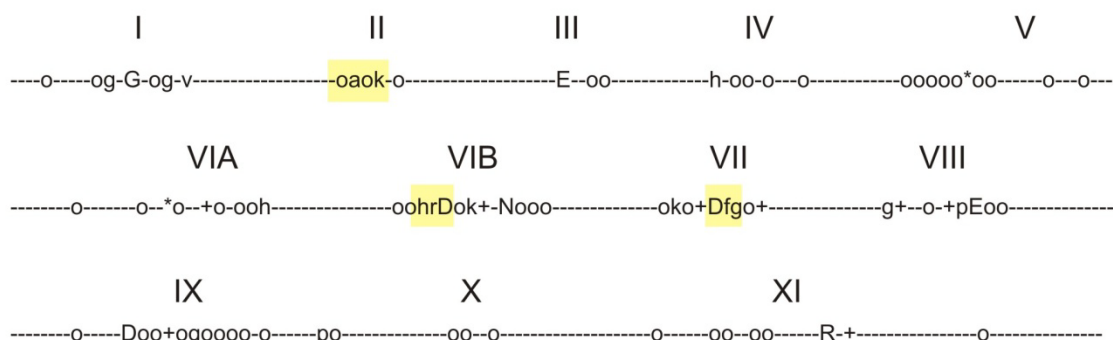
activar la función de la proteína diana, siendo un ejemplo clásico la activación mediante fosforilación inducida por cAMP-PKA, del factor CREB en su regulación dual del gen *c-jun* [53].

Las fosfatasas son clasificadas basándose en tres criterios: la conservación en su estructura primaria, la estructura y el mecanismo catalítico. Según este último criterio, se distinguen a su vez tres grupos principales: las serina-treonina fosfatasas, las tirosina fosfatasas y las aspartato fosfatasas [54;55]. En el genoma de *A. nidulans* se han identificado 28 genes que expresan proteínas fosfatasas. Mediante un análisis sistemático de deleciones se han definido cuatro de ellas como esenciales y otras cuatro como requeridas para el desarrollo normal del hongo [54]. Como interés para esta tesis indicar que no se ha relacionado directamente la actividad de las fosfatasas no esenciales con la regulación de la respuesta al estrés catiónico o a la alcalinización del pH ambiental. Sólo la calcineurina, CnaA, inicialmente considerada esencial [56], ha sido investigada y demostrada su actividad sobre el factor CrzA [57].

Entre las quinasas hay una gran variedad de estructuras, modos de regulación y especificidades de sustrato, pero hay motivos estructurales conservados. Estudios tridimensionales de estructura de proteínas han permitido definir el dominio quinasa como el conjunto de 12 subdominios, ~ 250 - 300 aminoácidos, conservados que se pliegan en un *core* (centro) catalítico común [3]. Estos subdominios se definen como regiones que no son interrumpidas por grandes inserciones de aminoácidos, y que contienen patrones característicos de residuos conservados (Fig. 15). Tres de los motivos más importantes para la actividad catalítica son VAIK, DFG y HRD (nombrados por los aminoácidos característicos para su identificación). Aunque la lisina del dominio VAIK puede reemplazarse por una arginina, el aspártico de los dominios DFG y HRD son invariables [7]. Un aspecto a señalar, y que es de interés para este trabajo, es que aproximadamente el 10 % de las proteínas que componen el *kinoma* humano son predichas como catalíticamente inactivas, debido a cambios aminoacídicos en motivos esenciales [58]. Estas proteínas se han definido como pseudoquinasas, y se cree que proceden de quinasas ancestrales puesto que conservan sus características estructurales. Mientras que algunas pseudoquinasas han mostrado ausencia de actividad catalítica, existen trabajos donde se ha demostrado que estas proteínas pueden tener una actividad catalítica remanente y algunos autores las relacionan como reguladores en procesos de señalización, bien asociándose a otras quinasas activas o reclutando diferentes elementos necesarios para la señalización [58;59]. Por ejemplo, tres miembros de la familia de receptores tirosina quinasas de eucariotas Eph ("*Ephrin receptors*"), son predichos como pseudoquinasas [60], y cada miembro de la familia JAK ("*Janus kinase*") contiene una quinasa

activa y un dominio pseudoquinasa auto-regulatorio [61]. Interesantemente, el *kinoma* de *Toxoplasma* está enriquecido de pseudoquinasas (>30 % de aproximadamente 160 quinastas) que son secretadas en la célula hospedadora afectando a la señalización del hospedador, y por tanto, a la virulencia [7].

A



B

Nombre	Motivos		
	VAIK	HRD	DFG
ROP2	FEV H	HT Y	G FE
ROP4	RNE G	HG K	D FG
ROP5	FAL K	HGR	D VS
ROP7	RHQ A	HG K	D FG
ROP8	FEV H	HT Y	G FE

VAIK = Subdominio II
 HRD = Subdominio VIB
 DFG = Subdominio VII

Fig. I5. Estructura primaria de la superfamilia de proteínas quinastas de eucariotas. A) Se representa la secuencia consenso de los dominios conservados en la estructura primaria de la superfamilia de proteínas quinastas de eucariotas. La secuencia fue obtenida tras realizar múltiples alineamientos con 60 dominios quinasa representativos de esta familia, que pueden consultarse en la referencia[3]. La nomenclatura utilizada es la siguiente: letras mayúsculas, residuos invariables; letras minúsculas, residuos con poca variación; o, residuos no polares; *, residuos polares; +, residuos de polaridad neutra. B) Ejemplos de sustituciones en los motivos conservados de cinco pseudoquinasas de *Toxoplasma*. Los residuos intolerantes a la sustitución son señalados en rojo, y las sustituciones en las pseudoquinasas que, predeciblemente, alteran la actividad catalítica están marcados en negrita. Tomado y modificado de la referencia [7].

En el genoma de *A. nidulans* se han identificado 131 genes codificantes de proteínas quinastas. De este conjunto, se ha estudiado el papel de 128 quinastas mediante generación de alelos nulos y sólo 44 han sido caracterizadas genéticamente (ver referencias en el análisis sistemático realizado por Osmani y colaboradores, [17]). En este trabajo se sugiere la clasificación de 11 de estas quinastas como específicas de hongos filamentosos, pero no se

hace referencia al posible número de pseudoquinasas existentes. Sólo se identifica a la quinasa SldA^{Bub1/R1}, único miembro de la familia Bub1/BubR1/Mad3 en *A. nidulans*. La mayoría de organismos expresan dos proteínas relacionadas con la quinasa Bub1, esencial para la progresión mitótica; en humanos existen las quinasa Bub1 y BubR1, y en levaduras Bub1 y Mad3, relacionada con BubR1. Tanto BubR1 como Mad3 han sido propuestas como pseudoquinasas, debido a la falta del dominio quinasa. Sin embargo, SldA^{Bub1/R1} contiene todos los dominios funcionales de la familia Bub1/BubR1/Mad3, incluyendo un dominio quinasa pero que es más similar al de la quinasa Bub1 que al de la pseudoquinasa BubR1. Hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio sobre la función de las pseudoquinasas codificadas en el genoma de *A. nidulans*.

2.4.2 Proteólisis como mecanismo de regulación

Las proteasas son elementos clave en los procesos de regulación, por ejemplo en rutas de cascadas de señalización como la apoptosis, regulación del metabolismo (SREBPs) o la diferenciación celular (proteínas Rel/Gli, Zic y Ci) [62-66]. A diferencia de la modificación postraduccional mediante fosforilación, la proteólisis no es un proceso reversible. El procesamiento proteolítico puede eliminar proteínas reguladoras cuando su función ya no es requerida, o transformar otras que permanecen en un estado latente a un estado biológico activo. Otro mecanismo en el que están involucradas es en el cambio de localización celular de muchas proteínas ancladas a membrana que tienen que migrar al núcleo para llevar a cabo su función [67]. En hongos un ejemplo paradigmático de un factor transcripcional regulado por proteólisis es PacC, donde la proteasa PalB produce el primer corte proteolítico de la proteína, lo que supone su señalización, y el segundo da lugar a la forma funcional PacC²⁷, capaz de activar la expresión de los genes “alcalinos” y reprimir la de los genes “ácidos”. Mutaciones que impiden que ocurra el primer corte proteolítico dan lugar a formas inactivas [68]. Además, el procesamiento proteolítico regula tanto la actividad transcripcional de PacC como su localización celular [34].

El mecanismo de acción de una proteasa no es aleatorio aunque existen diferentes grados de especificidad en la identificación y procesamiento de sus sustratos [69]. Este reconocimiento del sustrato depende de una gran variedad de factores, como la co-localización de la proteasa y el sustrato en el mismo compartimento celular, y la accesibilidad a la diana de corte mediante la exposición de esta a través de cambios en el plegamiento de la proteína sustrato [67]. Una variación a esta accesibilidad es la compartimentación de los sitios activos dentro de una proteasa de gran tamaño. Un ejemplo de ello es el proteasoma o

proteasa DegP de *E. coli*, donde los sitios activos se localizan en una cavidad interna a la que sólo pueden acceder proteínas desplegadas [70].

Mientras que la accesibilidad al sustrato presenta una manera de regular la actividad proteasa, otros principios generales incluyen la activación e inhibición de la proteasa. Muchas de las proteasas clásicas como la tripsina son sintetizadas como zimógenos para prevenir su actividad en determinados órganos o compartimentos. Una vez recibida la señal relevante, se desencadena el corte proteolítico que libera el fragmento proteasa, en algunos casos es autoproteólisis, que mantiene de forma constitutiva su actividad proteasa hasta que es inhibida o degradada [67;69].

La función de las proteasas es hidrolizar enlaces peptídicos, y su clasificación se realiza conforme a tres criterios: 1) tipo de reacción catalizada, 2) naturaleza química del sitio catalítico y 3) relación evolutiva con referencia a la estructura [71]. A grandes rasgos las proteasas se dividen en dos grupos, exopeptidasas y endopeptidasas dependiendo de la localización de su sitio de acción. Las exopeptidasas rompen enlaces peptídicos próximos al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, mientras que las endopeptidasas rompen las uniones peptídicas de aminoácidos no terminales del sustrato (dentro de la molécula). Basándose en el grupo funcional del centro activo, las proteasas se clasifican en cuatro grupos: serina proteasas, aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas (un metal, normalmente zinc). Respecto a su estructura primaria, las proteasas se clasifican en diferentes familias y además se subdividen en clanes para englobar a un determinado conjunto de proteasas que han divergido de un ancestro común [69;72].

En la base de datos de proteasas MEROPS aparecen identificadas 265 posibles proteasas en el genoma de *Aspergillus nidulans*, de las cuales, 102 no presentan homólogos entre otros organismos. Así como existe un análisis funcional del “*kinoma*” de *A. nidulans* [17] no se ha realizado hasta la fecha ningún estudio funcional de proteasas a gran escala en este organismo.

3. Antecedentes al trabajo elaborado en esta tesis doctoral sobre el gen *sltB*

El trabajo realizado por los grupos de los Prof. Arst y Peñalva había puesto de manifiesto la relación entre la ruta endocítica de *A. nidulans* y la ruta SlT. El crecimiento y la conidiación de mutantes nulos *vps* era notablemente mejorado mediante la aparición espontánea de mutaciones supresoras extragénicas [73]. Estudios de genética clásica y de análisis de secuencia realizados sobre estos mutantes indicaron que, en la mayoría de los casos, la supresión del fenotipo que mostraban las cepas nulas Δvps era el resultado de una

pérdida de la función *sltA*. Todas las restantes mutaciones supresoras ocurrían en un nuevo *locus*, denominado *sltB*. Para ambos genes, esta pérdida de función podría ser parcial o total.

Los mutantes *mx* y *sltB2* permitieron la identificación del *locus sltB*. La cepa ELQ (*mx*, *pabaA1*, *yA2*, *suA1adE20*; *niiA4*) fue aislada por R. Lockington durante la obtención del alelo nulo *vps broA*, mostrando un fenotipo idéntico al que mostraba un mutante nulo *sltA*. Es decir, ambos eran sensibles a ciertas sales y a la alcalinidad del medio, hecho por el cual fueron relacionados como miembros de la misma ruta señalizadora/reguladora. Para identificar el *locus* en el que se localizaba la mutación *mx* se complementó este mutante utilizando una genoteca de DNA genómico construida en el plásmido autorreplicativo pRG3-AMA-NotI.

Se realizaron experimentos de transformación utilizando diferentes cantidades de la genoteca de gDNA y la cepa *mx*, *pabaA1*, *yA2*, *suA1adE20*; *niiA4* (ELQ). Se seleccionaron transformantes que portasen plásmidos autorreplicativos que les permitieran crecer en medio suplementado con KCl 0,6 M. De los diferentes transformantes se aisló DNA genómico, que contiene también DNA plasmídico, y con una fracción de este aislado se transformó *E. coli* seleccionando los diferentes clones mediante la resistencia al antibiótico β -lactámico ampicilina que confiere el plásmido. Se obtuvieron los plásmidos p6.2 y p4.6, con insertos de gDNA de diferentes tamaños y se procedió a determinar los límites del inserto en cada uno de los aislados mediante secuenciación del mismo, utilizando oligonucleótidos que apareaban en las regiones flanqueantes al sitio de multiclonaje (pRG3-UP y pRG3-DW).

Simultáneamente, el Profesor Arst obtuvo la cepa *pyrG89*, *sltB2*, *biA1*; *halA24*; *pantoB100*. Esta estirpe mostraba el mismo fenotipo que el mutante *halA24*; *sltA1* [43], por lo que también se relacionó con la misma ruta señalizadora/reguladora Slt. Con el objetivo de determinar si la mutación *mx* y la mutación *sltB2* se localizaban en el mismo *locus*, se transformó esta cepa con los plásmidos p6.2 y p4.6. Se seleccionaron los transformantes que portaban plásmidos autorreplicativos utilizando el marcador *pyrG89*, dado que el plásmido tiene el gen homólogo en *Neurospora crassa pyr-4*. Además, se verificó que el gDNA que contenía estos plásmidos complementaba el fenotipo de sensibilidad a sales mostrado por esta cepa, debido a la mutación *sltB2*.

Posteriormente se secuenciaron los plásmidos p6.2 y p4.6, permitiendo así definir los límites del *locus sltB* y sus regiones adyacentes. El fragmento de gDNA contenido en el plásmido p4.6 comenzaba en la coordenada 1.136.528, correspondiente al Cromosoma I, *locus* AN6133. Este gen codifica para una hipotética succinato deshidrogenasa. El límite inferior definido por este fragmento se sitúa en la coordenada 1.143.486, careciendo de parte de la región 3'UTR. El tamaño del inserto contenido en el plásmido p4.6 es de 6968 pb.

El plásmido p6.2 contenía un fragmento de gDNA más pequeño que el plásmido p4.6 pero incluía la región codificante (*CDS*) completa de *sltB*, 4031 pb. Los límites definidos para este fragmento corresponden a las coordenadas 1.138.516 – 1.143.547, excluyendo la *CDS* correspondiente al *locus* AN6133.

Cabe destacar que experimentos posteriores permitieron verificar que la mutación *sltB2* correspondía a una delección completa del *locus sltB* y de las regiones adyacentes a éste (> 9 kb). Esto se determinó analizando el gDNA del mutante *sltB2* mediante *Southern-blot* con la sonda específica, verificando la ausencia de dichas regiones en su secuencia genómica.

Los análisis genéticos realizados por el Profesor Arst situaban a este nuevo gen en el cromosoma I, y su secuencia genómica fue depositada en la base de datos de *A. nidulans* con el código de acceso AN6132. Las coordenadas correspondientes en el genoma para este *locus* son 1.139.110-1.144.155.

El conjunto de resultados obtenidos indicaron que la mutación *mx* y *sltB2* correspondían al mismo *locus*, que se denominó *sltB*. A partir de este punto comienza el estudio sobre la proteína SltB, descrito en esta tesis doctoral

Objetivos

Esta tesis doctoral ha sido enfocada hacia el estudio del proceso de señalización del factor transcripcional SltA, que media la respuesta a estrés por determinados cationes y la alcalinización del medio en *Aspergillus nidulans*. La caracterización de este novedoso sistema regulatorio, junto a su específica distribución filogenética, nos ha suscitado un gran interés debido a su implicación en los procesos de homeostasis celular y patogénesis. Utilizando las herramientas genéticas y moleculares disponibles se ha profundizado en el conocimiento de la ruta Slt.

Los objetivos planteados al comienzo de esta tesis fueron:

1. Estudiar los mecanismos de señalización, activación y regulación del factor transcripcional SltA.

El factor transcripcional SltA ha sido caracterizado a un nivel muy básico. Este objetivo pretende entender cómo este regulador es modificado y regulado en su actividad, para ello se generarán nuevas formas mutantes y se expresarán quimeras que permitirán determinar su estado de modificación y su localización celular.

2. Caracterizar la proteína señalizadora SltB, así como su función en la célula.

Se ha descubierto recientemente este nuevo elemento de la ruta Slt. Esta tesis doctoral inicia el estudio del producto codificado por el gen *sltB* y su papel en la homeostasis de cationes y tolerancia de la alcalinidad. Se fijan dos líneas básicas de estudio.

- a) La realización de un análisis funcional del producto del gen *sltB*.
- b) Determinar los mecanismos de señalización y regulación de SltB.

3. Determinar la relación funcional entre SltA y SltB y con otros elementos conocidos implicados en la respuesta catiónica y el pH ambiental.

Materiales y Métodos

1. Medios y condiciones de cultivo

1.1 Medios y condiciones de cultivo para *Aspergillus nidulans*

La composición de las soluciones y suplementos empleados en los medios de cultivo para *Aspergillus* se describen en la siguiente sección. Salvo en los casos indicados, la composición de los medios fue originariamente descrita en [74]. Todos los cultivos en medio sólido se incubaron a 37 °C. Para los cultivos en medio líquido se utilizaron matraces cónicos de diferentes capacidades, y fueron incubados en agitadores orbitales con una agitación de 250 rpm, y a las temperaturas de 37 °C ó 30 °C. Para microscopía se utilizó un medio mínimo líquido específico, WMM, “*Watch Minimal Medium*” [75] en condiciones de cultivo estáticas a la temperatura de 25 °C (temperatura ambiente del laboratorio).

1.1.1 Medio mínimo de *Aspergillus* (MMA)

Para cada litro de medio se diluyeron 20 ml de solución de sales y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110 °C. Para el medio mínimo sólido se añadió 1,5% (p/v) agar Oxoid. Después de la esterilización, y antes de ser repartido en las placas de Petri, se añadieron los suplementos necesarios para cada estirpe así como la fuente principal de carbono, D-glucosa al 1% (p/v), y de nitrógeno, tartrato de amonio a una concentración final de 5mM.

1.1.2 Medio mínimo de *Aspergillus* adaptado (MMA*)

Para llevar a cabo el análisis del contenido interno y de los flujos de cationes se adaptó la composición del MMA eliminando el potasio de la solución de sales para que no interfiriese en el valor de los resultados. Para ello se sustituyó el fosfato de potasio por fosfato de amonio a una concentración de 11 mM, y el medio fue preparado con agua miliQ en lugar de con agua destilada. El valor de pH de este medio es 6,5. Para preparar el MMA* sólido se añadió 0,1 % (p/v) agar sin trazas de potasio.

1.1.3 Medio de fermentación (MFA)

El principal componente de este medio es el compuesto bifásico CSL (“*corn steep liquor*”). Para su preparación se mezclan previamente las fases sólida y acuosa.

La composición del medio para un litro es:

- 25 g CSL
- 20 ml de solución de sales

Se añadió agua destilada hasta completar el volumen de un litro. El medio se agitó durante 20 minutos y se filtró al vacío, ajustando el pH al valor de 6,8 con NaOH. Posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 110 °C. En el momento de su utilización se añadieron los suplementos necesarios para cada estirpe y las fuentes principales de carbono y nitrógeno, sacarosa al 3 % (p/v) y 5 mM de tartrato amónico, respectivamente.

1.1.4 Medio completo de *Aspergillus* (MCA)

La composición del medio para un litro es:

- 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.

Se añadió agua destilada hasta un volumen de un litro y se ajustó el pH a 6,8 utilizando una solución concentrada de hidróxido sódico (NaOH 10 M). Para el medio sólido se añadió 1,5% (p/v) de agar Oxoid. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110 °C. La solución de vitaminas se añadió antes de su utilización a una concentración de 10 ml/l. La fuente principal de nitrógeno se añadió también posteriormente a la esterilización del medio, tartrato de amonio a la concentración final de 5 mM, al igual que los requerimientos específicos de cada estirpe.

1.1.5 Medio de regeneración (MMR)

La composición del medio para un litro es:

- 20 ml de solución de sales.
- 342 g sacarosa (1M).

Se añadió agua destilada hasta completar un litro de volumen y se ajustó el pH a 6,8 como se indica en el apartado anterior. Antes de esterilizar el medio en el autoclave se añadió 1,5% (p/v) de agar Oxoid. Las fuentes principales de carbono, 1% de D-glucosa (p/v) y nitrógeno, tartrato de amonio a la concentración final de 5 mM, junto con los suplementos nutricionales necesarios para el crecimiento de las diferentes cepas se añadieron en el momento de preparar las placas.

1.1.6 Medio de regeneración-TOP (MMR-TOP)

La composición del medio para un litro es:

- 20 ml de solución de sales.
- 342 g sacarosa (1M).
- 0,4 % (p/v) agar Oxoid

Se completó con agua destilada hasta un litro, se ajustó el pH a 6,8 y se procedió como se indica en la sección anterior (apartado 1.1.4).

1.2 Soluciones y suplementos para medios de *Aspergillus*

➤ Solución concentrada 20x de sales [74].

Para la preparación de un litro de solución:

- Cloruro de potasio (KCl) 26 g
- Sulfato de magnesio 7H₂O (MgSO₄· 7H₂O) 26 g
- Fosfato dihidrógeno de potasio (KH₂PO₄) 76 g
- Solución de elementos traza sin fosfatos 10X 50 ml

➤ Solución concentrada 10x de casaminoácidos

Hidrolizado de caseína 150 g/l. Esterilizado en autoclave a 110 °C durante 20 minutos.

➤ Solución concentrada 10x de elementos traza sin fosfatos

Para la preparación de 1 litro de solución de elementos traza:

- Tetraborato de sodio (Na₂B₄O₇·10H₂O)..... 40 mg
- Cloruro de cobre (CuCl₂·2H₂O) 400 mg
- Cloruro férrico (FeCl₃) 800 mg
- Cloruro de zinc (ZnCl₂) 8 g
- Cloruro de magnesio (MnCl₂·4H₂O)..... 800 mg

➤ Solución concentrada 100x de vitaminas

Para la preparación de 1 litro de solución mezcla de vitaminas:

- Tiamina..... 50 mg
- Biotina..... 10 mg
- Ácido nicotínico..... 100 mg
- Pantotenato de calcio..... 200 mg

- Piridoxina-HCl..... 50 mg
- Riboflavina..... 100 mg
- Ácido p-aminobenzoico (PABA)..... 100 mg
- Inositol..... 24 g

Se esterilizó mediante filtración y fue guardado a 4 °C protegido de la luz.

➤ **Suplementos**

Todos los suplementos se prepararon en soluciones acuosas concentradas 100x respecto a la concentración final en el medio de cultivo, salvo que se señale lo contrario. Se indica la concentración final de cada suplemento:

- Biotina: 0,04 μ M. Esterilizado por filtración.
- Ácido p-aminobenzoico (PABA): 14 μ M. Esterilizado en autoclave a 110 °C durante 20 minutos.
- D-Pantotenato de calcio: 24 μ M. Esterilizado en autoclave a 110 °C durante 20 minutos.
- Piridoxina-HCl (vitamina B6): 2,5 μ M. Esterilizado por filtración.
- Inositol: 0,65 mM. Esterilizado por filtración.
- Pantolactona-D: 60 μ M. Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.
- Riboflavina: 6 μ M. Esterilizado por filtración.

Uracilo y uridina: 5 mM cada uno, pesados antes de se añadidos al medio de cultivo.

1.3. Ensayos de estrés osmótico

Los ensayos de respuesta a estrés salino se realizaron añadiendo al medio mínimo de cultivo, directamente o en solución, las diferentes sales de cloro. A continuación se detalla la lista con las concentraciones finales (cf) utilizadas para cada compuesto:

- Cloruro de calcio CaCl_2 (Stock 5 M) cf= 10 mM ó 50 mM
- Cloruro de magnesio MgCl_2 (Stock 4 M)..... cf= 0,2 M
- Cloruro de potasio KCl (Stock 4M)..... cf= 0,6 M
- Cloruro de sodio NaCl cf= 1 M
- Cloruro de litio LiCl (Stock 5 M)..... cf= 0,3 M
- Fosfato dibásico de sodio Na_2HPO_4 (Stock 2 M)..... cf= 100 mM

- Fosfato monobásico de sodio NaH_2PO_4 (Stock 5 M)..... cf= 100 mM

En todos los casos, salvo que se indique lo contrario, los fenotipos fueron estudiados tras 48 h de incubación a 37 °C.

2. Condiciones y medios de cultivo para *Escherichia coli*

Se utilizó el medio de cultivo Luria Bertani (LB) para el crecimiento de *E. coli*, el cual contiene: Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. El pH se ajustó a 7,5 con hidróxido sódico y en el caso del medio sólido se añadió 1,5% (p/v) de agar. El medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 110 °C.

Para la propagación de plásmidos y la selección de cepas transformantes se utilizó el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C.

3. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados

3.1 Cepas de *Aspergillus nidulans*

Los genotipos de las cepas utilizadas en esta tesis doctoral se describen en la Tabla M1. Los diferentes *loci* y marcadores genéticos se describen en [76].

Todas las cepas portan el alelo mutante *veA1* cuyo fenotipo es promover el desarrollo de las estructuras de reproducción asexual (conidióforos) en ausencia de luz. En este trabajo se ha identificado el gen donde reside la mutación *pabaB22*. El gen *pabaB* corresponde al *locus* AN10991 que codifica para una enzima con actividad 4-amino-4-deoxicorismato liasa. La mutación causa el cambio N247H en esta proteína.

Tabla M1. Listado de cepas de *A. nidulans* utilizadas en esta tesis doctoral.

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD1123	<i>pyrg89, pabaA1; MoR-24 (halA24); sltA1</i>	H. Arst Jr
MAD1427	<i>pyrG89, pabaB22; Δnku::argB (argB2); riboB2</i>	B. Oakley (TNO2A25)
MAD2736	<i>pabaA1, yA2; ΔtrkB::pyrG^{Af}</i>	A.Markina
MAD2743	<i>yA2; pyroA4; pantoB100</i>	J.F. Abenza
MAD2733	<i>pabaB22; Δnku::argB (argB2)</i>	A.Markina

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD2461	<i>sltB2, yA2; pabaB22</i>	H. Arst Jr
MAD3020	<i>pyrG89, pabaA1; ΔnkuA::argB (argB2); crzA::gfp::pyrG^{Af}; riboB2</i>	A.Markina
MAD3232	<i>inoB2, pyroA4; ΔtrkA::pabaA^{Af}; niiA4</i>	H. Arst Jr
MAD3237	<i>pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔtrkC::pyrG^{Af}</i>	L. Cobeño
MAD3624	<i>pyrG89, ΔsltB::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3625	<i>pyrG89, sltB::gfp::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3626	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3650	<i>pyrG89, sltB::gfp::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2)</i>	En este trabajo
MAD3651	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA::pyrG^{Af}</i>	En este trabajo
MAD3652	<i>pyrG89, pabaA1; ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3669	<i>pyrG89, ΔsltB::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3682	<i>ΔsltB::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3693	<i>pyrG89, ΔsltB::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3694	<i>pyrG89, sltB^{psk}::_{3x}ha::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3705	<i>pyrG89, sltB::gfp::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA::riboB^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3709	<i>pyrG89, pabaA1; ΔnkuA::argB (argB2); ΔcrzA::riboB^{Af}, riboB2</i>	P. Hernández
MAD3710	<i>pyrG89, sltB^{APsk}::_{3x}myc::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3711	<i>pyrG89, sltB^{APsk}::gfp::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3734	<i>pyrG89, sltB::_{3x}myc::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD3750	<i>pyrG89, sltB^{APsk}::gfp::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3751	<i>pyrG89, sltB::gfp::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3766	<i>pyrG89, sltB53, biA1; ΔnkuA::BAR(?); pantoB100</i>	H. Arst Jr
MAD3768	<i>sltB56, biA1; pyroA4</i>	H. Arst Jr
MAD3769	<i>sltB56, biA1; ΔnkuA::BAR(?); pantoB100</i>	H. Arst Jr
MAD3770	<i>sltB53, pabaA1, yA2, pyroA4</i>	H. Arst Jr
MAD3786	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); crzA::gfp::pyrG^{Af}; ΔsltA::riboB^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3814	<i>pyrG89, ΔsltB::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD3815	<i>pyrG89, sltB^{psk}::gfp::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3816	<i>pyroA4, ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA:: pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3915	<i>pabaB22, ΔnkuA::argB(?), ΔcnaA::pyroA^{Af}; sltA::HA::pyrG^{Af},</i>	En este trabajo
MAD3919	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA::riboB^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD3934	<i>sltB56; ΔnkuA::BAR(?), ΔnkuA::argB^(?); sltA::HA::pyrG^{Af}, riboB2</i>	En este trabajo
MAD4013	<i>pyrG89, sltB53::gfp::pyrG^{Af}, biA1; ΔnkuA::BAR(?); pantoB100</i>	En este trabajo
MAD4015	<i>alcA^P::sltB::_{3x}myc; ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA:: pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4016	<i>(alcA^P::sltB::_{3x}myc)_n; ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA:: pyrG^{Af}, riboB2</i>	En este trabajo
MAD4025	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA^{met200}::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4026	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA^{arg331}::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4048	<i>pabaA1, pyrG89; sltA1</i>	H. Arst Jr
MAD4081	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA^{arg331}::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4247	<i>pyrG89, sltB::gfp::pyrG^{Af}, pabaA1; sltA1</i>	En este trabajo
MAD4249	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); gfp::sltA::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4282	<i>pyrG89, ΔsltB::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); gfp::sltA::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4294	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); thiA^P::sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4296	<i>pyrG89, pabaA1, yA2, biA1; argB2; ΔsltA::pyrG^{Af}, pacC^C14900</i>	En este trabajo
MAD4362	<i>pyrG89, sltB56::gfp:: riboB^{Af}; pabaB2, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD4487	<i>pyrG89, sltB53, biA1; ΔnkuA::BAR(?); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; pantoB100</i>	En este trabajo
MAD4510	<i>pyrG89, sltB^{prot}::_{3x}myc::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2/ pyrG89, sltB53::gfp::pyrG^{Af}, biA1; ΔnkuA::BAR(?), pantoB100</i>	En este trabajo
MAD4511	<i>pyrG89, sltB^{prot}::_{3x}myc::pyrG^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2/ pyrG89, sltB53::gfp::pyrG^{Af}, biA1; ΔnkuA::BAR(?), pantoB100</i>	En este trabajo
MAD4519	<i>yA2; pyroA4; pantoB100/ pyrG89, sltB53::gfp::pyrG^{Af}, biA1; ΔnkuA::BAR(?); pantoB100</i>	En este trabajo
MAD4520	<i>yA2; pyroA4; pantoB100/ pyrG89, sltB53::gfp::pyrG^{Af}, biA1; ΔnkuA::BAR(?); pantoB100</i>	En este trabajo
MAD4581	<i>pyrG89, sltB^{psk(1-590)}}::gfp::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}HA:: pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4583	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); thiA^P::sltA::gfp::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD4645	<i>pyrG89; inoB2, pyroA4, ΔnkuA::BAR; sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; ΔpalB::pyroA</i>	En este trabajo
MAD4661	<i>pyrG89; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); thiA^P::sltA^{Met400}::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4663	<i>pyrG89; ΔAN7985::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4731	<i>pyrG89, sltB^{H1033A}::gfp::riboB^{Af}; pabaB22; argB2, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4733	<i>pyrG89, sltB::gfp::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); thiA^P::sltA^{Met400}::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4760	<i>pyrG89, sltB^{S1033A}::gfp::riboB^{Af}; pabaB22, argB2, ΔnkuA::argB (argB2); sltA::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4819	<i>pyrG89, ΔsltB::riboB^{Af}; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); thiA^P::sltA^{Met400}::_{3x}ha::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MAD4899	<i>pyrG89, gfp::sltB::_{3x}myc; pabaB22, ΔnkuA::argB (argB2); riboB2</i>	En este trabajo
MAD4965	<i>pyroA⁺, ΔnkuA::argB (argB2); ΔsltA::pyrG^{Af}; riboB2</i>	En este trabajo
MM(12pl 1_8)	<i>inoB2, ΔnkuA::argB (argB2)?, crzA::gfp::pyrG^{Af}; ΔsltA::riboB^{Af}, riboB2?</i>	María Manoli

3.2 Plásmidos

3.2.1 Plásmidos utilizados en la construcción de los casetes para generar alelos nulos y proteínas etiquetadas

Los plásmidos presentados a continuación se utilizaron como moldes para la generación, mediante técnicas de PCR, de los fragmentos necesarios para la construcción de los casetes para generar los alelos nulos (marcador de selección *riboB* o *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*) y para generar las proteínas etiquetadas (GFP, _{3x}HA y _{3x}Myc, en estos casos los fragmentos codificantes para estos epítomos estaban fusionados al marcador de selección *riboB* o *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*). La amplificación de los fragmentos se realizó utilizando los oligonucleótidos específicos para cada caso y que se indican en la Tabla M2.

p1439: este plásmido se utilizó para obtener el fragmento correspondiente al marcador de selección *pyrG^{Af}*, para así construir cepas nulas o cepas portadoras de proteínas etiquetadas con GFP en el extremo carboxilo terminal. Este vector porta un fragmento de DNA que codifica para un conector _{5x}glicina-alanina (_{5x}GA), seguido del codificante de GFP en fase y a continuación el locus *pyrG* de *A. fumigatus*, *pyrG^{Af}*. Este plásmido fue proporcionado al laboratorio por el Prof. S. Osmani (OhioUniversity USA).

p1503: este plásmido se utilizó para etiquetar proteínas en el extremo carboxilo terminal con el epítomo _{3x}HA, que a su vez se encuentra fusionado al gen *pyrG^{Af}* como

marcador de selección. Está basado en el plásmido 1439, conteniendo las mismas regiones conectoras flanqueantes que éste, y fue construido por el Dr. E. Espeso (CIB-CSIC, Madrid).

p1830: este plásmido se utilizó para obtener el fragmento de DNA correspondiente al gen que codifica para la proteína GFP fusionado al marcador de selección *riboB* de *Aspergillus fumigatus*, *riboB^{Af}*. El objetivo es la construcción de cepas nulas generadas mediante la integración génica de este marcador de selección o de cepas que expresen proteínas etiquetadas en su extremo carboxilo terminal con GFP. Se basa en el plásmido p1439 y fue cedido por el Prof. S. Osmani (Ohio University. USA).

p1874: este plásmido se utilizó para hacer el etiquetado de las proteínas en su extremo carboxilo terminal con el epítipo _{3x}Myc, que a su vez se encuentra fusionado al marcador de selección *pyrG^{Af}*. Se basa en el plásmido p1439 y fue obtenido por la Dra. A. Hervás (CIB-CSIC, Madrid).

3.2.2 Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en *E.coli* y en *A. nidulans*

pGEM-T Easy: plásmido comercial de Promega. Permite el clonaje, mediante selección por ausencia de producción de β -galactosidasa en la cepa DH5 α de *E. coli*, y propagación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR.

pGEM-T Easy-SltB 2032-3884: este plásmido se generó introduciendo en pGEM-T Easy el fragmento obtenido por PCR de la región génica de *sltB* comprendida entre los nucleótidos 2032 – 3884.

pGEM-T Easy-SltB-H1033A y pGEM-T Easy-SltB-S1142A: plásmidos obtenidos mediante mutagénesis dirigida (ver apartado 5.2 de Materiales y Métodos) utilizando el vector pGEM-T Easy-SltB 2032-3884 para generar cambios en los tripletes que codifican para la histidina 1033 y la serina 1142 a tripletes codificantes de alanina en ambos casos. En el proceso de mutagénesis se utilizaron los oligonucleótidos 60 al 63 (Tabla M2). La región codificante de cada plásmido mutante resultante fue secuenciada para verificar que los únicos cambios en ésta eran los introducidos en cada triplete de nucleótidos. Los plásmidos mutantes se utilizaron como moldes para obtener el fragmento necesario para generar el casete de transformación, el cual, una vez integrado en el genoma del hongo, permitió obtener las dos versiones de proteínas SltB mutantes, SltB-H1033A y SltB-S1142A, respectivamente y en ambos casos etiquetadas con GFP. Este fragmento codificante de SltB se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 8 y 49 en ambos casos.

palcA^P-SltB-Myc: este plásmido se construyó insertando entre las dianas BamHI y XmaI del plásmido palcA^P-pyroA (p1712) un fragmento de DNA que codifica a SltB fusionado a 3xMyc. Este fragmento se obtuvo a partir del DNA genómico de la cepa MAD3734. Este vector contiene el promotor del gen que codifica la alcohol deshidrogenasa I, *alcA*, el cuál es inducible por alcohol y un fragmento del gen *pyroA* de *A. nidulans* que es utilizado como marcador de selección y para direccionar la integración del plásmido en el locus mutante *pyroA4* [77].

3.3 Oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, sintetizados por Sigma Aldrich, se detallan en la Tabla M2. Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el paquete informático VectorsNTI-8. Los números (Nº) hacen referencia al orden en la colección de oligonucleótidos generada en este trabajo. Los casos en los que no se indica, corresponden a oligonucleótidos de otra procedencia.

Tabla M2. Listado de oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral

Nº	Nombre	Secuencia (5´-3´)	Objetivo
1	sltB nulo PP1	GGGAGTATAATAAGGCTGTTGCGGCTT	Amplificación promotor de <i>sltB</i>
2	sltB nulo PP2	CTTGCGCACCACGGAGACGACTCG	
3	sltB nulo SMP1	CGAGTCGTCTCCGGTGTGCGCAAGACCGGTGCG CCTCAAACAATGCTCT	Amplificación del MS para reemplazamientos de <i>sltB</i>
4	sltB nulo GFP2	GCACAGTGGACGGGGTAAGGTGAGTCTGAGA GGAGGCACTGATGC	
5	sltB nulo GSP3	TCACCTTACCCCGTCCACTGTGC	Amplificación terminador de <i>sltB</i>
6	sltB nulo GSP4	CGAAAGAAGCTCTACATTGTCCACGAGGAT	
7	sltB gfp GSP1	GCCTTCATGAATGAAGAACATCTCCCTC	Amplificación de ORF <i>sltB</i> para etiquetados en el extremo C-terminal
8	sltB gfp GSP2	AGCAAGCTGTCTTCCAGACTGCGACC	
9	sltB gfp GFP1	GGTCGCAGTCTGGAAAGACAGCTTGCTGGAG CTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Amplificación de epítomos para fusionar a regiones de <i>sltB</i> en el extremo C-terminal
10	sltA nulo PP1	CTGTCTGGCGACCCTGAGAG	Amplificación promotor de <i>sltA</i>
11	sltA nulo PP2	GATGGACGGTCCCTAATGTCCG	
12	sltA nulo SMP1	CGGACATTAGGGACCGTCCATCACCGGTCGCC TCAAACAATGC	Amplificación del MS para reemplazamientos de <i>sltA</i>
13	sltA secu met	CTTCCGTTGGATTTGGTCACG	Secuenciación <i>sltA</i>
14	SltB met	CCAAGATGTCCGTACTIONCCCGCACCATGG	Amplificación de ORF <i>sltB</i> para generar formas truncadas
15	sltB delec COOH GSP2	GTCATCAAATGGCTGGGTGCGAAAGG	

Nº	Nombre	Secuencia (5'-3')	Objetivo
16	sltB delec COOH GFP1	CCTTTCGACCCAGCCATTTGATGACGGAGCTG GTGCAGGCGCTGGAGC	Amplificación de epítomos para generar formas truncadas etiquetadas de <i>sltB</i>
17	sltB delec NH met compl	CGTCTCCGGTGTGCGCAAGATGAAGATCGGG CTTGAAGAAAAAAGGCTGAGG	Amplificación de ORF <i>sltB</i> para generar formas truncadas
18	sltB delec NH met	TTCTCAAGCCCGATCTTCATCTTGCGACACC GGAGACG	
19	sltA met200	CGGACATTAGGGACCGTCCATCATGGATGCCC AAAGCAC	Amplificación de ORF <i>sltA</i> para generar formas truncadas
20	sltA arg331	CGGACATTAGGGACCGTCCATCATGCACGAG GCTGACG	
21	SltBmyc BamHI sense	GCGGATCCATGTCCGTACTCCC	Generación del plásmido alcA-sltB-Myc
25	SltBmyc Xmal antisense correct	CCCCCGGGTCAATTAAGATCCTCCTCGG	
26	secu sltA promoter	TTGGTCACGATCAGTGAG	Secuenciación <i>sltA</i>
27	Secu sltB promoter	TCAACGACAGCGCTCGC	Secuenciación <i>sltB</i>
28	sltA gfp SMP1	CGGACATTAGGGACCGTCCATCATGGCTGGT GCAGGCGCTGG	Etiquetado N-terminal SltA
29	sltA gfp SMP2	CAGAGTCTTGTGCTGGACTCATTTGTATAGTT CATCCATGC	
30	sltA met	ATGAGTCCAGCACAAAGACTCTG	Amplificación de ORF <i>sltA</i> para generar formas fusionadas al promotor de <i>thiA</i>
31	sltA stop	GCATTGTTTGAGGCGACCGGTTTAGAGACCAC CAGGGCCGGGGT	
32	sltA SMP1b	ACCGGTCGCCTCAAACAATGC	Amplificación del MS para generar formas de <i>sltA</i> fusionadas al promotor de <i>thiA</i>
33	thiA-SltAprom	CGGACATTAGGGACCGTCCATCACCTGGCACC TACAGAAGAATCC	Amplificación de las regiones promotoras de <i>sltA</i> y <i>thiA</i> , y su posterior fusión
34	thiA-SltAgen	CAGAGTCTTGTGCTGGACTCATATGGACTCAG TTCAATGGTTCCG	
35	thiA-sltAgen comp	CGAACCATTGAACTGAGTCCATATGAGTCCAG CACAAGACTCTG	
36	secu <i>pyrG</i> ^{Af} general	ATTGCTGTTGCCAGGTGAGG	Secuenciación gen <i>pyrG</i> ^{Af} / <i>riboB</i> ^{Af}
37	sltA gsp1	GCATCGTAGTGTAGCTGTGC	Amplificación del promotor de <i>sltA</i>
38	sltA gsp5	GCTCAGAGAGTCCATTGTCATGC	Amplificación de ORF <i>sltA</i> para etiquetados en el extremo C-terminal
39	sltA gsp6	GAGACCACCAGGGCCGG	

Nº	Nombre	Secuencia (5'-3')	Objetivo
40	sltA gsp6'	CCGGCCCTGGTGGTCTCGGAGCTGGTGCAGG CGCTGGAGC	Amplificación de epítomos para fusionar a regiones de <i>sltA</i> en el extremo C-terminal
41	sltA gsp3'	CCACCAAATGTGACGAGACTGTCTGAGAGGA GGCACTGATGCG	
42	sltA gsp3	TCTCGTCACATTTGGTGG	Amplificación del terminador de <i>sltA</i>
43	sltA gsp4	GCTACGGATGCTGACTCC	
44	sltB 477 gsp2	AGGACGACGGAGGTTTTTCAGTCAC	Generación SltB56::GFP
45	sltB 477 gfp1	GTGACTGAAAACCTCCGTCGTCCTGGAGCTGG TGCAGGCGCTGGAGC	Generación SltB56::GFP
46	sltAmet400	CGAACCATTGAACTGAGTCCATATGGCCCGTC GCAAGAAGAATGC	Amplificación de ORF <i>sltA</i> para generar la forma truncada SltA ^{Met400}
47	sltA gsp7	AGGGCTCCGCAACTTAGACTCG	Secuenciación <i>sltA</i>
	sltB-R2	TGAGAAAGGGTCGTCGTGGGG	
	sltB-R1	CATGTGATGTACTGTCATACCG	
	sltB-F1	AGTCCTGGCGGTGATCTGGGC	
48	sltB secu 1	GCTTATGACCTCCTTATGGC	
49	sltB secu 2	TCGCAACCAGTGGCTGTGGC	Secuenciación y amplificación de diferentes regiones de la ORF de <i>sltB</i>
50	sltB secu 3	CGGTTTGAGGAGCTTGGTGGC	
51	sltA secu 1	TTCCGAAGCGCCTGACTAC	
52	sltA secu 2	CAGTATTCTCGCTCGCTCCG	Secuenciación <i>sltA</i>
53	sltB 590 stop	CCTTTGACCCAGCCATTTGATGACTGAGGAG CTGGTGCAGGCGCTGGAGC	Amplificación ORF <i>sltB</i> para generar la forma SltB ^{Psk(1-590)}
60	sltB mut His1033	CACGACAGGGCATCAAGGCTGAAATCGACTG GGC	Mutación H1033A de SltB
61	sltB mut His31033 compl	AGTCGATTTAGCCTTGATGCCCTGTCGTGTC AGC	
62	sltB mut Ser1142	GAGTTCCCGGTGATGCTGGCGCTTGGGTCTTT G	Mutación S1142A de SltB
63	sltB mut Ser1142 compl	AAGACCCAAGCGCCAGCATCACCGGGAAC TCG	
64	AN7985 PP1	CGGTACAGGTTCTCGGTCGTTAAGA	Amplificación promotor de AN7985
65	AN7985 PP2	CTCGTATTCGCAAGCGTGAGATATGAG	
66	AN7985 SMP1	CTCATATCTCAGCTTGCGAATACGAGACCGG TCGCCTCAAACAATGCTCT	Amplificación de MS para el reemplazamiento de AN7985
67	AN7985 GFP2	AATCGCAGTACCTATGCTGGGAAGGTCTGTCT GAGAGGAGGCACTGATGCAT	
68	AN7985 GSP3	ACCTTCCCAGCATAGGTAAGTGCATT	Amplificación terminador de AN7985
69	AN7985 GSP4	CCTAGGTTTCCAGCTATACCTACCGT	
70	secu prom thiaA	CCTTTATCCAGCGTTGAAGGGGACTGC	Secuenciación promotor

Nº	Nombre	Secuencia (5'-3')	Objetivo
			de <i>thiA</i>
71	AN7985 cds	ATGGAACCTCTCGGCGTTGGACT	Amplificación CDS AN7985
72	AN7985 cds2	TCATACAGTACACTTTGCGAGTTCCGC	
73	sltA prom	CCGGCGCCTCGGGTGGGCCTTTA	Secuenciación <i>sltA</i>
75	sltB gfp SMP2	CCCCATGGTGCGGGAGTACGGACATTTTGTAT AGTTCATCCATGCCATGT	Etiquetado N-terminal SltB
76	sltB inicio	ATGTCCGTA CTCCCGCACCATGGGG	
77	sltB gfp SMP1*	CGAGTCGTCTCCGGTGTGCGCAAGATGGGAG CTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	

3.4. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo, como herramienta en la clonación de DNA o en la expresión de proteínas recombinantes, se detallan en la tabla M3.

Tabla M3. Listado de cepas de *E. coli* utilizadas en esta tesis doctoral.

Cepa	Genotipo	Fuente
DH1	<i>endA recA1 gyrA96 thi-1 glnV44 relA1 hsdR17 (rK⁺ mK⁺) λ⁻</i>	Meselson and Yuan, 1968
DH5α	<i>F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA⁻ argF)U169 hsdR17 (rK⁻ mK⁺) λ⁻</i>	Meselson and Yuan, 1968

4. Técnicas específicas utilizadas en *Aspergillus nidulans*

4.1 Obtención de cepas mediante transformación

La transformación de *A. nidulans* se realizó siguiendo el protocolo desarrollado en la referencia [78]. De forma general el protocolo se describe a continuación. Se inocularon 10⁶ conidiosporas en 200 ml de medio mínimo líquido de *Aspergillus*, conteniendo las fuentes de carbono y nitrógeno estándares y los suplementos necesarios para su correcto crecimiento. El medio se inoculó con conidiosporas y el micelio del hongo se recolectó por filtración tras 14-16 h de incubación a 30 °C en agitación. Se resuspendió 1 g del micelio húmedo en 15 ml del Tampón de protoplasto (1,2 M MgSO₄, 10 mM tampón fosfato, pH 5,8) y se digirió con 200 mg de Vinoflow® (Novozymes), enzima lítica de la pared celular, incubando la mezcla a 30 °C durante un periodo de 1 a 2 h con agitación suave. La formación de protoplastos se verificó mediante la observación en un microscopio con óptica de contraste de fase de una muestra de la mezcla de digestión. Una vez determinada la presencia de protoplastos de calidad suficiente en la preparación se procedió a su aislamiento y lavado. La suspensión de protoplastos se

dividió en partes iguales en dos tubos de 50 ml (10 ml/tubo) y a cada uno se le añadió igual volumen de la Solución colchón de flotación (0,6 M D-Sorbitol, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5), sin que las dos fases se mezclasen. Tras centrifugar la solución bifásica en la centrífuga Eppendorf 5810-R utilizando el rotor basculante A-4-44, enfriado a 4 °C durante 10 minutos a 4400 rpm, el concentrado de protoplastos generado en la interfase fue recogido con una pipeta Pasteur estéril y diluido añadiendo 2 volúmenes de Solución ST (1 M D-Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5).

La suspensión de protoplastos se centrifugó de nuevo a 2800 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y los protoplastos sedimentados fueron resuspendidos en 1ml de Solución ST. Los protoplastos fueron lavados tres veces con esta solución para limpiarlos de impurezas y finalmente se concentraron mediante centrifugación y resuspensión en Solución STC (200 µl/tubo transformación) (1M D-Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂).

Tras la obtención de la suspensión de protoplastos comenzó el proceso de transformación propiamente dicho. Para ello, se preparó una mezcla con 200 µl de la suspensión de protoplastos, 50 µl de solución STC, 1-3 µg del DNA de interés y 50 µl de Solución PEG (PEG 6000 60% (p/v), 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂). Tras incubar la suspensión en hielo durante 20 minutos se añadió 1 ml de Solución PEG y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente se añadieron 5 ml de Solución STC y 15 ml de medio de regeneración Top Agar fundido. La mezcla se repartió sobre la superficie de placas de Petri que contenían medio mínimo de regeneración con los requerimientos necesarios. Las colonias generadas a partir de los protoplastos transformados se observaron tras 3-4 días de incubación a 37 °C.

Una vez obtenidos los transformantes siempre se siguió el mismo proceso hasta la selección de la cepa objeto de estudio. Los transformantes fueron purificados a homocariosis mediante la siembra de conidiosporas, y su gDNA fue analizado por la técnica de *Southern-blot*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.4 de esta sección, comprobando la correcta integración del casete de transformación en el *locus* de interés utilizando la sonda radiactiva adecuada.

4.2 Obtención de cepas diploides

La generación de cepas diploides de *Aspergillus* se llevó a cabo mediante la fusión de los protoplastos extraídos de las dos cepas de interés. El protocolo llevado a cabo en la extracción fue el descrito en el apartado 4.1 de esta sección. Los protoplastos sedimentados

tras la segunda centrifugación fueron lavados tres veces en solución ST y finalmente concentrados en un determinado volumen de Solución STC para que la cantidad de protoplastos de cada cepa fuera similar. A continuación se procedió a mezclar las dos suspensiones de protoplastos y se añadió 50 μ l de Solución PEG. La mezcla se incubó 20 minutos en hielo, y tras este tiempo se añadió de nuevo 1 ml de Solución PEG y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadió 5 ml de Solución STC y 15 ml de medio de regeneración Top Agar fundido. La mezcla se vertió sobre medio mínimo de regeneración con los requerimientos necesarios para que únicamente crecieran colonias heterocariontes. Se prepararon varias placas de Petri con este medio para cada ensayo de formación de diploides. Las colonias generadas a partir de la fusión de los protoplastos de dos cepas de interés se observaron tras 3-4 días de incubación a 37 °C. Finalmente, se procedió a purificar los diploides hasta su estado homocariótico 2n, inoculando conidiosporas sobre MMA selectivo.

4.3 Obtención de cepas mediante cruce

Un número determinado de cepas utilizadas en este trabajo se obtuvieron entre la progenie de diferentes cruces de cepas. Para inducir el ciclo reproductivo sexual entre dos cepas de *Aspergillus* se inocularon conidiosporas de ambas cepas parentales, muy próximas entre sí, sobre MCA suplementado con los requerimientos necesarios para su crecimiento. Tras 2 días de incubación a 37 °C se recortaron pequeñas porciones de la zona de contacto entre las hifas de las cepas parentales y se traspasaron a MMA selectivo (con NaNO_3 10 mM como fuente de N), de manera que no se permita el crecimiento de las cepas parentales sino exclusivamente el de los heterocariontes originados por fusión de las hifas. A partir de la aparición de colonias heterocarióticas se sellaron las placas con el fin de someter al hongo a condiciones de anaerobiosis. De esta manera se induce la formación de cigotos y estos darán lugar a la formación de hifas ascogénicas dentro de las estructuras especializadas para ello (cleistotecios). Estos cuerpos fructíferos se formaron y maduraron tras 15 días de incubación a 37 °C. Varios cleistotecios fueron recogidos de la placa y depositados sobre MMA conteniendo agar al 3 % (p/v) para proceder a su limpieza de hifas y de células de Hülle mediante su arrastre por el medio.

Posteriormente cada cleistotecio se introdujo en un tubo de 1,5 ml con 100 μ l de agua estéril y se rompió mecánicamente contra las paredes del tubo para liberar las ascosporas. Se inocularon 5 μ l de esta solución sobre MMA selectivo y se cultivaron 2 días a 37 °C. El genotipo de los descendientes se analizó en placas de MMA selectivas para cada uno de los marcadores de las estirpes parentales.

5. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

5.1 Construcción de casetes de transformación para generar cepas mutantes de *A. nidulans*

Los diferentes fragmentos de DNA generados en este estudio fueron amplificados de DNA genómico o plasmídico utilizando técnicas estandarizadas de PCR del laboratorio. La fusión de estos fragmentos para generar formas etiquetadas o alelos nulos siguió el protocolo descrito en la referencia [79], las generalidades del proceso se describen a continuación. Para las diferentes construcciones se utilizó como marcadores de selección los genes *riboB* o *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*. El gen *pyrG* de *A. fumigatus* codifica para la Oritidina MP descarboxilasa y complementa la mutación de pérdida de función en su ortólogo en *A. nidulans*, *pyrG89*, que causa auxotrofia de pirimidinas. El gen *riboB* de *A. fumigatus* complementa la mutación *riboB2* en su homólogo de *A. nidulans* que causa el requerimiento de riboflavina.

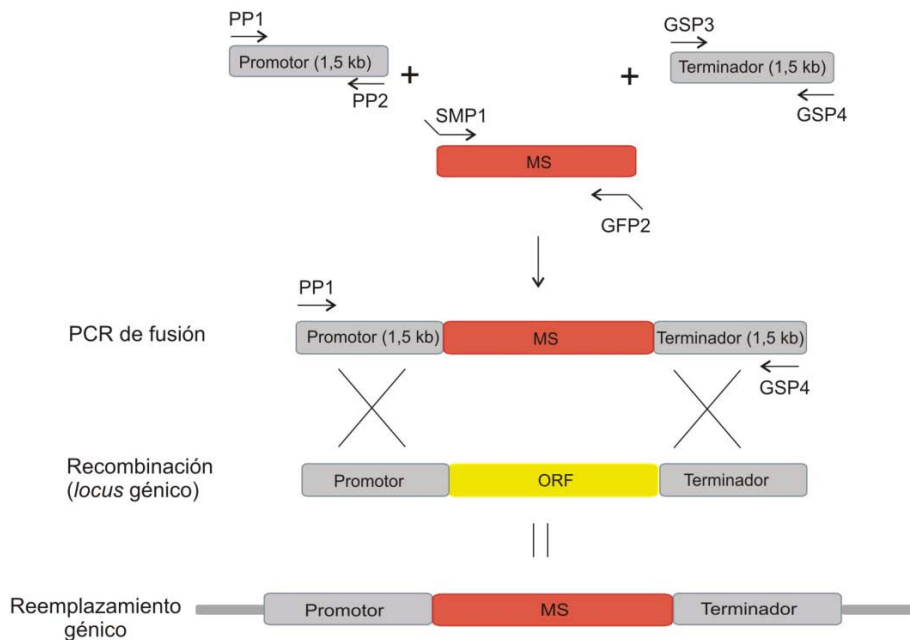
Para la construcción de los alelos nulos se sustituyó la región codificante del gen por uno de estos dos marcadores de selección. Se amplificaron independientemente por PCR el promotor (5'UTR) y el terminador (3'UTR) del gen correspondiente, ~ 1,5 kb, y el DNA del marcador de selección al que se le añaden secuencias solapantes con los anteriores fragmentos en cada extremo. La mezcla de los tres fragmentos se utilizó como DNA molde para su fusión mediante la acción de la DNA polimerasa Takara Prime Star, que es altamente procesiva y que utiliza como cebadores los dos oligonucleótidos de los extremos (Fig. M1). Las condiciones de PCR fueron las indicadas en el protocolo de Takara, con pequeñas variaciones en función de los oligonucleótidos utilizados y el tamaño del fragmento a amplificar.

Para la construcción del casete para generar proteínas etiquetadas se siguió el mismo procedimiento. El fragmento génico central, además del marcador de selección, porta el gen *gfp*, $3\times ha$ o $3\times myc$, al que se le añade en la amplificación por PCR una región solapante con la región más carboxilo terminal del gen a etiquetar sin el codón stop y la misma fase de lectura (Fig. M2, panel A).

En los casos en los que el etiquetado se realizó en el extremo amino terminal, el casete de DNA fue ligeramente diferente. En estos etiquetados, la región correspondiente al epítipo al que se desea fusionar la proteína de interés, y el marcador de selección que permitirá seleccionar los reemplazamientos correctos, se amplifican de forma independiente a partir del molde apropiado. El epítipo se fusiona entre la región de homología 5'UTR y el comienzo del gen (posición -1), y el marcador de selección entre el final del gen y la secuencia 3'UTR del gen (Fig. M2, panel B). La estrategia seguida para generar formas etiquetadas de *sltA* expresadas

desde el promotor de tiamina fue similar a la descrita, basándose en el reemplazamiento del *locus sltA* con un casete en el que se introduce la región promotora del gen *thiA* en la posición -1 del *locus sltA*. La región promotora *thiA* seleccionada corresponde a una región de ~1 kb, obtenida con los oligonucleótidos indicados en la tabla M2.

Generación de alelos nulos



Oligonucleótidos:

PP1: *promoter primer 1*

PP2: *promoter primer 2*

SMP1: *selectable marker 1* (complementario PP2 + específico marcador 5')

GFP2: *green fluorescence primer 2* (complementario GSP3 + específico marcador 3')

GSP3: *gene specific primer 3*

GSP4: *gene specific primer 4*

Fig. M1. Estrategia molecular para la generación de mutantes nulos. Se representa esquemáticamente el proceso y los fragmentos que han de generarse para obtener el casete de transformación y el mecanismo de reemplazamiento génico que da lugar a la construcción del alelo nulo del gen diana. En primer lugar se describen los tres fragmentos necesarios, los cuales se deben amplificar individualmente a partir de diferentes moldes mediante PCR (indicados en el texto). En gris se representan las regiones 5'UTR, el promotor, y 3'UTR, el terminador, del gen diana y los tamaños en kb aproximados para cada una. Para amplificar estos fragmentos se usan las parejas de oligonucleótidos PP1/PP2 y GSP3/GSP4 respectivamente (en la parte inferior de la figura se describe su abreviatura y que sirve para su búsqueda en la tabla de oligonucleótidos). En rojo se representa el marcador de selección (MS) que será el que reemplace la ORF del gen diana (amarillo). Este fragmento se obtiene mediante PCR y los oligonucleótidos SMP1/GFP2. Estos oligonucleótidos contienen una región complementaria a los fragmentos con los que posteriormente se fusionará (promotor y terminador). En un segundo paso, se genera el casete de fusión mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PP1/GSP4 y como molde una mezcla de los tres fragmentos. Un doble suceso de recombinação homóloga en el *locus* diana permite generar el alelo nulo

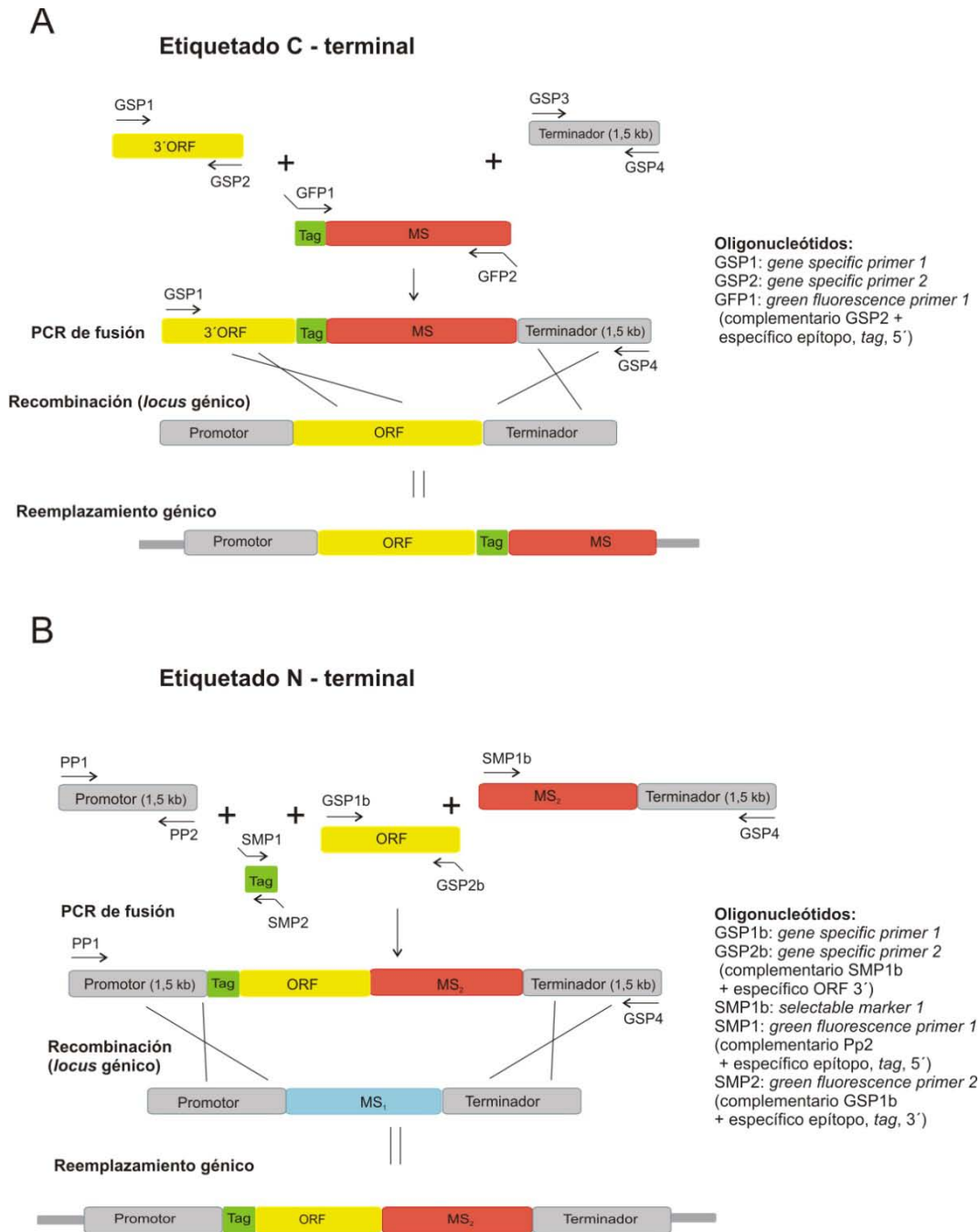


Fig. M2. Generación de alelos mutantes que codifican para formas etiquetadas de las proteínas diana. El proceso es similar al descrito en la Fig. M1. Se representan los cambios específicos para cada tipo de etiquetado. A) Etiquetado en C-terminal: En primer lugar se amplifican por separado el gen de interés (ORF, en amarillo) y su terminador (en gris) a partir de DNA genómico. Por otro lado, se amplifica el epitopo (Tag, en verde) junto con el marcador de selección (MS, en rojo) por PCR. El casete generado a partir de la fusión de los 3 fragmentos mediante PCR se utiliza para la transformación de una cepa silvestre en la que mediante un proceso de doble recombinación homóloga en el *locus* diana se obtiene el mutante etiquetado en el extremo carboxilo terminal. B) Etiquetado en N-terminal: En este caso se amplifican por separado el promotor (en gris), el epitopo (Tag, en verde), el gen de interés (ORF, en amarillo) y el marcador de selección (MS₁, en rojo) junto con el terminador del gen de diana (en gris). Todos ellos se fusionan y el casete resultante se utiliza en la transformación de una cepa nula para el gen de interés. Como en el caso anterior, un doble evento de recombinación homóloga permite la sustitución del marcador (MS₂, en azul) por el gen de interés etiquetado en el extremo N-terminal.

Indicar que el fragmento de DNA utilizado para la obtención de las fusiones traduccionales con los epítomos HA o Myc, contiene tres copias en tándem de cada uno de ellos ($_{3x}$ HA/ $_{3x}$ Myc). Para simplificar la lectura de las figuras, se hará referencia a ellos como HA o Myc sin indicar el número de copias.

5.2 Mutagénesis dirigida *in vitro*

Esta técnica se utilizó para generar cambios en los tripletes de nucleótidos de la secuencia de *sltB* que codifican para la histidina 1033 y para la serina 1142, de manera que fueran reemplazados por residuos de alanina en ambos casos.

En primer lugar se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos siguiendo las indicaciones descritas en el manual “QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit” (Stratagene). Estos deben contener en su secuencia la mutación de interés y anillar en la misma región, pero en la cadena opuesta, del plásmido. Además, su longitud debe abarcar entre 25 y 45 bases, de manera que la mutación se localice aproximadamente en la mitad y dejando al menos 10-15 bases de la secuencia original a cada lado.

En la reacción de la PCR mutagénica los oligonucleótidos deben mantenerse en exceso de concentración, utilizando 125 ng de cada uno de ellos. La enzima utilizada fue la DNA polimerasa *PfuTurbo* (2,5 U/ μ l) y los parámetros para la reacción de PCR fueron: 95 °C/30'' seguido de 15 ciclos de 95 °C/30'', 55 °C/1', 72 °C/10', y una extensión final de 72 °C/5'. El producto de la PCR se digirió con la enzima de restricción *DpnI* para destruir las cadenas de DNA metiladas y hemimetiladas, dejando así preferentemente el plásmido abierto recién generado portador de la mutación en ambas hebras del DNA. Este producto de digestión con *DpnI* se transformó en la cepa DH1 de *E. coli* y de entre las colonias transformantes se seleccionaron aquellas que contenían el plásmido modificado tras la verificación mediante secuenciación de la inserción de la mutación.

5.3 Aislamiento de DNA genómico de *A. nidulans*

Para proceder a la extracción de gDNA se recolectó 300 mg micelio mediante filtración del cultivo a través de Miracloth (muselina con un poro de 22-25 μ m Calbiochem 475855), fue congelado en nieve carbónica y posteriormente liofilizado durante 10h en un liofilizador Cryodos (Telstar). La masa de micelio se trituró utilizando un molino FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant a potencia 4 durante 20 segundos y utilizando una bola de cerámica de 0,55 cm procedente del kit FastDNA Kit de BIO101 (Q-Biogen). El micelio

pulverizado se resuspendió en 1 ml de tampón de solución de lisis: (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25 M sacarosa y 20 mM EDTA).

Una vez homogeneizada la suspensión se añadió 100 µl de SDS concentrado al 10% y se incubó durante 15 minutos a 65 °C. Al extracto fúngico se añadió 1 ml de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (49:49:2) agitándose dicha mezcla vigorosamente para así eliminar proteínas y otros compuestos orgánicos. Las fases acuosa y orgánica fueron separadas centrifugando cada muestra durante 5 minutos a 13.000 rpm. La fase acuosa fue recogida y sometida nuevamente al mismo proceso de limpieza.

El gDNA se precipitó añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M, pH 6,0 y 0,6 volúmenes de isopropanol. A continuación se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13.000 rpm para sedimentar el gDNA precipitado y se lavó con 1 ml de etanol al 80%. Tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante, se secó el sedimento y se resuspendió en 300-500 µl de agua milli-Q. Para eliminar la posible contaminación de RNA se digirió cada muestra con 5 mg/ml de RNAsa-A (Roche) incubando la reacción a 37 °C durante 60 minutos. El gDNA se precipitó nuevamente utilizando acetato sódico e isopropanol y se sedimentó mediante centrifugación como se indica anteriormente. El gDNA sedimentado se lavó nuevamente con 0,5 ml de una solución de etanol al 80%, como se indica anteriormente y una vez seco el sedimento el gDNA se resuspendió en 100-200 µl de agua milli-Q almacenándose a -20 °C hasta su utilización.

5.4 “Southern- blot”

Se utilizó esta técnica para comprobar la correcta inserción de las diferentes moléculas de DNA con las que se transformaron las cepas de *A. nidulans*. El protocolo seguido fue el descrito en [80]. Los DNA aislados fueron digeridos con una enzima de restricción que permitiría establecer un patrón diferencial de bandas para distinguir la alteración en el *locus* de interés. Tras separar los diferentes productos de la digestión del genoma en un gel de 0,8% de agarosa/TAE, se fragmentó el DNA mediante tratamiento con luz UV de 320 nm de longitud de onda durante 5 minutos. El DNA digerido se desnaturalizó sumergiendo el gel en solución desnaturalizante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) durante 45 minutos y posteriormente se neutralizó el pH del gel utilizando la solución neutralizante (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 3 M NaCl). Tras esta segunda incubación se lavó el gel con solución 2xSSC (solución concentrada 20x SSC: 3 M NaCl y 300 mM citrato trisódico, pH 7,4) y se preparó la transferencia de los fragmentos de DNA a una membrana de nylon (Nytran SPC, Whatman) utilizando el protocolo estandarizado de transferencia por capilaridad [80]. El DNA fragmentado se fijó a la membrana exponiendo ésta

durante 5 minutos a luz UV de 302 nm, utilizando para ello un transiluminador (Biorad GelDoc System).

La membrana fue incubada en solución de hibridación de Church (para 200 ml: 2 g (p/p) BSA, 400 μ l de una solución 0,5 M EDTA pH 8,0, 70 ml de una solución concentrada de SDS al 20%, 60 ml de una solución 1 M Na_2HPO_4 , 40 ml de una solución 1 M NaH_2PO_4 y completando con agua Milli-Q hasta el volumen final, el pH de la solución ha de ser próximo a valor 7) [81] durante 2 horas, antes de proceder a la hibridación con una sonda específica de DNA marcada radiactivamente con $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dCTP}$ (Perkin Elmer). El marcaje se realizó utilizando el kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana se incubó con la sonda radioactiva 16 horas a 55 °C. Para lavar la sonda radioactiva no hibridada se realizaron diferentes lavados, en primer lugar dos lavados con 50 ml cada uno utilizando una solución 2x SSC/0,1% SDS a temperatura ambiente y posteriormente dos lavados con 50 ml de una solución 0,2x SSC/0,1% SDS. En la segunda tanda de lavados, tras cada uno de ellos, se monitorizó la radioactividad remanente en el filtro con un geiger.

Para detectar la(s) banda(s) de hibridación en el filtro se utilizó una película sensible a radiactividad X-OMAT (Kodak) y para incrementar la señal se utilizó una pantalla intensificadora (Dupont). Alternativamente, se utilizó una pantalla BAS-MS (Fujifilm) para detectar la señal emitida por la radiactividad utilizando un Phosphorimager Fujifilm FLA-3000. Las imágenes se procesaron y analizaron con el programa informático Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

5.5 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Para extraer DNA plasmídico la correspondiente colonia bacteriana fue inoculada en 10 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico necesario para la propagación del plásmido, normalmente ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El cultivo bacteriano se obtuvo incubando a 37 °C durante 15 horas y con una agitación de 250 rpm. La extracción del DNA plasmídico se realizó utilizando el High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche. La concentración y la calidad del DNA de plásmido extraído fue verificada mediante electroforesis de agarosa (0,8% p/v) en TAE 1x.

5.6 Extracción de RNA total de *A. nidulans*

La extracción de RNA total se realizó utilizando el protocolo de Fluka para su reactivo TriReagent. Las muestras de micelio de *A. nidulans* cultivadas según se describe en el apartado

1.2 fueron filtradas y congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente. Seguidamente, éstas fueron molidas en mortero de porcelana con ayuda del nitrógeno líquido, evitando en todo momento su descongelación.

El micelio triturado, aproximadamente 400 mg, se transfirió a tubos de 2 ml, añadiendo a cada tubo 1 ml de solución TriReagent (Fluka) y mezclando con un vortex hasta humedecer todo el micelio. Tras incubar los tubos 5 minutos a temperatura ambiente, invirtiéndolos periódicamente, se añadieron 0,2 ml de cloroformo/muestra y se dejaron reposar 3 minutos nuevamente a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000xg durante 15 minutos a 4 °C y se transfirió la fase acuosa (fase superior), a tubos nuevos de 2 ml. Se repitió todo el proceso una segunda vez, esta vez utilizando 0,75 ml de solución TriReagent. A esta segunda fase acuosa, se le añadió 0,5 ml de isopropanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, mezclando periódicamente por inversión. Las muestras se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 4 °C para recoger así selectivamente el RNA total precipitado. A continuación, se eliminó el sobrenadante por vacío y se añadió 1 ml de una solución de etanol/agua-DEPC al 75% (v/v). Agua-DEPC se obtiene mediante tratamiento con 1ml de dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) por litro de agua Milli-Q, Tras mezclar y disolver el RNA, se centrifugaron las muestras a 7500 g durante 5 minutos a 4 °C. Se volvió a eliminar el sobrenadante por vacío y se disolvieron las muestras en 20-200 µl de agua tratada con DEPC (libre de RNasa), cuantificando la cantidad de RNA total extraído en cada muestra mediante espectroscopía midiendo la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm.

5.7 “Northern-blot”

Esta técnica fue utilizada para los análisis de expresión génica, utilizando los RNA totales extraídos según el apartado 4.5 de esta misma sección. Se sometieron a separación electroforética un total de 10 µg de RNA total de cada muestra/condición utilizando un gel desnaturizante de agarosa/formaldehído.

Para preparar un gel desnaturizante de 100 ml se fundieron 1,2 g de agarosa en 72 ml de agua Milli-Q tratada con DEPC. Se añadió a continuación 10 ml de tampón MOPS 10x (0,4 M MOPS (Sigma), 0,1 M acetato sódico, 0,01 M EDTA), y finalmente cuando la temperatura de la solución había bajado a 42-48 °C se añadieron 18 ml de formaldehído en solución al 33%. El gel se dejó solidificar en su correspondiente bandeja de electroforesis en la campana extractora de humos. Las muestras, por su parte, se prepararon añadiendo 12,5 µl de

formamida, 4 μ l de formaldehido (solución al 33%), 2,5 μ l de solución MOPS 10x y el volumen adecuado de cada muestra de RNA en un total de 10 μ l con agua Milli-Q tratada con DEPC.

Tras incubar durante 15 minutos a 65 °C las muestras preparadas en su tampón de desnaturalizante, se añadió la solución de carga de muestras para electroforesis en agarosa (Ficoll 400 30 % (p/v), azul de bromofenol 0,2 % (p/v), xilencianol blue 0,2 % (p/v), EDTA pH 8), y se corrió en el gel a 30-40 V en solución MOPS 1x, durante 16 horas. La transferencia del RNA por capilaridad a membrana de Nylon se realizó de la misma manera que en el caso del "Southern- blot" (apartado 5.4 de Materiales y Métodos). Como paso previo a la transferencia por capilaridad, el gel fue lavado con agua para eliminar el formaldehido remanente y el exceso de bromuro de etidio con el que se visualiza la calidad y se controla la carga de cada muestra. La fijación del RNA a la membrana y la hibridación con la sonda radiactiva correspondiente también se desarrollaron de la misma manera que en el apartado anterior.

6. Aislamiento y manipulación de proteínas de *A. nidulans*

6.1 Extracción de proteína total

Los extractos proteicos totales de las distintas cepas de *A. nidulans* se obtuvieron siguiendo dos protocolos diferentes, dependiendo de su uso exclusivo para detección por *Western-blot* (método 1) o para su manipulación en posteriores experimentos como en ensayos de desfosforilación (método 2).

En ambos procedimientos se partió de micelio liofilizado y triturado en la Fast Prep Cell Disruptor a una velocidad de 4.0 durante 20 segundos.

Método 1

Se partió de micelio triturado proveniente de cultivos en medio líquido (MMA o MFA) y se separaron 6-7 mg de micelio que fueron resuspendidos en 1ml de tampón de lisis (0,2M NaOH y 0,2% β -mercaptoetanol en H₂O). A continuación se añadió TCA al 7,5% para precipitar las proteínas y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Seguidamente, se centrifugaron a 14000 rpm/ 4 °C/ 5 minutos 2 veces y se retiró el sobrenadante. Sobre el pellet se añadió 100 μ l de Tris Base 1M y se mezcló bien. Finalmente se añadieron 200 μ l de Tampón de Ruptura (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS (p/v), 5 % β -mercaptoetanol (v/v), 6 M urea, 0.05% azul de bromofenol (p/v)), se mezcló la suspensión en el vórtex y se hirvieron las muestras durante 2 minutos a 90°C, centrifugando a continuación. Se repitió el paso de hervido y centrifugación de las muestras antes de cargarlas en un gel de SDS-poliacrilamida.

Método 2

En este caso, se trabajó a partir de 80 mg de micelio seco pulverizado proveniente de cultivos en medio mínimo, el cual se resuspendió en 1 ml de tampón de extracción de proteínas A-50 (25 mM Hepes pH 7,5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 10 % glicerol, 0,5 mM DTT e inhibidores (Ultra). Seguidamente, esta suspensión se volvió a triturar utilizando bolas de vidrio (diámetro de 0,45 mm) en la Fast Prep Cell Disruptor, a una velocidad de 6.0 durante 15 segundos. Posteriormente se incubó durante 10 minutos a 4 °C mezclándose continuamente por inversión utilizando un mezclador con rueda giratoria. Este procedimiento se repitió dos veces. A continuación se procedió a centrifugar las muestras durante 30 minutos a 14000 rpm y 4 °C, recogiendo el sobrenadante correspondiente al extracto proteico y finalmente se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford [82].

Para analizar las muestras mediante *Western-blot*, se precipitó la cantidad de proteínas indicada en el texto para cada caso, utilizando TCA 10% (v/v) e incubando la mezcla en hielo durante 10 minutos. Las proteínas se sedimentaron centrifugando 5 minutos a 14000 rpm y 4 °C, y se lavaron con mezclas de Etanol/Eter 1:1 y 1:3, consecutivamente. Finalmente, cada sedimento de proteínas se secó por evaporación, eliminándose así el remanente de solución de lavado. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en una cantidad de tampón de ruptura determinada (20-40 µl) para obtener concentraciones aproximadamente iguales de cada muestra en cada experimento. Los extractos proteicos ya desnaturalizados se calentaron a 95 °C durante 5 minutos como paso previo a su carga y análisis por electroforesis de SDS-poliacrilamida.

6.2 Ensayo de inmunodetección de proteínas, “*Western-blot*”

La separación monodimensional de los extractos proteicos se realizó mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS, SDS-PAGE. Las muestras de proteínas fueron tratadas como se describe en el apartado anterior, y analizadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes del 10% SDS-poliacrilamida utilizando el sistema MiniProtean® 3 de BioRad [83].

Parte de los geles se tiñeron con la solución Biosafe Coomassie Staining (BioRad) para visualizar las bandas correspondientes a cada proteína o grupo de estas con la misma movilidad electroforética. Duplicados de los geles anteriores fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa en una transferencia semiseca usando el sistema TransBlot® Turbo™ Transfer System de BioRad. Las proteínas fueron detectadas según cada epítipo con los anticuerpos primarios detallados en la tabla M4. En todos los casos el anticuerpo secundario estaba

conjugado a la peroxidasa de rábano y su actividad se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Las imágenes de la detección fluorescente se obtuvieron mediante un Analizador de Imágenes de Quimioluminiscencia, 06-LAS3000Q (TDT) y se analizaron con el programa Multi Gauge V3.0 de Fujifilm.

Tabla M4. Listado de anticuerpos utilizados en esta tesis doctoral.

	Anticuerpo	Dilución	Fuente	Referencia
Primario	α - GFP	1:5000	Ratón	Roche
	α - Myc	1:10000	Ratón	Sigma
	α - HA	1:1000	Rata	3F10 Roche
	α - actina	1:20000	Ratón	ICN Biomedicals Inc.
	α - hexoquinasa	1:50000	Conejo	Chemicon Intern. Inc.
Secundario	α - mouse IgG	1:4000	Cabra	115-035-003 Jackson ImmunoResearch Laboratories INC
	α - rat Ig M+ G	1:4000	Cabra	3010-05, Southern Biotech
	α - rabbit IgG	1:3000	Asno	Sigma

Los niveles de proteína detectados con los anticuerpos, en los casos en que se indica en el texto, fueron calculados mediante el empleo del software Multi Gauge. Para ello se seleccionaron regiones iguales de la imagen que incluían cada banda proteica a cuantificar y se midió la intensidad de pixel (AU/mm^2) en cada caso. Posteriormente se relacionaron estos valores con la intensidad de pixel medida para la proteína actina.

6.3. Ensayo *in vitro* de desfosforilación

Partiendo de 100 μ g de proteína de extractos totales obtenidos mediante el Método 2 se añadieron 400 U de proteína fosfatasa del fago lambda (PP λ) (BioLabs. Ref. 1-800-632-7799) 10 μ l de tampón de digestión PP (10x) y 10 μ l de solución MnCl₂ (10x, 10 mM), ambas soluciones proporcionadas por el fabricante de la enzima. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 100 μ l con agua Milli-Q y la mezcla se incubó 20 minutos a 30°C. El análisis de cada extracto proteico se complementa con tres ensayos control adicionales: una reacción sin la enzima PP λ , una reacción sin PP y añadiendo ortovanadato sódico 10 mM (inhibidor específico de la fosfatasa), y una tercera reacción a la que se añadió tanto PP como su inhibidor. Las reacciones se detuvieron aumentando el volumen final de las mezclas hasta los 300 μ l con agua Milli-Q y añadiendo TCA 10% (v/v) para precipitar las proteínas. A partir de

este punto las muestras se prepararon como se indica anteriormente para su análisis por SDS-PAGE.

7. Fraccionamiento subcelular

Este protocolo seguido para este estudio se basa en el protocolo desarrollado para *S. cerevisiae* adaptado para su uso en *A. nidulans*, como se describe en [84]. Dado que en el caso de *A. nidulans* se parte de una muestra de protoplastos de la cepa de interés, el proceso de extracción y lavado de protoplastos es común con el protocolo descrito para la obtención de cepas de *A. nidulans* mediante transformación (apartado 4.1).

A una suspensión que contenía 10^8 protoplastos/ml se añadió 1 ml de tampón de lisis de protoplastos (200 mM Sorbitol, 50 mM Acetato sódico, 20 mM Hepes pH 7,2, y 2 mM EDTA) y se procedió a su lisado mecánico utilizando un homogenizador "Dounce" y aplicando 20 pasos enérgicos del émbolo. Del lisado obtenido se separaron 50 μ l que fueron mezclados con 80 μ l de tampón de carga de geles de SDS, denominándose a esta mezcla como extracto total (ET). El resto del lisado se centrifugó a 300xg durante 5 minutos a 4 °C utilizando una centrífuga de mesa refrigerada. El sedimento, correspondiente a las membranas y a los grandes agregados celulares, se resuspendió en 100 μ l de tampón de carga de geles de SDS y a esta fracción se le denominó P0.3k. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 13.000xg durante 15 minutos a 4 °C. Al sedimento obtenido se añadieron 400 μ l de tampón de lisis y se precipitaron las proteínas utilizando TCA (ver protocolo descrito en el apartado 6.1). A esta fracción se le denominó P13K y debe contener proteínas de membranas y de los distintos orgánulos.

El sobrenadante se centrifugó a 100.000xg durante 1 hora a 4 °C empleando una ultracentrífuga Beckman TL100 y un rotor de ángulo fijo modelo TLA-100.2. Las proteínas del sobrenadante obtenido se precipitaron de forma similar a lo indicado anteriormente utilizando TCA. La fracción se denominó SB100k y corresponde a las proteínas solubles citoplásmicas. El sedimento obtenido se resuspendió en 400 μ l de tampón de lisis y las proteínas se precipitaron nuevamente con TCA. En esta fracción, denominada P100K, se encuentran las proteínas correspondientes a vesículas de transporte y restos de membranas endosomales y del complejo de Golgi.

La presencia de las proteínas de interés en cada una de las diferentes fracciones se caracterizó mediante la técnica de *Western-blot* (ver apartado 6.2).

8. Análisis del contenido interno y del flujo de cationes alcalinos mediante espectroscopía de absorción atómica (AA)

La acumulación y la pérdida de cationes a lo largo del tiempo se determinaron mediante el análisis del contenido de cationes en la célula. Los tiempos de toma de muestras se ajustaron en función del tipo de ensayo y se aplicó la función Prueba Z de Excel en los experimentos cuyo número de repeticiones fue de al menos 4.

Las concentraciones de cada catión presentes en la muestra se midieron en un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian). En primer lugar se prepararon disoluciones de concentración conocida (disoluciones patrón) del catión a medir para obtener la recta de calibrado en cada experimento. El valor de la concentración de cada catión presente en la muestra se obtiene al interporlar la señal analítica en la recta patrón, y se expresó en nmoles del catión por miligramo de peso seco de células. Para ello, se aplicó la siguiente fórmula matemática:

$$\text{nmoles / mg} = \frac{C \times F \times V}{m}$$

Siendo V, volumen de extracción (ml); F, factor de conversión aplicado y cuyo valor es 1,3; C, concentración del catión medida con el espectrofotómetro (μM) y m, masa de micelio seco (mg). La metodología desarrollada en este apartado es una adaptación del protocolo descrito en la referencia [85].

8.1 Medida del contenido interno de K^+ y Li^+

Para la medición del contenido interno de cationes se inocularon 10^6 esporas en 20 ml de medio MMA* (descrito en el apartado 1.1.2), suplementado con KCl 10 mM (condiciones normales de potasio) en los experimentos de medida de litio. Los cultivos se incubaron en agitación constante a 180 rpm, 28 °C durante 14-20 h. Cuando se alcanzó la densidad de células en el cultivo adecuada, se filtró todo el volumen del cultivo (filtros Millipore AAWP, 0,8 μm de diámetro) y las células se lavaron dos veces con 10 ml de solución de lavado (MgCl_2 20 mM). A continuación se realizó un lavado adicional por arrastre y resuspensión de las células sobre otro filtro. Para determinar la masa de micelio seco presente en el cultivo, cada filtro se secó durante una hora aproximadamente a 50 °C.

Se extrajo el contenido celular del micelio mediante lisis ácida añadiendo 5 ml de una solución de HCl 0,6 M y $MgCl_2$ 10 mM e incubando la mezcla durante 24 h a 4 °C. Posteriormente se eliminaron los restos celulares mediante la filtración de la muestra.

Se obtuvieron muestras de cada condición de estudio en cultivos independientes por triplicado. Las concentraciones de Li^+ o K^+ presentes en cada una de ellas se midieron mediante espectroscopía de absorción atómica como se detalla más arriba, siendo el contenido de cada catión expresado en nanomoles por miligramo de peso seco de células.

8.2 Medida del flujo de salida de Li^+

Para determinar la salida de litio de las células de las cepas objeto de estudio, fueron crecidas en 50 ml de MMA* suplementado con KCl 10 mM, y con dos concentraciones diferentes de LiCl: 100 mM ó 250 mM, como se describe en el apartado 8.1. Una vez alcanzada la densidad adecuada de células en el cultivo, se filtró todo el volumen de cultivo y se transfirió la masa de micelio a MMA* sin litio, que había sido previamente atemperado a 37 °C. Todos los experimentos de transporte se llevaron a cabo en un baño con agitación a 37 °C. Las muestras se recogieron a diferentes tiempos mediante filtración, se lavaron con una solución de $MgCl_2$ 20 mM y se trataron como se explica en el apartado 8.1.

La concentración de Li^+ se midió mediante espectroscopía de absorción atómica y el contenido del catión se expresó en porcentaje de nanomoles por miligramo de peso seco de células.

9. Microscopía de fluorescencia

Para la observación de la localización de las quimeras fluorescentes se utilizó un microscopio vertical de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i. Se utilizó el objetivo de 60 aumentos Plan Apo 1.4N.A (Nikon), una lámpara de mercurio de 100 W y el filtro GFP-3035 (Semrock Brighline) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP.

Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital ORCA-ER-II (Hamamatsu Photonics) y el programa de obtención y tratamiento de imagen fue el Metamorph (Universal Image). También se utilizó el programa Image J, de libre acceso, para la visualización de las imágenes.

Para cada observación microscópica del hongo se inocularon 10 μ l de una suspensión de conidiosporas en solución acuosa de Tween 80 (diluido 10.000 veces) sobre cubre-objetos de vidrio redondo de 14 mm de diámetro sumergidos en 2 ml de MMA-P con glucosa 1% (p/v),

NaH₂PO₄ 25 mM, tartrato de amonio 5 mM y los suplementos para cada cepa. Los cubreobjetos se colocaron en placas de 12 pocillos y se incubaron a 25 °C durante 16-18 h.

10. Herramientas bioinformáticas

Las búsquedas y análisis de secuencias se realizaron mediante software de libre acceso instalado en el ordenador, en servidores o herramientas en red y utilizando las bases de datos de genomas tanto específicas como genéricas.

Para la búsqueda de secuencias tanto genómicas como proteicas se usaron las bases de datos específicas de *A. nidulans* en el Broad Institute AspGD:

<http://www.aspergillusgenome.org/> y la comparativa:

http://www.broadinstitute.org/annotation/fungi/aspergillus_nidulans_old/index.html.

El repositorio genérico en el NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Las secuencias de interés en estas bases de datos se buscaron utilizando el algoritmo Blastn o Blastp. En el caso de *A. nidulans* la búsqueda de información normalmente se realiza mediante palabras claves, nombre de locus ANxxxxx, o término GO.

Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa ClustalX [86] utilizando para ello documentos de texto con las secuencias en formato FASTA. El programa Genedoc se utilizó para pulir a mano los alineamientos y para la presentación de las secuencias. También se utilizó el programa Jalview para visualizar y tratar alineamientos múltiples de secuencia.

Para las búsquedas de secuencias de peptidasas en el genoma de *A. nidulans* así como los alineamientos correspondientes para los estudios indicados se utilizó la base de datos de peptidasas MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

Los patrones Hidden Markof Models, HMM, fueron generados a través de las herramientas y el soporte informático que provee el Instituto Pasteur mediante el portal Mobyly, <http://mobyly.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>.

Los árboles filogenéticos fueron construidos con el programa Mega 5 versión 5.2, con el método Neighbor-Joining, con 10000 réplicas en cada nodo.

El programa Vector NTI (Invitrogen) fue utilizado para la representación de las construcciones y la localización de las enzimas de restricción utilizadas.

Las imágenes del revelado de los *Western-blot* se obtuvieron mediante un Analizador de Imagenes de Quimioluminiscencia, 06-LAS3000Q (TDT) de FUJI y se procesaron con el programa Multi Gauge V3.0 de Fujifilm. La señal emitida por las sondas radioactivas en los

experimentos de *Southern-blot* y *Northern-blot* se detectó con una pantalla BAS-MS (Fujifilm) y posteriormente se analizaron mediante un lector Phosphorimager Fujifilm FLA-3000. Las imágenes obtenidas también se procesaron y analizaron con el programa informático Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

Resultados: Capítulo 1
Análisis funcional del gen *sltB*

1.1 Análisis funcional del gen *sltB*

Los estudios genéticos y de caracterización fenotípica previos realizados con el mutante *sltB2* señalaban al producto de este gen como un segundo elemento de la ruta Slt. Con el objetivo de establecer una relación directa entre los productos de los genes *sltA* y *sltB*, se procedió a generar cepas portadoras del alelo nulo de cada uno de estos genes así como de los dos en conjunto, y a realizar un estudio comparativo de sus fenotipos en condiciones de estrés catiónico y pH alcalino.

1.1.1. Generación del alelo nulo *sltB*

Con el objetivo de estudiar la función de la proteína SltB se generó una cepa nula para el gen *sltB*. Para la delección de este *locus* se construyó un casete de DNA siguiendo la técnica de PCR de fusión y la estrategia descrita en la Figura M1 (Materiales y Métodos, apartado 5.1). La secuencia codificante del gen diana se sustituiría por el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. El reemplazamiento génico se produce por un fenómeno de doble recombinación entre las regiones homólogas al gen diana que llevan los casetes de transformación. La cepa de *A. nidulans* MAD1427 se utilizó como receptora de esta construcción, cuyo genotipo se indica en Materiales y Métodos (Tabla M1) y que crece normalmente en medio mínimo.

Las cepas recombinantes fueron seleccionadas positivamente en medio mínimo de regeneración sin ser suplementado con uracilo y uridina, ya que el gen *pyrG* de *A. fumigatus* complementa la auxotrofia de pirimidinas causada por la mutación *pyrG89* en la cepa receptora.

Sobre las placas de regeneración crecieron numerosos transformantes y una selección de éstos fue purificada a homocariosis (Materiales y Métodos, apartado 4.1). Para determinar la correcta sustitución de la región codificante del gen *sltB*, el gDNA de varios de éstos homocariosis fue analizado mediante *Southern-blot* con sondas específicas. Dado que todos los transformantes verificados y portadores del alelo nulo *sltB* resultaron ser viables en homocariosis, se concluyó que el gen *sltB* no es esencial para el desarrollo del hongo en condiciones de cultivo estandarizadas. De entre las cepas recombinantes $\Delta\textit{sltB}::\textit{pyrG}^{Af}$ se seleccionó a MAD3624 para los siguientes experimentos.

1.1.2. Generación del mutante nulo *sltA* y el doble mutante nulo *sltB;sltA*

La delección del gen *sltA* y su caracterización fenotípica de sensibilidad/tolerancia a ciertas sales, habían sido estudiados previamente por nuestro grupo [1]. Con la intención de evitar posibles efectos inespecíficos debidos a la heterogeneidad genética de las cepas del

laboratorio, se utilizó nuevamente la estirpe MAD1427 para generar una cepa $\Delta sltA$. Se siguió la misma estrategia que para deletar el gen *sltB*, sustituyendo la región codificante del gen *sltA* por el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. La cepa resultante tras el proceso de transformación y posterior selección y verificación fue MAD3626.

Seguidamente, con el objetivo de determinar un posible efecto aditivo de la ausencia combinada de las proteínas SlmA y SlmB, se procedió a generar una cepa doble nula *sltB; sltA*. Debido a la incompatibilidad de los marcadores de selección utilizados para generar los casetes de delección de los mutantes sencillos, hubo que generar una cepa nula de *sltB* donde se sustituyó la región codificante del gen por el gen *riboB* de *Aspergillus fumigatus*, $\Delta sltB::riboB^{Af}$. Las cepas recombinantes fueron seleccionadas positivamente en medio mínimo de regeneración sin ser suplementado con riboflavina. El gen *riboB* de *A. fumigatus* complementa el requerimiento de riboflavina de la cepa receptora mutante *riboB2*. A esta nueva cepa nula *sltB* se le denominó MAD3669, y fue seguidamente utilizada como receptora del casete de DNA $\Delta sltA::pyrG^{Af}$ para así generar la cepa doblemente mutante $\Delta sltB::riboB^{Af}; \Delta sltA::pyrG^{Af}$ (MAD3814).

Como en el proceso de obtención de los nulos simples, un gran número de transformantes creció sobre el medio de regeneración. En estos transformantes se comprobó la correcta integración del casete nulo en el *locus* diana. Todos los transformantes estudiados fueron viables en homocariosis, por lo que se concluyó que la presencia de SlmA y de SlmB en la célula no es esencial para la viabilidad del hongo.

1.1.3. SlmA y SlmB, dos miembros de la ruta Slr

En el apartado 2.3 y 3 de la Introducción se describen los efectos de las mutaciones *sltA1* y *sltB2* como pérdidas de función para cada uno de los genes afectados. Dado que ahora se disponen de cepas que portan el alelo nulo de *sltA* o *sltB*, o ambos simultáneamente, se analizó el fenotipo que presentaban estas cepas en condiciones ambientales de estrés catiónico o de alcalinidad. Para ello, se comparó el crecimiento colonial de las cepas $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$ con el de una cepa silvestre (MAD2733), el mutante *sltA1* (MAD4048) y el mutante *sltB2* (MAD2461) sobre el medio de cultivo. El ensayo se realizó utilizando medio MMA sólido suplementado con las siguientes sales de forma individual: KCl 0,6 M, MgCl₂ 0,2 M, NaCl 1 M, LiCl 0,3 M y CaCl₂ 0,05 M. También se varió el pH del medio ajustándolo a un valor de 8 añadiendo al medio Na₂HPO₄ a la concentración final de 100 mM. Los fenotipos fueron estudiados tras 48 h de incubación a 37 °C (Fig. R1.1). El crecimiento radial de la cepa silvestre MAD2733 fue tomado como referencia para el resto de estirpes. Además, para evitar posibles

variaciones a la hora de determinar el efecto de la delección de cada uno de los dos genes que fueran atribuibles a la variabilidad del fondo genético de la cepa receptora, se generaron cepas protótrofas que portaban los alelos nulos para *sltA* o para *sltB* (MAD3651 y MAD3682, respectivamente).

Todas las cepas mutantes *slt* presentaron el mismo fenotipo de sensibilidad o resistencia a los diferentes compuestos ensayados. La mayor toxicidad se observó a altas concentraciones de LiCl y a pH alcalino, con la inhibición total del crecimiento colonial (Fig. R1.1). Para el resto de cationes, excepto para el calcio, todas las estirpes mutantes mostraron un crecimiento colonial reducido y compacto. Por lo tanto, la ausencia de las proteínas SltA y SltB impide que el hongo pueda crecer normalmente en condiciones de estrés salino y alcalinidad. El hecho de que las cepas $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$ fueran fenotípicamente indistinguibles entre sí evidenciaba que ambas proteínas debían formar parte de la misma ruta señalizadora y/o reguladora. Por otro lado, el hecho que el efecto de la combinación de los alelos mutantes $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$ no fuera aditivo, sustentaba un modelo en el que SltA y SltB están formando parte de una ruta lineal, es decir que la actividad de una proteína debe depender directamente de la otra.

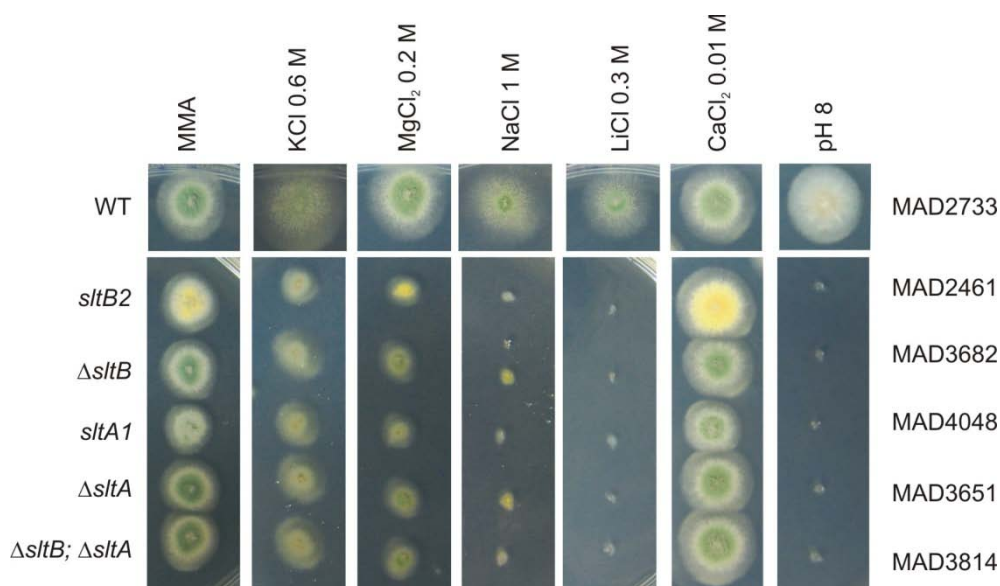


Fig. R1.1. SltA y SltB forman parte de la misma ruta de respuesta a estrés. Análisis del fenotipo de las cepas que portan los alelos nulos *sltA* y/o *sltB*. Las esporas de las cepas indicadas a la derecha de la imagen fueron inoculadas sobre MMA y MMA conteniendo KCl 0,6 M, MgCl₂ 0,2 M, NaCl 1M, LiCl 0,3 M, CaCl₂ 100 mM y Na₂HPO₄ 100 mM (pH alcalino, pH8). Las imágenes de las diferentes colonias, o puntos de inóculo en caso de no crecimiento, fueron tomadas tras su incubación a 37 °C durante 48 horas.

Además, el fenotipo del mutante *sltA1* fue idéntico al de la cepa Δ *sltA* (Fig. R1.1). Este resultado indica que la región más carboxilo terminal de la proteína SltA es necesaria para su correcto funcionamiento en la célula. Finalmente, indicar que el fenotipo que mostró la cepa mutante *sltB2* fue el mismo que el de la cepa nula *sltB*. Por lo tanto, concluimos que *sltB2* supone la pérdida de función del gen *sltB*. Las regiones adyacentes eliminadas en la deleción de 9 kb que da lugar al alelo *sltB2*, no deben contener información genética involucrada en la ruta Slt.

1.2. Análisis del contenido interno y de los flujos de cationes alcalinos

La sensibilidad a ciertos cationes alcalinos que producía la ausencia de función SltA o SltB en la célula podría estar causada por una mayor acumulación de estos cationes hasta alcanzar niveles tóxicos. Con el fin de comprobar esta posibilidad, se realizaron una serie de medidas de cationes mediante espectroscopía de absorción atómica en el laboratorio del Dr. Ramos (Universidad de Córdoba). Dada la imposibilidad de incluir un gran número de cationes en el estudio, y a la puesta a punto de la metodología para realizar las mediciones, decidimos centrarnos en dos cationes: K^+ , por su importancia en la célula, y Li^+ como análogo del sodio, catión más abundante en la naturaleza.

Se determinó el contenido intracelular de Li^+ y K^+ en las cepas Δ *sltA* (MAD3651) y Δ *sltB* (MAD3682). Puesto que se desconocen los transportadores de membrana de que median la entra y salida de sodio y su “equivalente” el litio en *A.nidulans*, se incluyeron en este estudio a la cepa silvestre MAD2733 y las cepas donde habían sido delecionados cada uno de los transportadores de potasio descritos en *A. nidulans*: Δ *trkA*, Δ *trkB* y Δ *trkC* (MAD3232, MAD2736 y MAD3237, respectivamente). Todos los experimentos fueron repetidos varias veces (la mayoría, al menos cuatro) y para las medidas del contenido interno de cationes se tomaron muestras por triplicado en cada uno de los ensayos realizados.

1.2.1. Requerimiento de K^+ en el crecimiento de las cepas Δ *sltA* y Δ *sltB*

Anteriormente se determinó la esencialidad de SltA y SltB para que el hongo pudiese crecer normalmente en un medio con alta concentración de potasio. Así mismo, y dada la esencialidad del catión potasio en la célula, se planteó el determinar cuál era el papel de ambas proteínas en una situación de baja disponibilidad de potasio en el medio. En primer lugar se determinó la concentración mínima de potasio que permitiese un crecimiento normal del hongo. Para ello, se suplementó el medio de cultivo MMA* sólido con distintas

concentraciones de KCl (0,1, 0,2, 0,5, 10 y 100 mM). Los fenotipos fueron estudiados tras 48 h de incubación a 37 °C.

Como se observa en la figura R1.2 (Panel A), los mutantes $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$ presentan un crecimiento reducido a baja concentración de KCl (hasta 0,5 mM) lo cual se interpretó como que los productos de los genes *sltA* y *sltB* se requieren para el crecimiento de *A. nidulans* en condiciones de muy bajas concentraciones de potasio (0,1 y 0,2 mM). Con una concentración de 10 mM de KCl en el medio de cultivo las cepas mutantes nulas *sltA* y *sltB* mostraron un crecimiento colonial similar al de la cepa silvestre, por lo que se consideró esta concentración como la mínima necesaria para que el hongo creciera en condiciones normales de cultivo.

La proteína TrkB ha sido definida como un transportador de potasio de baja afinidad [43]. Por ello, y como se observa en la figura R1.2 (Panel A), es necesaria para un crecimiento normal de la colonia en condiciones limitantes de potasio en el medio de cultivo (0 - 10 mM KCl). Respecto a los mutantes $\Delta trkA$ y $\Delta trkC$, el crecimiento colonial fue similar al de la cepa silvestre en todas las condiciones ensayadas.

1.2.2 Determinación del contenido interno de K^+ en las cepas mutantes $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$

Para medir los niveles intracelulares de K^+ en las cepas mutantes $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$, se suplementó el medio de cultivo líquido con KCl (0,1 y 0,2 mM), condiciones donde se estableció que ambas proteínas se requerían para el desarrollo normal del hongo. Como controles se incluyeron la cepa silvestre y la cepa $\Delta trkB$, y se midió la concentración de este catión según se describe en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos. Tras 16 h de incubación a 28 °C, se recogió por filtración todo el micelio del medio de cultivo. A continuación, se secó y pesó. La cantidad de masa de micelio de cada cepa mutante Δslt no diferió de la obtenida con la cepa silvestre. Por el contrario el peso del micelio de la cepa nula *trkB* fue sólo 1,3 veces menor que el de la cepa silvestre (Fig.R1.2, panel B). Cabe destacar que, en todos los casos, el crecimiento medido en medio líquido de cultivo contrastaba con el crecimiento colonial de estas mismas cepas observado en medio sólido, en el que tanto las cepas Δslt como $\Delta trkB$ mostraron dificultades de crecimiento (ver apartado anterior). Las medidas de las cantidades de potasio intracelular estaban de acuerdo con la medida de masa de micelio en condiciones limitantes de este catión. Mientras que la concentración intracelular de potasio en la cepa $\Delta trkB$ era 2,5 veces menor respecto a la cepa silvestre, los mutantes $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$ no mostraron grandes diferencias en los niveles de potasio acumulados (Figura R1.2, panel C). Por lo tanto, las proteínas SlmA y SlmB no se necesitan para regular la concentración interna de potasio en medio líquido. El fenotipo de sensibilidad que se observa de las cepas Δslt sobre

medio sólido podría no deberse a un efecto directo del catión.

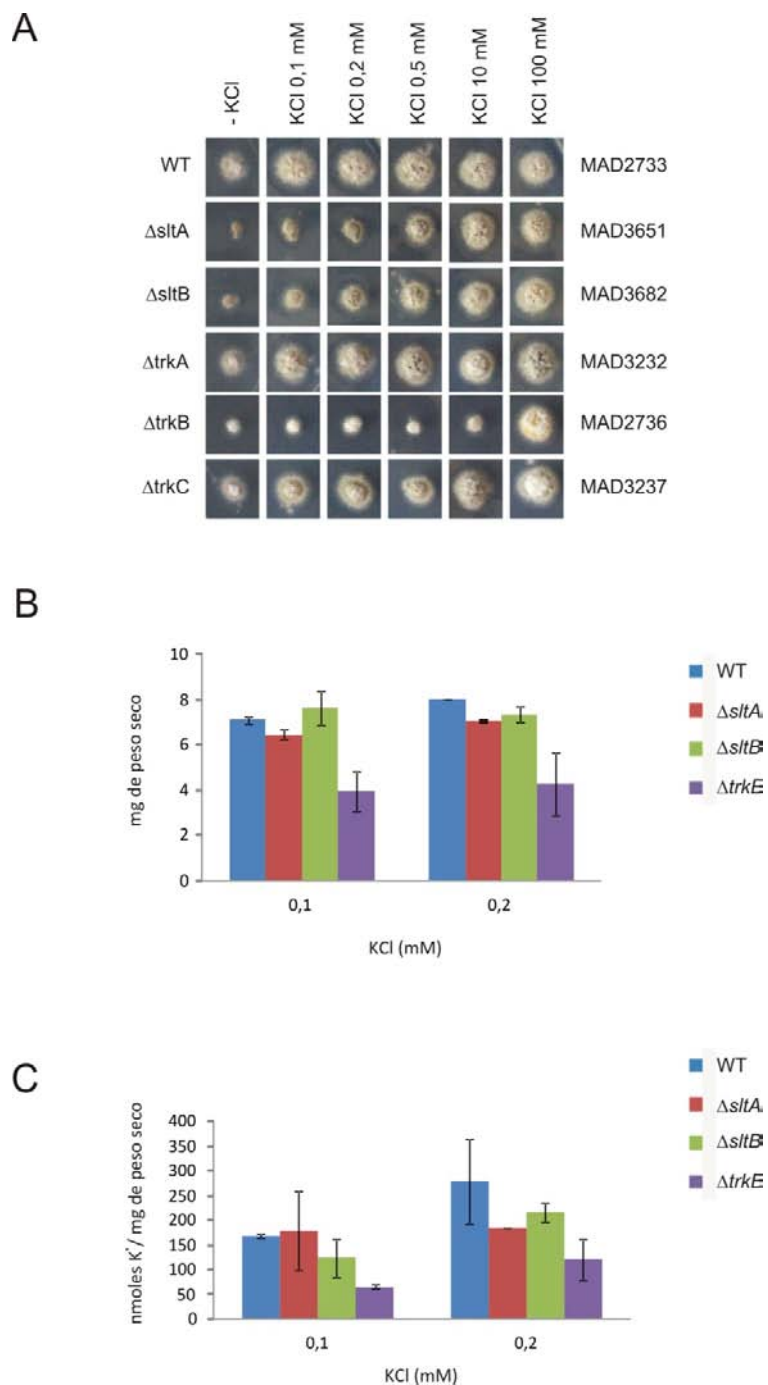


Fig. R1.2. Contenido interno de K⁺ en las cepas mutantes nulas *sltA* y *sltB*. A) Test de crecimiento realizado para las cepas MAD2733, MAD3651, MAD3682, MAD3232, MAD2736 y MAD3237. Se añadió al MMA* (medio mínimo sin catión potasio) diferentes concentraciones de KCl (0,1 – 100 mM), indicadas en la parte superior de cada imagen. B) Representación gráfica del peso de micelio seco (mg) de los cultivos de las cepas indicadas en MMA* conteniendo dos concentraciones de KCl: 0,1 y 0,2 mM. C) Gráficas que muestran el contenido intracelular de potasio (nmol/mg peso seco de micelio). La concentración de este catión en las muestras fue medido mediante espectroscopía de absorción atómica. Se midió en micelio de las 4 cepas (MAD2733, MAD3651, MAD3682 y MAD2736) tras su incubación en MMA* conteniendo KCl 0,1 y 0,2 mM. Las barras de error representan la desviación estándar, calculada a partir de, al menos, tres experimentos independientes.

1.2.3. Determinación del contenido interno y el flujo de salida del catión Li^+ en las cepas mutantes $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$

De la misma manera que nos planteamos medir los niveles intracelulares de potasio en estos fondos mutantes lo hicimos para el catión litio. Los experimentos descritos a continuación se realizaron con el fin de determinar si la sensibilidad al catión litio que mostraban las cepas $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$, podría estar causada por una mayor acumulación de este catión en el interior celular.

Para verificar esta hipótesis, se inocularon esporas de cada cepa en medio líquido suplementado con distintas concentraciones de LiCl (30, 60, 100, 150, 200, 250 y 300 mM). Tras 18 h de incubación a 28 °C se recolectó el micelio por filtración y se tomaron muestras para determinar su crecimiento y contenido intracelular. Las muestras se trataron como se describe en Materiales y Métodos. La masa de micelio correspondiente a cada una de las cepas fue muy similar, no encontrándose diferencias apreciables entre las cepas mutantes y la cepa silvestre en ninguna de las concentraciones ensayadas. No obstante, el resultado de este estudio indicó que todas las cepas mostraban los efectos tóxicos del litio. Todas las cepas, incluyendo la cepa silvestre, crecieron mejor cuanto más baja fue la concentración de LiCl que se añadió al medio de cultivo. A la concentración máxima ensayada, 300 mM LiCl, las esporas no germinaron. En el panel A de la figura R1.3 (izda.) se muestra la cuantificación de la masa de micelio recolectada de cultivos incubados con 100 y 250 mM de LiCl. Se aplicó la función prueba Z a los datos obtenidos del peso de micelio seco de cada uno de los mutantes nulos que crecieron en estas condiciones. Respecto al crecimiento del mutante $\Delta sltA$ en 100 mM de LiCl, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,28$) con el crecimiento de la cepa silvestre. Es más, para el mutante $\Delta sltB$ en estas condiciones se recolectó una masa de micelio mayor que en la cepa silvestre ($p = 0,0001$), lo que indicó nuevamente la ausencia de toxicidad al litio. El mismo análisis realizado en cultivos con 250 mM de LiCl indicó que la masa de micelio de ambos mutantes no difería significativamente de la cepa silvestre ($p = 0,33$ para la cepa $\Delta sltA$, y $p = 0,27$ para la cepa $\Delta sltB$). Este resultado contrastaba de nuevo con el fenotipo determinado en medio sólido, donde a la concentración de 50 mM de LiCl las cepas mutantes Δslt apenas muestran crecimiento colonial (Fig. R1.3, panel A, dcha.)

A pesar de no encontrarse diferencias en el crecimiento entre las cepas mutantes y la silvestre en medio líquido, se determinaron los niveles intracelulares de Li^+ en micelios cultivados en dos de las condiciones ensayadas (100 y 250 mM de LiCl) (Fig. R1.3, panel B). Los resultados de estos experimentos mostraron que la cepa mutante $\Delta sltB$ contenía una concentración intracelular de Li^+ similar a la de la cepa silvestre, en cualquiera de las dos

condiciones de cultivo establecidas ($p = 0,01$ en LiCl 100 mM, y $p = 0,27$ en LiCl 250 mM). La medida de cationes en micelio de la cepa mutante $\Delta sltA$ parecía indicar la existencia de una tendencia a la acumulación de litio en su interior celular. Sin embargo, el análisis estadístico realizado mostró que no existían diferencias significativas respecto a los valores medidos en la cepa silvestre ($p = 0,27$ en LiCl 100 mM, y $p = 0,04$ en LiCl 250 mM).

Puesto que el incremento en la concentración interna de un catión puede deberse tanto a una mayor velocidad de entrada como a un defecto en su salida, decidimos comenzar estudiando el flujo de salida del catión litio. Para ello, se inocularon esporas de las dos cepas mutantes y de la cepa silvestre en MMA* suplementado con 100 ó 250 mM de LiCl. El tiempo de incubación fue de 24 h para asegurar que se había alcanzado la situación de equilibrio en el transporte de este catión. Seguidamente, se recogió el micelio por filtración y se resuspendió en medio MMA* sin litio para, a continuación, tomar muestras del micelio y medir su concentración intracelular de Li y determinar así la dinámica de salida del catión. Las muestras se trataron como se describe en Materiales y Métodos, apartado 8.1. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R1.3, panel C. Las cepas mutantes expulsaron el litio intracelular prácticamente con la misma eficiencia que las células silvestres. No obstante, parece ser que la mayor expulsión de litio se producía durante los primeros diez minutos tras cambiar el micelio a medio de cultivo sin litio. Las cepas mutantes podrían presentar una mayor caída en los niveles intracelulares de litio en los primeros minutos que la cepa silvestre, lo que podría explicar el crecimiento similar a la cepa silvestre en medio líquido.

Los análisis del contenido interno y de los flujos de cationes alcalinos realizados no nos han permitido determinar evidencias sobre la relación entre SltA y SltB con los transportadores de membrana de dichos cationes. Por ello, decidimos enfocar los siguientes experimentos desarrollados en esta Tesis Doctoral hacia la señalización del factor transcripcional SltA.

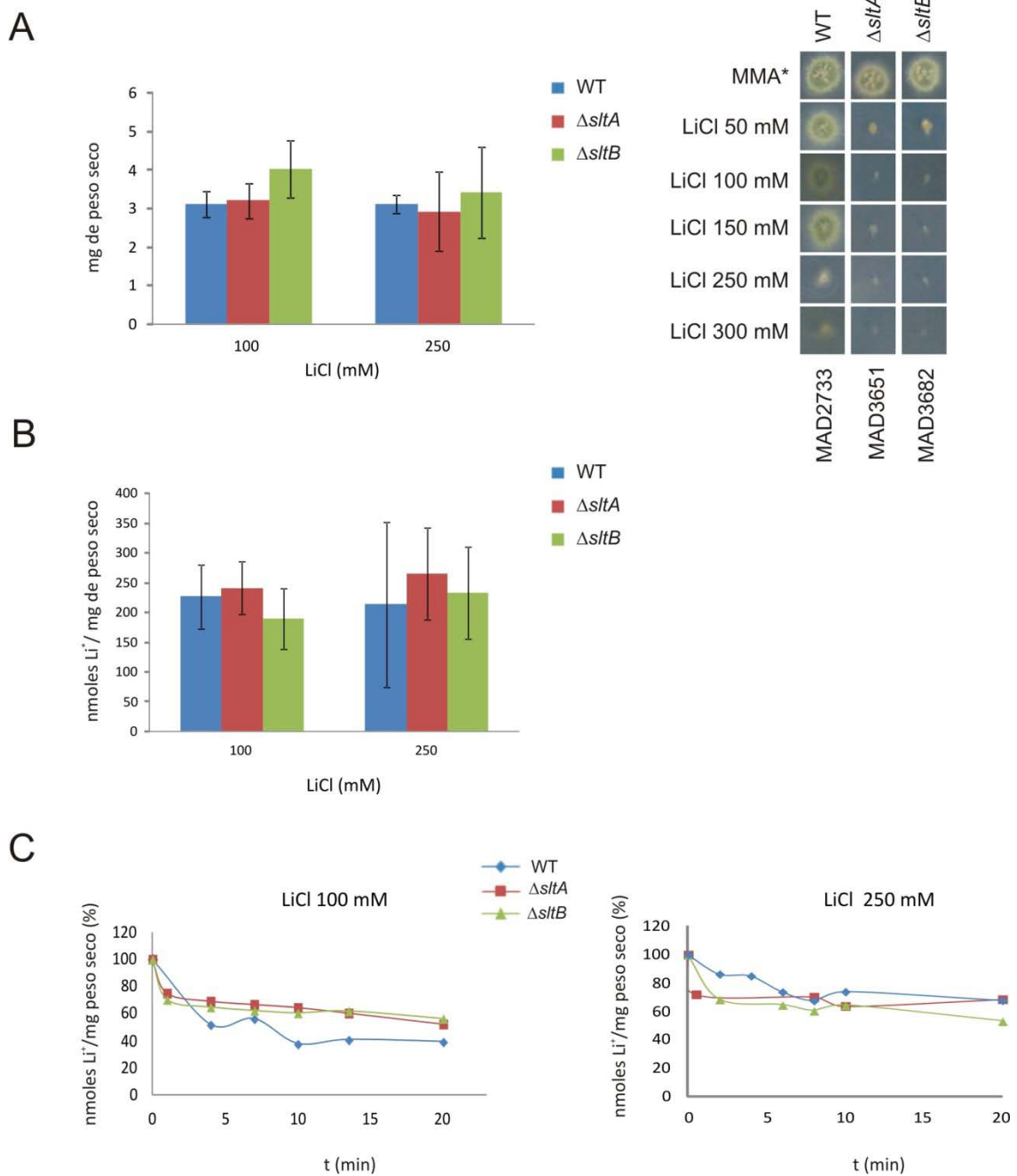


Fig. R1.3. Medida de la toxicidad al catión litio en cepas nulas *sltA* y *sltB*. A) Comparación del fenotipo mostrado por las cepas MAD3651 y MAD3682 en MMA* líquido (izda.) y sólido (dcha.) suplementado con diferentes concentraciones de LiCl. B) Medida, por espectrometría de absorción atómica, de la cantidad de litio intracelular (nmoles/mg peso seco de células) medido en las cepas indicadas en dos condiciones de estudio, LiCl 100 y 250 mM. Los resultados se obtuvieron mediante espectroscopia de absorción atómica y se expresan en nmoles del catión por mg de peso seco de micelio. Las barras de error representan la desviación estándar, calculada a partir de, al menos, tres experimentos independientes. C) Flujo de salida de Li⁺ en las cepas $\Delta sltA$ y $\Delta sltB$. Tras medir el contenido de Li⁺, se representaron los datos obtenidos como porcentajes, tomando el valor del 100 % como la cantidad de litio que contenían las células que habían crecido en el medio de cultivo con LiCl tras las 24 h de incubación. La cinética hallada fue muy similar tanto en las cepas mutantes como en la cepa silvestre.

Resultados: Capítulo 2

La proteína SltB

Se realizaron diferentes análisis bioinformáticos con el objetivo de identificar dominios conservados en SltB que permitiesen definir las posibles funciones, o dominios funcionales, así como a la posible familia de proteínas a la que pertenecería SltB.

En primer lugar se analizó la anotación automática del locus AN6132. La anotación automática inicial generó una estructura para la región codificante de este gen. Los datos aportados por el experimento de *RNA sequence* integrado en la base de datos AspGD modificó dicha estructura. En esta tesis se considera la primera anotación aunque se tienen en consideración los datos del RNAseq. Para el *locus* AN6132 hay registrados un número muy alto de lecturas del transcrito. La región codificante comprende 3887 pb que están organizados en dos exones separados por un intrón. El marco abierto de lectura (ORF) está limitado por la región 5'UTR entre las posiciones -103 y -1, y la región 3'UTR entre la 3888 y 4037 (Fig. R2.1). El primer exón consta de 3412 pb y el segundo de 407 pb, y el intrón tiene un tamaño estándar de 68 pb. La diferencia entre esta organización y la descrita actualmente en la base de datos es el tamaño del intrón que está basado en ciertas lecturas de fragmentos de cDNA que muestran un sitio alternativo de "*splicing*" del mismo. Nuestros datos confirman que la estructura génica que presentamos aquí da lugar a la forma funcional de la proteína. La traducción de la región codificante comprendida entre las coordenadas 1 y 3887 genera una proteína de 1272 aminoácidos, y para la que se ha estimado un peso molecular teórico de 142 kDa.

Estructura del gen *sltB*

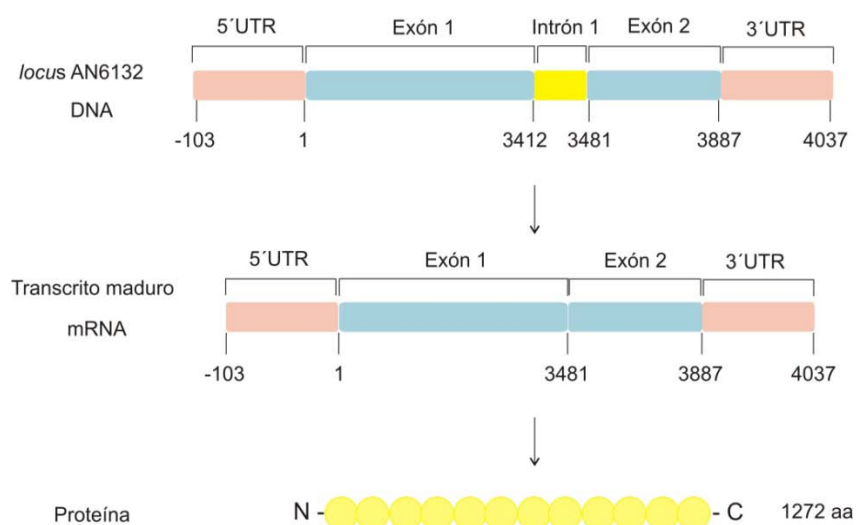


Fig. R2.1. Estructura del locus AN6132. El gen *sltB* (AN6132) consta, al menos, de 4140 nucleótidos, organizado en dos exones y un intrón. Los exones codifican para una proteína de 1272 aminoácidos.

2.1. Posibles dominios funcionales en SlbB

Utilizando la secuencia de aminoácidos definida anteriormente se realizaron búsquedas BlastP en las bases de datos de genomas/proteínas de hongos depositadas en el NCBI. Dichas búsquedas generaron una colección de más de 60 secuencias procedentes de genomas de hongos. No se encontraron secuencias con elevada similitud en otros organismos. Seguidamente se obtuvieron las secuencias en formato FASTA de estas proteínas identificadas y se realizaron alineamientos múltiples con la secuencia peptídica de SlbB y las de sus posibles ortólogos. Estos alineamientos nos permitieron encontrar las regiones más conservadas entre ellas. En la figura R2.2, panel A, se muestra un alineamiento doble entre SlbB y el consenso obtenido tras el alineamiento múltiple de 69 secuencias, incluida SlbB de *A. nidulans*, que fue generado utilizando los programas informáticos ClustalW y JalView v2.8.0b1. En el panel B de la figura R2.2, se pueden apreciar los bloques de residuos conservados, pero lo más interesante del análisis general es la posibilidad de dividir la proteína en dos grandes bloques, el más N-terminal de aproximadamente 660 residuos y el resto de la proteína, unidos ambos por una región que aparece pobremente conservada entre los posibles ortólogos SlbB. Por otro lado las secuencias encontradas en la búsqueda BlastP revelaron dos tipos de proteínas, unas con la misma longitud y estructura anterior, con un tamaño medio de 1300 aminoácidos, y otro grupo que mostraba conservación de secuencia con la región N-terminal, y con un tamaño medio de 500 aminoácidos (señaladas con flechas negras en Figura R2.2, panel B). Entre estas secuencias destacar a AN7985 que se estudia en el capítulo 5 apartado C, como posible miembro de la ruta Slb.

En las búsquedas realizadas al comienzo de esta tesis doctoral, utilizando la aplicación de búsqueda de la base de datos InterProScan mostraba una predicción de dos dominios funcionales en la proteína SlbB. Los primeros 590 aminoácidos de la región amino terminal mostraron un alto grado de similitud con proteínas quinasas. La región más carboxilo terminal (a partir del residuo 970, aproximadamente) aparecía identificada como una proteasa de la familia tripsina, del tipo serina o cisteína (Fig. R2.3, panel A). Búsquedas actualizadas siguen prediciendo el primer dominio pero no el segundo. Sin embargo, el análisis del hipotético dominio proteasa en la base de datos MEROPs, especializada en peptidasas, proporcionó nuevamente una predicción de un dominio proteasa que se asemejaría al de la familia de peptidasas S64, del clan PA, subclan PA(S). La predicción se obtuvo con un porcentaje de identidad del 31,37 % y un e-value de $9.10e-02$, con una peptidasa de la especie *Trichophyton tonsurans*, no caracterizada.

B

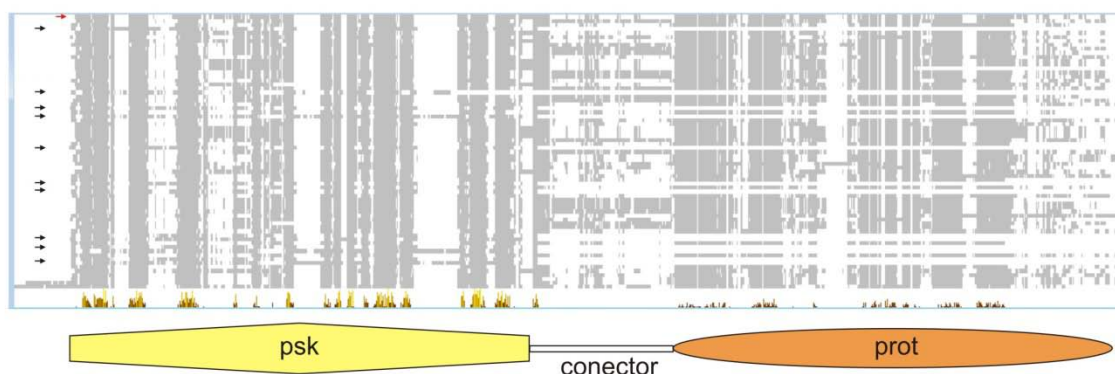
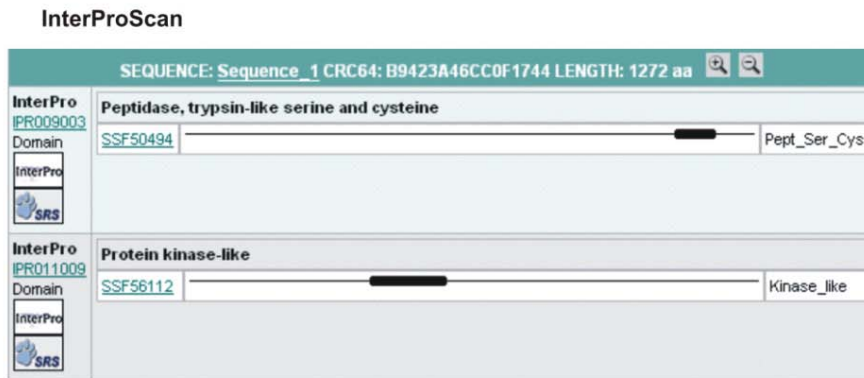


Fig. R2.2. Estructura del locus AN6132. A) Alineamiento de la secuencia SlTB con el consenso generado tras el alineamiento múltiple de 69 posibles ortólogos de SlTB. En fondo negro se visualizan los residuos idénticos. Se enmarcan las regiones N y C-terminales para indicar su alto grado de conservación. A la derecha se esquematizan las regiones en las que hipotetizamos se divide la proteína SlTB. Se indican en la secuencia los residuos P477, D590, M692 y F1126 que delimitan regiones cuya función ha sido analizada en este trabajo. B) Representación gráfica del alineamiento múltiple utilizado para generar el consenso del panel A. Las flechas negras indican las proteínas o grupos de estas, que carecen del dominio proteasa. La flecha roja indica la representación gráfica de la proteína SlTB de *A. nidulans*. Debajo del alineamiento gráfico se muestran las tres regiones consideradas, el dominio pseudoquinasa (Psk), el dominio proteasa (Prot) y el conector entre ambas.

Las proteínas definidas como peptidasas del tipo serina se caracterizan por contener en su secuencia la triada catalítica His-Asp-Ser [87]. Con el objetivo de identificar estos residuos catalíticos se examinaron las regiones conservadas correspondientes al dominio proteasa de SlTB y se identificaron estos aminoácidos en su secuencia. Concretamente, se propusieron los residuos de histidina 1008/1033, el de aspártico 1036 y el de serina 1142 como posibles candidatos a formar parte de esta triada, dado su alto grado de conservación en la secuencia del resto de ortólogos y a su distribución. Algunos de estos residuos fueron objeto de estudio posteriormente (Fig. R2.3, panel B). A continuación se realizó un análisis más exhaustivo del hipotético dominio quinasa de SlTB. Estos trabajos se dirigieron a definir las características estructurales conservadas que son responsables de la actividad catalítica. El dominio quinasa o, dominio catalítico, comprende entre 250 y 300 aminoácidos, los cuales se pueden agrupar en doce subdominios [3]. Dentro de estos subdominios, entre los que se encuentran residuos invariables entre las diferentes quinasas identificadas, se definen además tres dominios catalíticos esenciales: VAIK, HRD y DFG [59]. Se realizó una búsqueda más precisa de estos dominios catalíticos esenciales en la secuencia peptídica de SlTB, también en los posibles ortólogos, no logrando su identificación. El conjunto de los resultados nos llevó a definir a este dominio de SlTB como una hipotética pseudoquinasa.

A



B

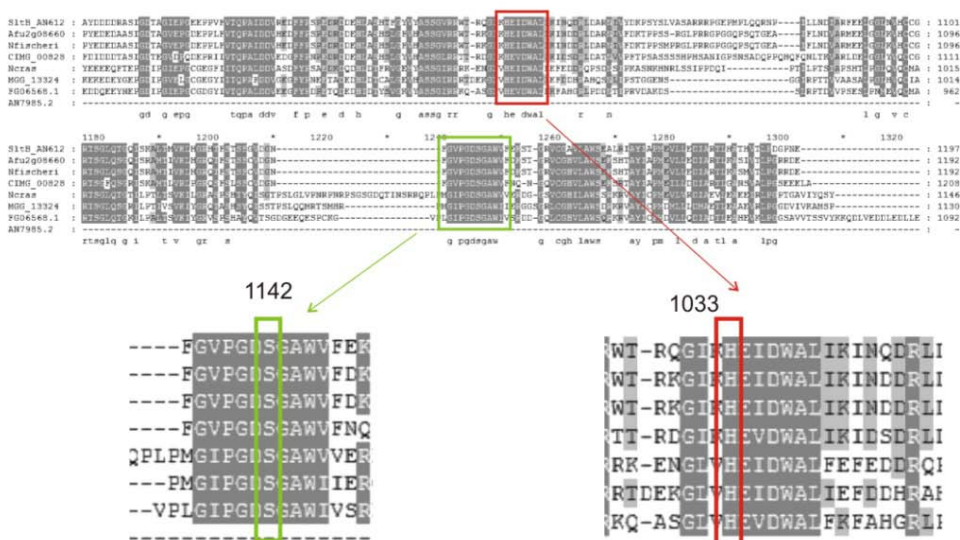


Fig. R2.3. Predicción de regiones funcionales en SltB. A) Captura de imagen de las búsquedas iniciales de dominios funcionales utilizando las herramientas de análisis de InterProScan (ver texto). B) Bloques de residuos conservados en un alineamiento múltiple con ortólogos de SltB procedentes de diferentes hongos filamentosos. El rectángulo rojo muestra el bloque de aminoácidos conservado que incluye a la Histidina 1033, la ampliación muestra este residuo resaltado. El rectángulo verde señala a los aminoácidos conservados entre los que se incluye la Serina 1142.

2.2 Distribución filogenética de los posibles homólogos de SltB

Dado que las búsquedas de los posibles ortólogos señalaban preferentemente a proteínas fúngicas, nuestro siguiente objetivo fue determinar la distribución filogenética de SltB. Este trabajo se hizo con la colaboración del Dr. Cortese, Universidad del País Vasco, quien estudió los productos de los genes ortólogos de SltA y SltB en diferentes especies fúngicas. En especial con SltB se elaboraron modelos probabilísticos de las secuencias (Modelos Ocultos de Markov, *HMM*) para ampliar el rango de búsqueda de proteínas similares, utilizando la aplicación en línea Mobyly 1.5 del Instituto Pasteur.

Estas búsquedas con los HMM generados para las regiones de SltB comprendidas entre los residuos 13-174, 325-589 y 1136-1194, definieron 30 nuevas secuencias de diferentes genomas fúngicos. Las dos primeras regiones extrajeron de las bases de datos secuencias similares a SltB y a las proteínas que sólo contienen la región N-terminal que se ha definido como Psk. El HMM definido con la región 1136-1194 solo proporcionó proteínas similares a SltB. Por lo tanto, no existen proteasas con secuencias similares a la región C-terminal de SltB.

Con los alineamientos múltiples generados con los posibles homólogos de SltB, es decir sólo aquellos que contienen los dominios Psk+Prot, se elaboró un análisis de filogenia utilizando el programa MEGA5.2 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (Fig. R2.4). Los resultados mostraron que estos posibles homólogos de SltB están restringidos a especies del subfilo *Pezizomycotina*, destacando el elevado número de especies incluidas en las clases *Eurotiomycetos* y *Sordariomycetos*. Esta distribución es similar a la que muestra el factor transcripcional SltA, sugiriendo que el sistema Slt puede ser exclusivo de estos hongos filamentosos.

Distribución filogenética de los homólogos de SlbB

Distribución filogenética de los homólogos de SlbA

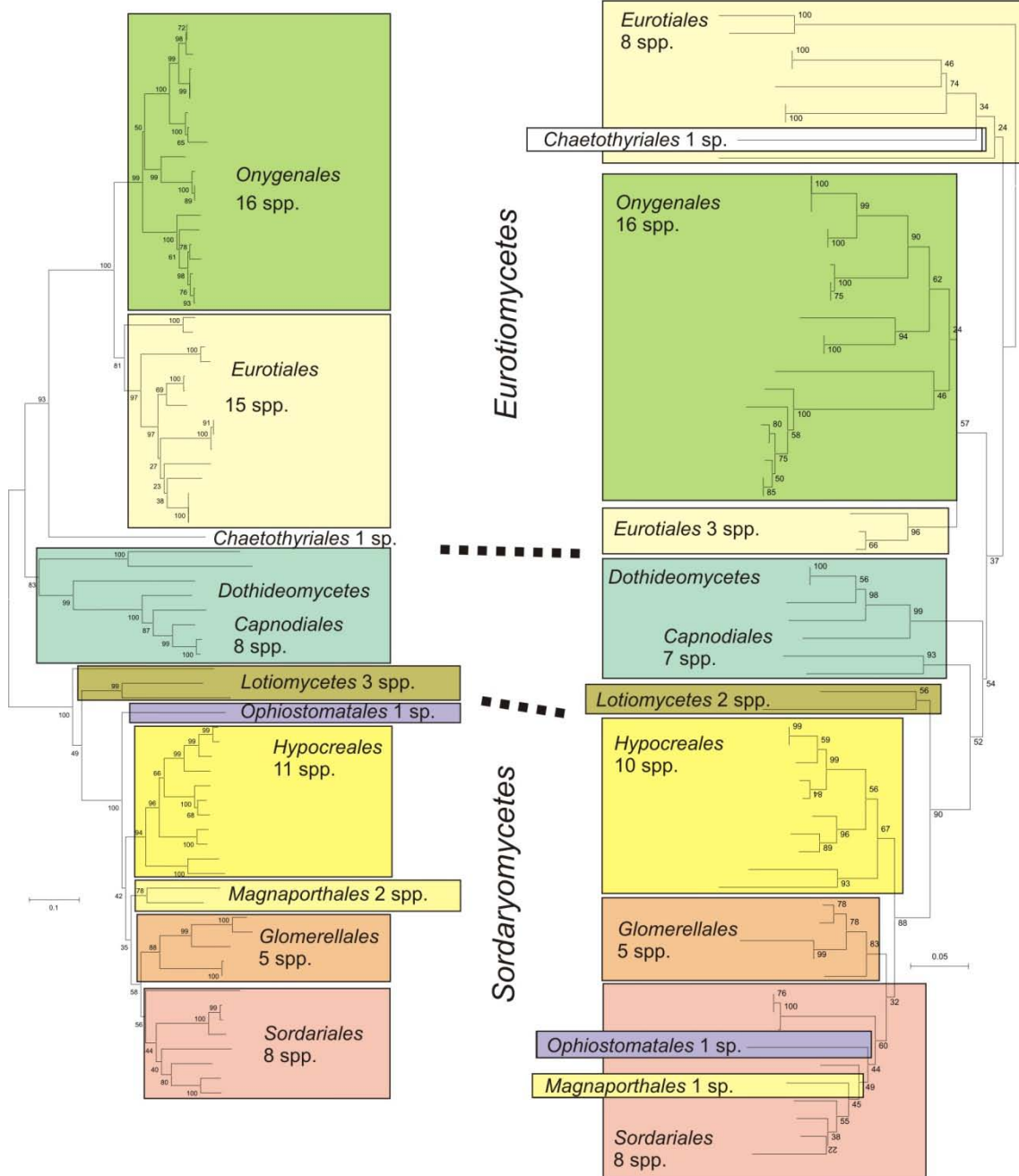


Fig. R2.4. SlbA y SlbB muestran la misma distribución filogenética. Árboles filogenéticos realizados con las secuencias proteicas de los diferentes ortólogos de SlbA y SlbB mediante el programa MEGA5.2. En cada nodo se representa la distancia entre las secuencias.

Resultados: Capítulo 3
La proteólisis como mecanismo
molecular de señalización

3.1. Estudio funcional de formas etiquetadas de SltA y SltB

Los resultados genéticos que habíamos obtenido mostraban que tanto la delección del gen *sltA* como la del gen *sltB* causaban el mismo fenotipo de sensibilidad a determinados cationes y que el doble mutante era indistinguible de los mutantes simples. Basándonos en esta evidencia de interacción funcional, nos propusimos estudiar en más detalle la relación entre ambas proteínas. Nuestra hipótesis de partida fue que el factor transcripcional SltA debía estar sometido a la acción reguladora de la proteína SltB. SltA debería ser sintetizado en una forma inactiva y las actividades pseudoquinasa y/o proteasa SltB activarían al factor transcripcional (ver modelos de trabajo en Fig. R3.4).

3.1.1 Construcción de cepas que expresan formas etiquetadas de SltA y/o SltB

Con el objetivo de estudiar la existencia de formas modificadas postraduccionalmente tanto de SltA como de SltB, así como para determinar su localización celular, se construyeron cepas que expresaban estas proteínas etiquetadas en su extremo C-terminal con diferentes epítopos, HA, Myc y GFP. El etiquetado de cada proteína se realizó siguiendo la estrategia descrita en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos.

Para realizar este trabajo con cepas genotípicamente homogéneas, se utilizó de forma rutinaria a la cepa MAD1427 como la receptora de los casetes de DNA correspondientes. Tras seguir el protocolo habitual de obtención de cepas del laboratorio mediante transformación, se seleccionaron las estirpes recombinantes MAD3625 (SltB::GFP), MAD3734 (SltB::_{3x}Myc) y MAD3652 (SltA::_{x3}HA) para los siguientes experimentos.

En el caso de SltA, se utilizó el epítipo HA para generar la proteína etiquetada puesto que la fusión a GFP parecía interferir con su función en la célula y en la detección de la proteína (ver Capítulo 5). Con el objetivo de estudiar ambas proteínas en el mismo extracto proteico, se generó una cepa que expresaba ambas proteínas etiquetadas, SltA::_{x3}HA y SltB::GFP. Para la obtención del casete de DNA correspondiente a la construcción SltB::GFP se siguió la estrategia descrita en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Se utilizó la cepa MAD3652 (SltA::_{x3}HA) como receptora de este casete de transformación, seleccionando a la estirpe MAD3751 (SltA::_{x3}HA, SltB::GFP) tras seguir el proceso de obtención de cepas habitual.

3.1.2 Formas de la proteína SltA presentes en la célula

Con el fin de comprobar la funcionalidad de la proteína etiquetada SltA::_{3x}HA (MAD3652), se realizaron test de crecimiento sobre medios sólidos en los que se incluyó estrés

salino y la alcalinización del medio (Fig. R3.1, panel A). Aunque el crecimiento radial de la colonia que expresaba la quimera de fusión fue ligeramente menor que el de la cepa silvestre en las condiciones de estrés ensayadas, asumimos que la proteína SltA fusionada al epítipo $_{3x}$ HA es funcional.

Una vez comprobada su funcionalidad, se procedió al estudio de la quimera SltA:: $_{3x}$ HA en extractos proteicos obtenidos mediante lisis alcalina del micelio de la cepa MAD3652, para seguidamente analizarlos en ensayos de *Western-blot* siguiendo los protocolos habituales del laboratorio (ver Materiales y Métodos). Como se observa en el panel B de la figura R3.1, el etiquetado de SltA en su extremo C-terminal nos permitió visualizar dos formas de esta proteína. El peso molecular correspondiente a la quimera SltA fusionada a las tres copias del epítipo HA es de 82,8 kDa. A la forma de menor movilidad electroforética se le estimó un tamaño de 100 kDa, que debe corresponder a la forma primaria de la quimera SltA:: $_{3x}$ HA. El peso molecular teórico correspondiente a la proteína nativa SltA es de 77,91 kDa, por lo que hemos denominado en este trabajo a esta forma como SltA 78 kDa (SltA^{78kDa}).

También se detectaron dos bandas con movilidades electroforéticas muy cercanas y se les estimó un tamaño aproximado de 45 kDa. En este caso, ambas bandas deben contener formas truncadas de este factor transcripcional. Lógicamente, al ser detectados con el anticuerpo α -HA, estos fragmentos de SltA deben ser regiones pertenecientes a la porción carboxilo terminal de esta proteína. Para estimar los límites de estos fragmentos se tuvo en cuenta la localización del dominio de dedos de zinc. Así, un fragmento que incluyese a este dominio y los últimos 198 aminoácidos tendría un peso molecular teórico de 31,6 kDa, por lo tanto las formas truncadas detectadas deben, al menos, contener los aminoácidos entre las coordenadas 414 (primer aminoácido del primer dedo de zinc) y 698, el final de la proteína. Una definición más precisa de estos límites se obtuvo tras generar diversas construcciones para obtener un alelo mutante de *sltA* que mimetizase a este fragmento de la proteína (apartados 3.6 y 3.7 de Resultados). Adicionalmente, se demostró que la banda de menor movilidad corresponde a una versión modificada del mismo fragmento de SltA (ver Capítulo 4). Independientemente de esta modificación, al conjunto de ambas formas de mayor movilidad electroforética se le ha denominado en este trabajo como SltA 32 kDa (SltA^{32kDa}).

Los resultados obtenidos muestran que existen varias formas de SltA en la célula, al menos tres, y que debe existir un mecanismo proteolítico tras la formación de SltA^{32kDa}.

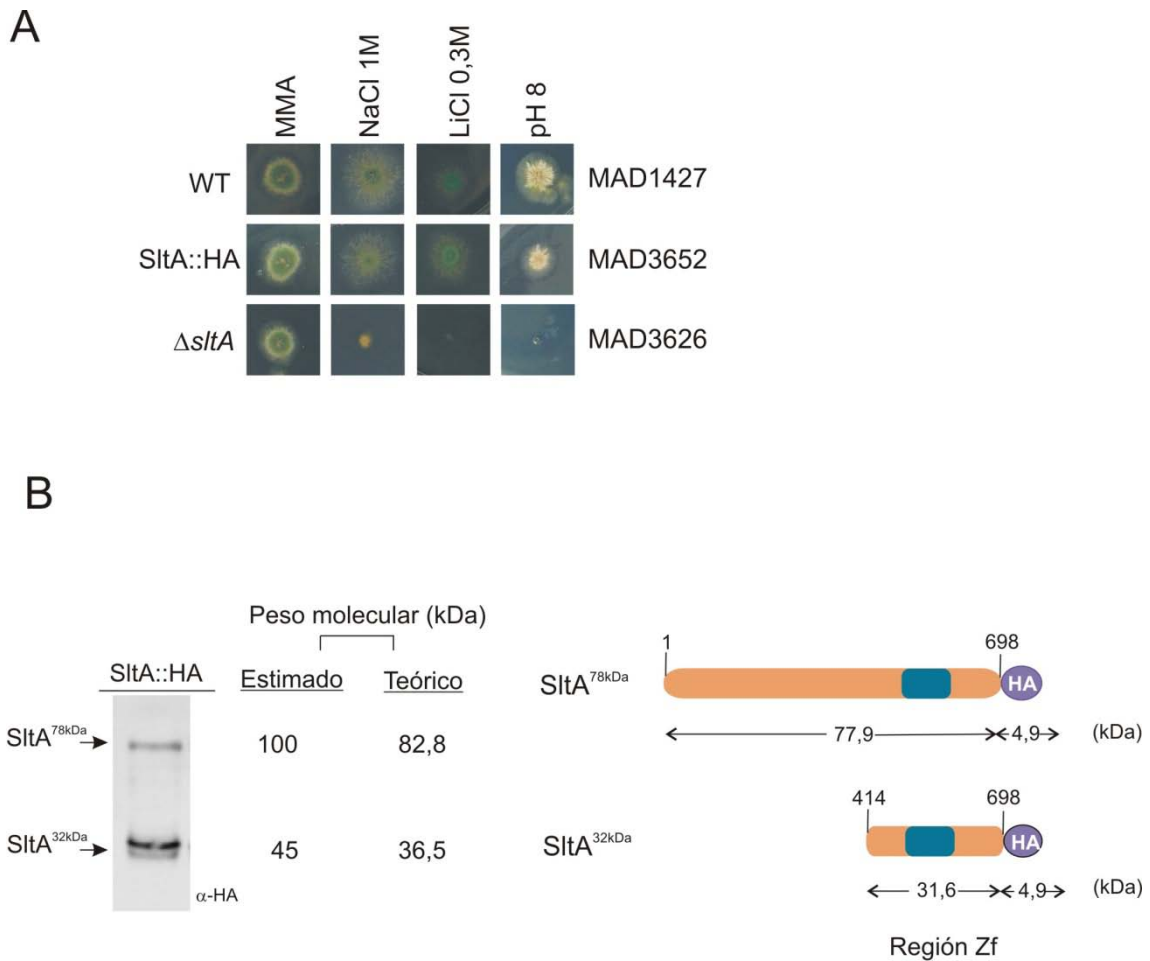


Fig. R3.1. Estudio funcional de la forma etiquetada de SltA. A) Análisis fenotípico de la cepa portadora del alelo mutante *sltA* que expresa la quimera SltA::HA, MAD3652. Las esporas de cada cepa fueron inoculadas sobre MMA y MMA conteniendo NaCl 1M, LiCl 0,3 M y 100 mM de Na₂HPO₄ (pH alcalino, pH 8). Las imágenes de las diferentes colonias o puntos de inóculo en caso de no crecimiento, fueron tomadas tras su incubación a 37 °C durante 48 horas. Como control se muestra el crecimiento en las mismas condiciones de la cepa silvestre, MAD1427 y la cepa nula *sltA*, MAD3626. B) *Western-blot* (izda.) realizado con el extracto proteico del micelio de la cepa MAD3652, en condiciones basales de cultivo. Representación esquemática (dcha.) de las diferentes formas SltA::HA inmunodetectadas en el ensayo empleando el anticuerpo α-HA. Se indican los pesos moleculares teóricos y estimados para cada una de las formas etiquetadas de SltA.

3.1.3 Diferentes formas de SltB también están presentes en la célula

Para estudiar a la proteína SltB utilizamos la cepa MAD3625, que expresa la quimera SltB::GFP. Así, detectamos esta proteína en los extractos proteicos obtenidos a partir de micelio de la cepa indicada utilizando los anticuerpos adecuados, y determinamos su localización celular mediante microscopía de fluorescencia (ver Capítulo 5).

El peso molecular teórico de la quimera SltB::GFP es de 168 kDa aproximadamente, siendo el de SltB de 141,45 kDa. En los extractos proteicos se detectó una banda cuyo peso estimado era de 100 kDa, lo que no correspondía con el esperado para la quimera SltB::GFP (Fig. R3.2, panel A). Puesto que SltB está etiquetado en su extremo C-terminal, esta banda

debía corresponder a la región carboxilo terminal etiquetada de SltB. Con la intención de visualizar la forma completa de esta proteína se aumentó notablemente el tiempo de exposición durante el revelado de la inmunodetección. Así se detectó, con una intensidad tenue, una banda de menor movilidad electroforética con un peso molecular estimado de ~250 kDa (indicada con un asterisco en el panel A, Fig. R3.2). A pesar de la considerable diferencia en la movilidad observada con la esperada, esta banda debería corresponder a la forma nativa de SltB etiquetada con GFP. Este patrón de movilidad electroforética de la proteína etiquetada SltB no se vio alterado por el etiquetado de SltA, tal y como se observa en el panel A de la Fig. R3.2, en extractos proteicos de la cepa MAD3751 en la que se expresan las quimeras SltA::_{3x}HA y SltB::GFP. La detección del mismo patrón electroforético que el observado para cada una de las quimeras en extractos independientes, indicó que la expresión simultánea de ambas proteínas etiquetadas no interfiere en sus respectivas migraciones electroforéticas.

Para verificar que el patrón de bandas observado para la quimera de SltB era independiente del epítipo al que estuviera fusionado, se generó la cepa MAD3734. Esta estirpe expresa la proteína SltB etiquetada en su extremo carboxilo terminal con el epítipo _{3x}Myc (SltB::_{3x}Myc), siendo el peso molecular teórico para esta fusión de 152,4 kDa. En extractos proteicos de la cepa MAD3734 se detectó de nuevo una banda de mayor movilidad electroforética que la esperada para la proteína completa (~70 kDa frente a 152,4 kDa) (Fig. R3.2, panel B, carril 2). La diferencia de migración electroforética observada entre la forma truncada SltB::GFP y SltB::_{3x}Myc estaba de acuerdo con el peso molecular de las respectivas etiquetas (comparar carriles 1 y 2 en panel B, Fig. R3.2).

Dado que los análisis *in silico* realizados previamente sugerían la existencia de dos posibles dominios funcionales en SltB, cabía la posibilidad de que sobre esta proteína ocurriera un corte proteolítico que separase a ambos dominios. Para analizar esta hipótesis se generó una cepa que expresaba una versión de SltB doblemente etiquetada, tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal. La estrategia llevada a cabo para generar esta cepa se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Se utilizó el epítipo GFP para el etiquetado en el extremo N-terminal, de manera que también pudiésemos determinar su localización celular mediante microscopía de fluorescencia. Para el etiquetado en el extremo C-terminal se utilizó el epítipo Myc. La estirpe seleccionada, tras seguir el proceso habitual de obtención de cepas, fue MAD4899.

La forma completa GFP::SltB::_{3x}Myc expresada en MAD4899 tiene un tamaño teórico de 178,89 kDa, por lo que debería detectarse una banda correspondiente a este peso molecular tanto si la incubación se realizaba con un anticuerpo α -GFP como con α -Myc. La

inmunodetección del epítopo GFP permitió visualizar una banda con una movilidad electroforética estimada de 125 kDa mientras que el anticuerpo α -Myc iluminó una banda de 70 kDa, por lo que nuevamente no se estaba detectando la forma completa GFP::SlbB::_{3x}Myc (Fig. R3.2, panel B, carril 3 e imágenes accesorias). Se interpretó que la forma detectada con α -GFP correspondía a un fragmento bien definido de la región N-terminal de SlbB. El anticuerpo α -Myc detectaba en el mismo extracto proteico el fragmento restante de SlbB, hasta completar la totalidad de la proteína nativa.

La detección del epítopo Myc mostró la presencia en el extracto proteico de una forma truncada SlbB::_{3x}Myc procedente de la forma completa GFP::SlbB::_{3x}Myc como una banda con una migración entorno a los 70 kDa. Esta forma detectada debería corresponder a la misma forma truncada fusionada a _{3x}Myc en la proteína etiquetada solamente en el extremo C-terminal. Así, se comparó la detección con anticuerpo α -Myc de las formas truncadas de SlbB en los extractos proteicos correspondientes a las dos cepas MAD3734 y MAD4899, y en ambos casos se halló una banda con idéntica movilidad electroforética (comparar en la Fig. R3.2, panel B los carriles 2 y 3).

Estos resultados demuestran que tanto el epítopo Myc como GFP no impiden que se produzca el corte proteolítico de la proteína SlbB, y que éste debe producirse en la misma región separando el dominio proteasa del pseudoquinasa. El conjunto de resultados obtenidos pone de manifiesto la existencia de un proceso de proteólisis dirigida sobre la proteína SlbB, liberándose dos dominios cuya función en el sistema señalizador de SlbA debía ser establecido.

Para determinar el grado de funcionalidad de estas formas quiméricas de SlbB, se realizaron test de crecimiento en condiciones de estrés catiónico y alcalinidad (Fig. R3.2, panel C). El crecimiento radial de las estirpes que expresaban las formas etiquetadas solo en el extremo C-terminal no mostró diferencias apreciables respecto al crecimiento de la cepa silvestre receptora en los estreses ensayados, por lo que estas formas etiquetadas debían proporcionar versiones funcionales de SlbB. Sin embargo, el fenotipo de la cepa que expresaba la forma doblemente etiquetada fue similar al mostrado por la cepa nula *slbB*, por lo que se determinó que el doble etiquetado de la proteína SlbB no proporcionaba formas funcionales. Puesto que las quimeras SlbB::GFP y SlbB::_{3x}Myc son proteolizadas y dan lugar a una forma truncada SlbB funcional, el etiquetado N-terminal con GFP podría ser el responsable de la pérdida de función SlbB, aunque la presencia de ambos epítopos no impida su proteólisis. Este resultado evidenciaba un papel importante del dominio pseudoquinasa de SlbB en la ruta de señalización Slb (ver más adelante).

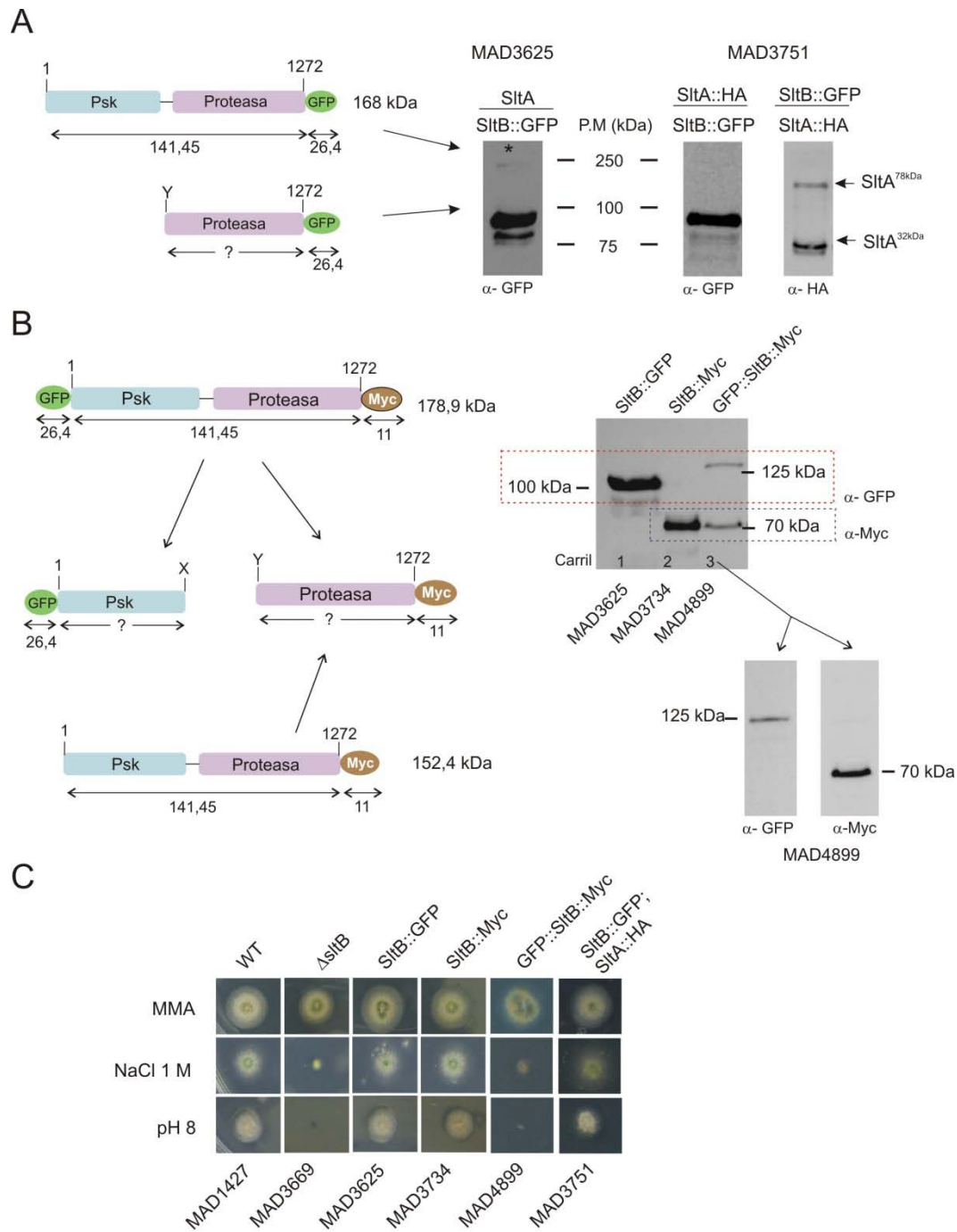


Fig. R3.2. Formas de SitB presentes en la célula. En los paneles A y B se muestran los resultados de la inmunodetección de formas etiquetadas de SitB en extractos proteicos totales. A la izquierda se muestran esquematizadas las interpretaciones de las formas de SitB visualizadas. A) Las flechas señalan las bandas correspondientes a las formas completa y truncada C-terminal de SitB etiquetadas con GFP en extractos proteicos obtenidos de la cepa MAD3625. Se indican los pesos moleculares correspondientes al marcador de peso molecular utilizado (kDa). A la derecha se muestra la inmunodetección de las quimeras SitB::GFP y SitA::HA en extractos proteicos obtenidos de micelio de la cepa MAD3751. B) *Western-blot* realizado con los extractos proteicos de las cepas indicadas en la parte inferior de la imagen. En rojo se indica las bandas detectadas con el anticuerpo α -GFP, y en azul las detectadas con α -Myc. Se incluyen, debajo del carril 3, las detecciones por separado de la forma doblemente etiquetada de SitB utilizando los anticuerpos α -GFP y α -Myc. Se indican los pesos moleculares estimados de cada una de las formas inmunodetectadas. C) Test de crecimiento realizado con las cepas indicadas en la parte inferior de la composición de imágenes. Las esporas de cada cepa fueron inoculadas sobre MMA y MMA conteniendo NaCl 1 M y 100 mM de Na_2HPO_4 (pH alcalino, pH 8). Las imágenes de cada colonia fueron tomadas en las mismas condiciones descritas en la Fig. R3.1.

3.2. Relación funcional entre las diferentes formas celulares de SltA y SltB

Los datos genéticos mostraban que las funciones SltA y SltB debían estar estrechamente relacionadas, por lo tanto nos centramos en el estudio de una interrelación funcional de las diferentes formas proteolizadas de SltA y de SltB.

Con este objetivo se generó en primer lugar una cepa que expresaba la quimera SltB::GFP en ausencia de función SltA. Para ello hubo que generar una nueva cepa Δ sltA, MAD3919, que permitió la compatibilidad de los marcadores de selección para generar el alelo mutante de *sltB* que expresara SltB etiquetada con GFP (ver Materiales y Métodos). La cepa MAD3919 mostró el fenotipo esperado de sensibilidad al estrés salino y la alcalinización del pH del medio derivado de la ausencia del factor SltA (Fig. R3.3 panel A). Seguidamente se procedió a reemplazar el *locus sltB* con la quimera que expresaba SltB::GFP y entre los transformantes analizados fue seleccionada la estirpe MAD3705. Como cabía esperar la cepa MAD3705 mostró el mismo fenotipo de pérdida de función de *sltA* que su receptora MAD3919 en cuanto a sensibilidad a los diferentes estreses abióticos ensayados (Fig. R3.3, panel A).

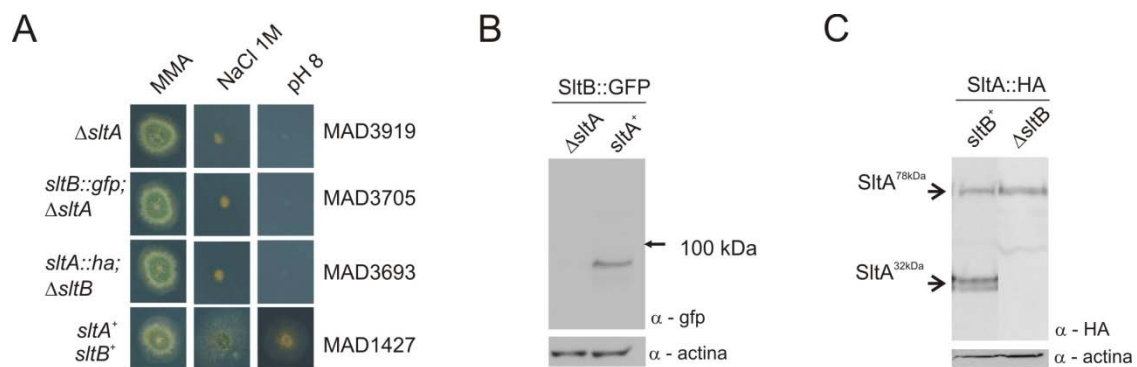


Fig. R3.3. Regulación cruzada entre SltA y SltB. SltA es necesario para la expresión de SltB, el cuál es esencial para que tenga lugar la proteólisis de SltA. A) Análisis fenotípico de las cepas portadoras de alelos nulos *sltA* y *sltB* en las cepas que expresan cada una de las quimeras SltA::HA y SltB::GFP (MAD3693 y MAD3705, respectivamente). B) SltB::GFP no es detectado en extractos proteicos procedentes de una cepa que porta un alelo Δ sltA. C) En los extractos proteicos de una cepa Δ sltB que expresa a SltA etiquetada con HA, únicamente se detecta la forma completa SltA^{78kDa} al realizar su inmunodetección con α -HA. En los paneles B y C se utiliza la inmunodetección de actina como control del nivel de carga del extracto proteico.

Para determinar el estado de modificación postraduccional de SltB en ausencia de SltA se procedió al análisis, con los anticuerpos adecuados, de extractos de proteína total del micelio de la cepa MAD3705 cultivado en las condiciones estándar. En el panel B de la figura R3.3 se muestra la ausencia de detección de proteína SltB::GFP en dicho fondo genético, utilizando los niveles de actina como control de referencia, comparado con los niveles detectados en una cepa silvestre *sltA* (MAD3650). Este resultado sugería que en ausencia de

SltA debía existir una notable reducción en la expresión del gen *sltB*, lo que fue confirmado posteriormente (ver Capítulo 4), y establecía a este gen como diana del factor transcripcional SltA. El fenotipo idéntico del mutante nulo simple *sltA* y del mutante doble nulo *sltB; sltA* podría ser interpretado en ambos casos como la ausencia de función de ambas proteínas simultáneamente.

Para establecer el efecto de la ausencia de SltB sobre la modificación postraducciona de SltA, se generó una cepa que expresaba al factor SltA etiquetado con el epítipo HA en un fondo nulo *sltB*. En este caso se utilizó la cepa Δ *sltB*, MAD3669, como receptora del casete de DNA que codifica para la quimera SltA::_{3x}HA. De entre los transformantes se seleccionó a la estirpe MAD3693 para realizar los experimentos descritos a continuación. Primeramente, se verificó que la expresión de la quimera no alteraba el fenotipo de sensibilidad al estrés salino y la alcalinidad que causa la pérdida de función *sltB*. Posteriormente, se procedió a extraer proteína total mediante lisis alcalina del micelio de la cepa indicada, y a la detección de las formas de SltA en los extractos proteicos de una cepa nula *sltB* mediante *Western-blot* (Fig. R3.3, panel C). Utilizando un anticuerpo α -HA se visualizó una banda que presentaba una movilidad equivalente a 100 kDa. Ésta debía corresponder a la forma de menor movilidad electroforética de SltA, es decir la forma completa denominada SltA^{78kDa}. El hecho de que no se visualizara la banda correspondiente a SltA^{32kDa} indicaba que la proteólisis de la forma de 78 kDa no se estaba produciendo. Por lo tanto la actividad de SltB es necesaria para la proteólisis de SltA y dado que contiene un dominio proteasa, SltB era el principal candidato para mediar el corte proteolítico del factor transcripcional (ver modelo en Fig. R3.4).

Además, puesto que el fenotipo mostrado por la cepa MAD3693 era indistinguible del mutante portador del alelo nulo *sltA*, proponemos que la forma SltA^{78kDa} no debe regular la expresión de los genes necesarios para la tolerancia a los estreses abióticos analizados, consecuentemente, la forma SltA^{32kDa} debe realizar dicha función. Esta hipótesis no excluye un efecto regulador coordinado por ambas formas de SltA.

El conjunto de todos los datos obtenidos hasta ese momento nos hizo cambiar el modelo inicial de la ruta reguladora Slt. En la figura R3.4 se hace una comparación entre ambos modelos y su repercusión en los objetivos del trabajo.

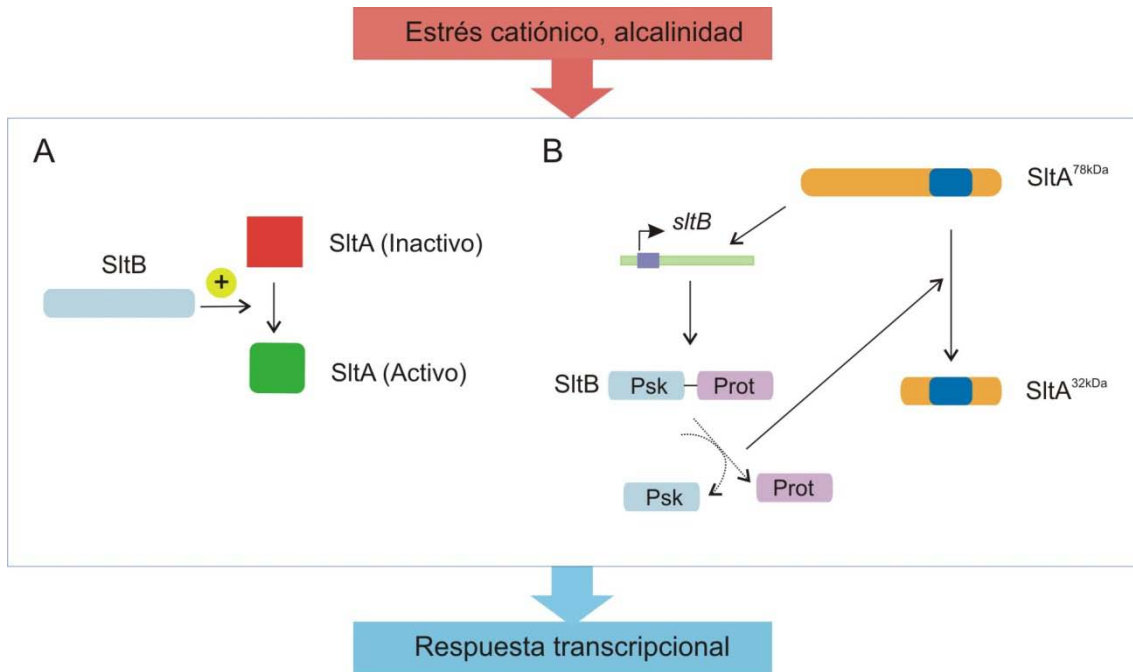


Fig. R3.4. Evolución del modelo de trabajo de la ruta reguladora Slt. En A) se ilustra el modelo inicial sobre el que se basaban los primeros experimentos de este estudio. B) Nuevo modelo de trabajo que incluye las diferentes formas detectadas tanto de SltA como de SltB, y las relaciones funcionales existentes entre ellas.

3.3 SltA, el efector final de la ruta Slt

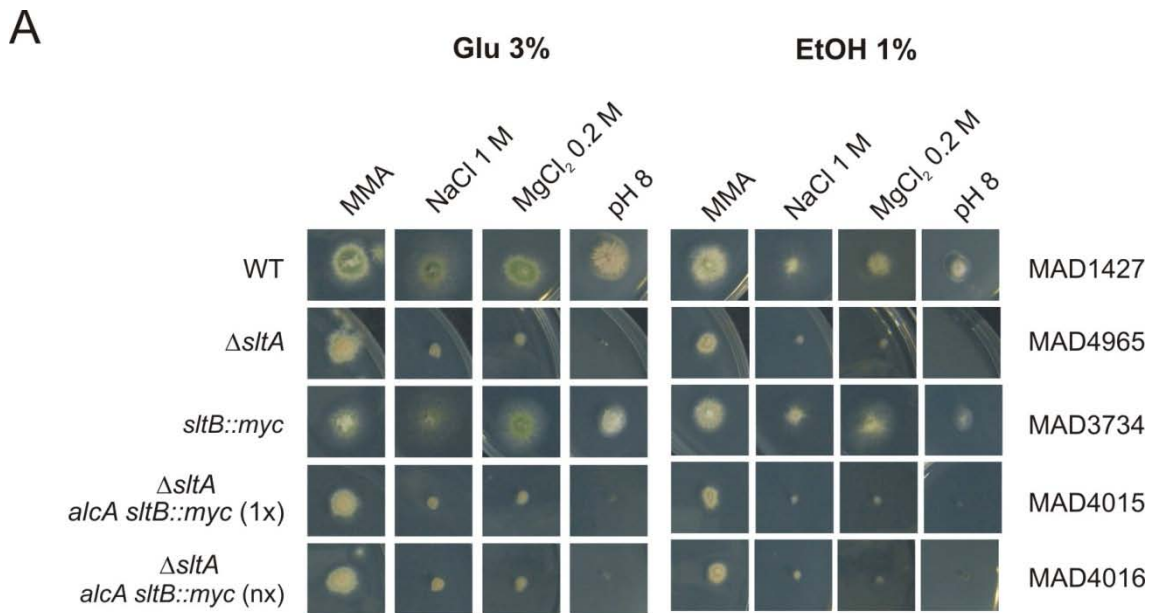
Dado que la expresión de *sltB* depende de la actividad SltA se decidió expresar a este gen de forma independiente para así establecer si SltA es el efector final de esta nueva ruta reguladora objeto de estudio. Con esta intención generamos una cepa *sltA* nula que además portase un plásmido que permitiera la expresión de una forma etiquetada de SltB bajo un promotor regulable. Para ello, se utilizó el promotor inducible por alcohol, e.g. etanol 1% (v/v), de la alcohol deshidrogenasa I, *alcA^p*, para mediar la expresión de la quimera SltB::_{3x}Myc.

El plásmido *palcA-SltB-Myc* (ver apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos), se transformó en la cepa MAD3816 y, dado que fue dirigido al *locus pyroA*, se seleccionaron transformantes protótrofos de piridoxina. Todos los transformantes obtenidos fueron viables en homocariosis y, tras realizar la correspondiente verificación mediante *Southern-blot*, se seleccionaron de entre todos ellos a la cepa MAD4015 que contenía una única copia del plásmido (1x), y a la cepa MAD4016 que contenía más de una copia integrada (nx).

Con el objetivo de determinar si la sobreexpresión de *sltB* podía compensar la carencia de función *sltA*, se analizó el crecimiento de estas cepas en medio mínimo sólido suplementado con MgCl₂ 0,2 M, NaCl 1 M y LiCl 0,3 M y para ajustar el pH a valor de 8 se

añadió 0,1 M de Na_2HPO_4 . Como fuente de carbono se preparó medio conteniendo glucosa al 3 % (p/v), condición represora del promotor *alcA*, y medio con etanol al 1% (v/v), condición inductora de la expresión del transgen. El fenotipo mostrado por estas cepas en las condiciones de cultivo indicadas se refleja en el panel A de la figura R3.5. Se comparó el crecimiento radial de las cepas generadas con los de la cepa silvestre MAD1427, una cepa nula *sltA* protótrofa para piridoxina (MAD4965), y con la cepa que expresaba la quimera *SlbB::_{3x}Myc* (MAD3734). En condiciones de represión de la expresión de la quimera *SlbB::_{3x}Myc*, el fenotipo mostrado por ambas estirpes (MAD4015 y MAD4016) en las condiciones ensayadas era idéntico al de la cepa Δ *sltA*. Al añadir etanol (1 %) al medio de cultivo, permitiendo así la expresión de la forma etiquetada de *sltB*, el crecimiento de ambas cepas fue también similar al de la cepa nula *sltA*. Para verificar que existía expresión de la proteína de fusión *SlbB::_{3x}Myc* desde el promotor *alcA*, se analizaron los extractos proteicos de estas cepas mediante *Western-blot*. Para ello se procedió a extraer proteína total a partir del micelio cultivado en medio mínimo líquido suplementado con glucosa al 3% (p/v) o con etanol al 1% (v/v). Este procedimiento se desarrolló para las dos cepas objeto de estudio y las cepas control utilizadas en el test de resistencia citado previamente. El revelado del *Western-blot* (Fig. R3.5, panel B) permitió observar la banda correspondiente a la proteína *SlbB::_{3x}Myc* cuando el medio contenía el inductor etanol, pero no se detectaba en condiciones represoras del promotor *alcA^p* (glucosa). La forma detectada *SlbB::_{3x}Myc* mostraba la misma migración electroforética que la forma detectada en la cepa que expresa dicha forma bajo su propio promotor *sltB*. Se detectó una cantidad similar de esta proteína en los extractos correspondientes a la cepa que contenía una única copia del plásmido (MAD4015) y aproximadamente 2,5 veces más en los extractos de la cepa que contenía más de una copia (MAD4016).

Estos resultados ponen de manifiesto dos procesos relevantes para entender el sistema *Slb*. En primer lugar demuestran que *SlbA* es el efector final de la ruta *Slb*, puesto que la expresión *SlbA*-independiente de la proteína *SlbB* no puede suprimir la carencia de función *SlbA*, es decir la ausencia de *sltA* tiene un efecto totalmente epistático sobre la sobreexpresión de *sltB*. En segundo lugar el procesamiento de *SlbB* es independiente de la acción de *SlbA*, ya que se detectó la forma truncada de *SlbB::_{3x}Myc* en lugar de la forma nativa de la proteína tanto en presencia como en ausencia de actividad *SlbA*.



B

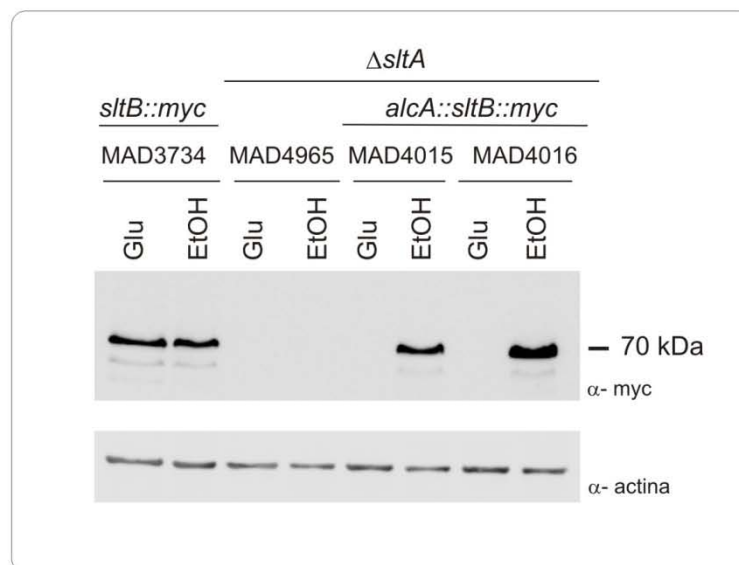


Fig. R3.5. La ausencia de SltA tiene un fenotipo epistático frente a la sobreexpresión de *sltB*. A) Test de crecimiento realizado con las cepas indicadas en la parte derecha de la composición. Se analiza el crecimiento colonial en condiciones represoras (glucosa 3%, Glu 3%, izda.) e inductoras (etanol 1%, EtOH 1%, dcha.) del promotor *alcA*. La cepa MAD4965 fue obtenida en el experimento de transformación con el plásmido recombinante *palcA::sltB::myc* y es utilizada como cepa control *pyroA*⁺. En el genotipo de las cepas MAD4015 y MAD4016, 1x y nx indican el número de copias del plásmido integradas en el locus *pyroA*, respectivamente. B) Inmunodetección de la quimera SltB::Myc en diferentes cepas y medios de cultivo represores y activadores del promotor *alcA*. En todos los casos se indica la presencia o ausencia de la forma truncada de 70 kDa que genera la proteólisis de SltB::Myc mediante su detección con α -Myc. Glu indica la presencia de glucosa al 3% (p/v) en el medio de cultivo, condición represora para *alcA*^p, y EtOH la presencia de etanol al 1% (v/v), condición activadora para *alcA*^p. Como control de igualdad de carga de los respectivos extractos proteicos totales se visualizan los niveles de actina, usando un anticuerpo específico (α -actina).

3.4 Estudio funcional de los dominios de SltB

Puesto que SltA se trunca y requiere de la función SltB para esta proteólisis, y dado que SltB podría contener un dominio con actividad proteasa (Capítulo 2), nos preguntamos si este dominio sería la proteasa tras el proceso proteolítico de SltA. El doble etiquetado de la proteína SltB había puesto de manifiesto la existencia por separado en la célula de los dos dominios deducidos tras los análisis bioinformáticos (Apartado 2.1, Capítulo 2). Con el objetivo de investigar en la funcionalidad de estos dominios decidimos expresar cada uno de ellos de forma independiente en la célula.

Para establecer los límites de estos dominios en la secuencia de SltB se tuvo en cuenta el grado de similitud existente entre las secuencias ortólogas de SltB (Apartado 2.2, Capítulo 2), y el peso molecular que habíamos estimado previamente para la banda detectada en los ensayos de inmunodetección de las quimeras SltB::GFP y SltB::_{3x}Myc. Así, decidimos generar una forma de SltB que expresase sólo los primeros 590 aminoácidos de su secuencia, y otra que expresase los últimos 581 aminoácidos, ambas etiquetadas con diferentes epítomos para poder ser visualizadas mediante inmunodetección. Para simplificar la lectura de las figuras, las quimeras generadas se nombrarán de forma genérica como SltB^{Psk} (dominio pseudoquinasa) o SltB^{Prot} (dominio proteasa), sin especificar el epítomo utilizado. En el caso de los *Western-blots* realizados, sólo se mostrarán las imágenes correspondientes a las quimeras etiquetadas con la proteína verde GFP, puesto que este epítomo fue común para todas ellas y facilita su comparación. No obstante, en cada caso se comprobó la funcionalidad de cada uno de los etiquetados y el tamaño de las bandas esperadas en la inmunodetección.

3.4.1 Estudio funcional del dominio pseudoquinasa de SltB (SltB^{Psk})

Se generó un casete de transformación para expresar la región de SltB que habíamos definido, la cual se extendía desde la metionina inicial hasta el aspártico 590. Para ello, se amplificó mediante PCR la secuencia nucleotídica correspondiente, a partir del DNA genómico de una cepa silvestre, y se fusionó tanto al fragmento *3xha::pyrG^{Af}* como al *gfp::riboB^{Af}* (Fig. R3.6, panel A, izda.). A continuación se transformó la cepa silvestre MAD1427 con el casete *sltB^{Psk}::3xha::pyrG^{Af}* y la MAD3652 con el casete *sltB^{Psk}::gfp::riboB^{Af}*. Todos los transformantes obtenidos fueron viables en homocariosis y se siguió el proceso habitual de selección de cepas recombinantes, hasta seleccionar a las estirpes MAD3694 y MAD3815 para realizar los siguientes experimentos. Posteriormente, se comprobó la funcionalidad de cada una de las quimeras mediante test de crecimiento en condiciones de estrés y alcalinidad de la forma habitual (Fig. R3.6, panel B). Todos los transformantes que expresaban esta forma truncada de

SltB mostraron un crecimiento colonial similar al observado para el mutante nulo *sltB*, en todas las condiciones ensayadas (líneas 3 y 4). Por tanto, la forma truncada SltB (1-590) en sus dos formas etiquetadas no es funcional en la célula.

Para determinar si existía expresión de las formas truncadas SltB (1-590) etiquetadas y para verificar la correspondencia en su movilidad electroforética con la del dominio pseudoquinasa procedente de la proteína doble etiquetada SltB, se extrajeron las proteínas del micelio de las estirpes MAD3694 y MAD3815. Se detectaron ambas quimeras SltB con los anticuerpos adecuados (Fig. R3.6, panel C), siendo sus migraciones electroforéticas las correspondientes a sus respectivos pesos teóricos: 70,58 kDa para SltB^{Psk}::_{3x}HA y 93,12 kDa SltB^{Psk}::GFP. Sin embargo, la movilidad observada para SltB^{Psk}::GFP fue mayor que la de la forma GFP::SltB^{Psk} (procedente de la proteólisis de la quimera GFP::SltB::_{3x}Myc). Este resultado sugiere que el dominio pseudoquinasa de SltB debe extenderse más allá de los 590 aminoácidos considerados inicialmente.

Para establecer si la región de SltB (1-590) era suficiente para inducir la proteólisis de SltA se procedió a estudiar a la quimera SltA::_{3x}HA en este fondo mutante (MAD3815). Al igual que en ausencia de SltB, la expresión en la célula de la forma SltB (1-590) sólo permitió la visualización de la forma nativa de SltA, SltA^{78kDa} (Fig. R3.6, panel D). Por lo tanto, la región elegida que contiene el dominio pseudoquinasa de SltB etiquetado no es suficiente para promover la proteólisis de SltA. La ausencia de la forma SltA^{32kDa} en este fondo genético explica que el fenotipo de esta cepa mutante (MAD3815) sea idéntico al mostrado por la cepa Δ *sltB*.

Para determinar la función del dominio pseudoquinasa de SltB en la ruta Slt fue de gran valor el estudio del efecto de la mutación *sltB56*, supresora del fenotipo deletéreo mostrado por un mutante Δ *vps20*. La estirpe objeto de nuestro estudio fue la MAD3768, obtenida tras cruzar la cepa mutante *sltB56* con una cepa silvestre para eliminar el alelo nulo *vps20*. El alelo mutante *sltB56* contiene en su secuencia nucleotídica un único cambio, la transversión timina 1434 a adenina (T1434A). Esta mutación da lugar a la aparición de un codón de parada ocasionando que la secuencia peptídica de SltB finalice en el aminoácido 477. La cepa *sltB56* mostraba un fenotipo de reducida sensibilidad a las condiciones de estrés salino y alcalinidad ensayadas (Fig. R3.6, panel B, línea 6). Esta pérdida parcial de función contrastaba con el hecho de que la proteína SltB56 careciese de 795 aminoácidos (casi 2/3 partes de la proteína SltB), en los que está incluido el dominio proteasa.

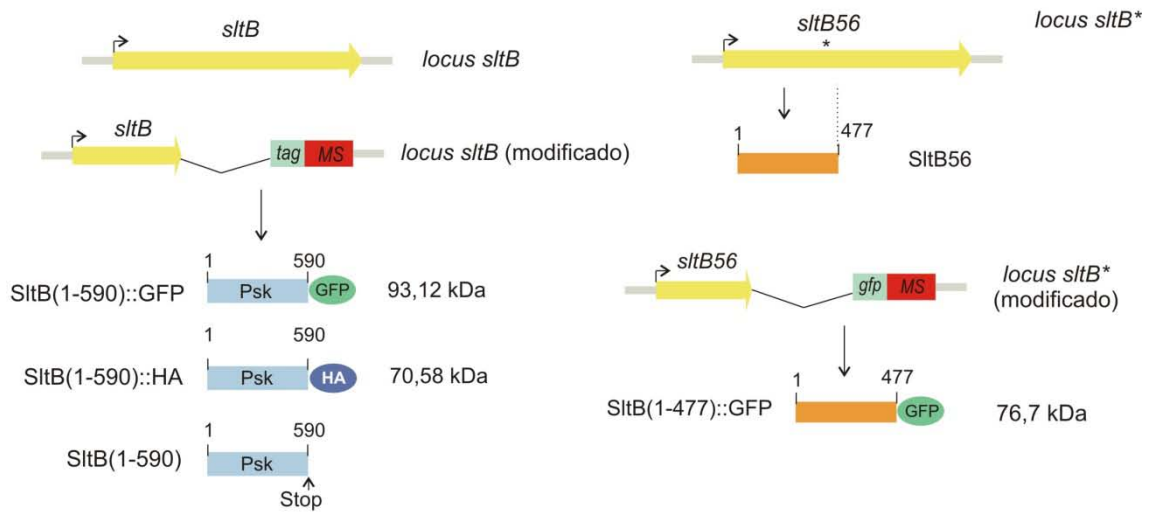
Con el fin de determinar cómo afectaba la mutación *sltB56* a la señalización de SltA, procedimos a expresar la forma SltA::_{3x}HA en este fondo genético. Para ello se cruzaron las estirpes MAD3769 (*sltB56*) y MAD3652 (SltA::_{3x}HA) y de entre la progenie se seleccionó a la

cepa doble mutante *sltB56*, *sltA::_{3x}ha*, MAD3934. En extractos proteicos de células de la cepa MAD3934 se detectaron tanto la forma nativa de SltA 78 kDa como la forma truncada de 32 kDa (Fig. R3.6, panel E). Cabe destacar que los niveles detectados de SltA, sumando los de todas sus formas, eran menores, alrededor de 4 veces, a los detectados en una cepa silvestre. Esta reducción en los niveles del factor transcripcional SltA podría explicar la menor tolerancia manifestada por esta cepa frente a los diferentes estrésemos abióticos ensayados. Este resultado descartaba al dominio proteasa de SltB como la proteasa específica responsable del truncamiento de SltA.

Adicionalmente, se generó una cepa que expresaba la proteína SltB56, SltB (1-477), etiquetada con la proteína verde GFP en su extremo carboxilo terminal (MAD4362), siguiendo el protocolo habitual para los etiquetados de proteínas y selección de cepas. En este caso, el etiquetado dio lugar a la pérdida de función SltB (Fig. R3.6, panel B, línea 7). Se extrajo proteína total a partir del micelio de esta cepa y se analizó mediante *Western-blot*, detectándose una proteína cuya migración electroforética se correspondía con el peso teórico calculado para la quimera (76,7 kDa) (Fig. R3.6, panel C).

El análisis de los diferentes fenotipos causados por la mutación *sltB56* demostraba que los primeros 477 aminoácidos correspondientes al dominio pseudoquinasa de SltB eran suficientes para promover el truncamiento de SltA. Sin embargo, este hecho contrastaba con el efecto de pérdida de función que producía la expresión de los primeros 590 aminoácidos de SltB en las dos formas etiquetadas estudiadas, SltB^{Psk}::GFP y SltB^{Psk}::_{3x}HA. Para determinar si la pérdida de función de esta forma truncada de SltB se debía al etiquetado, como se observó con la proteína SltB56::GFP, se generó mediante reemplazamiento génico del *locus sltB* una cepa que expresaba el fragmento SltB(1-590), MAD4581. Para ello, se introdujo en la secuencia codificante de *sltB* un codón de parada después del triplete que codificaba para el aminoácido 590. Para estudiar la proteólisis de SltA se utilizó a la cepa MAD3652 (SltA::_{3x}HA) como receptora del casete de transformación generado. Los transformantes obtenidos fueron analizados en condiciones de estrés y alcalinidad, observándose de nuevo en éstos el fenotipo de no funcionalidad de la ruta Slt que mostraba la cepa que expresaba la forma SltB(1-590)::GFP (Fig. R3.6, panel B, línea 5). De acuerdo con los resultados anteriores no se detectó proteólisis de SltA en este fondo mutante (Fig. R3.6, panel F). Por lo tanto, el fragmento SltB(1-590) no es una forma funcional del dominio pseudoquinasa. Estos experimentos sugieren que entre los aminoácidos 477 y 590 debe existir una región que actuaría de modo negativo en la función del dominio pseudoquinasa de SltB.

A



B

		MMA	NaCl 1M	pH 8		Funcional
(1)	WT				MAD1427	Sí
(2)	$\Delta sltB$				MAD3682	No
(3)	<i>SlitB(1-590)::GFP</i>				MAD3815	No
(4)	<i>SlitB(1-590)::HA</i>				MAD3694	No
(5)	<i>SlitB(1-590)</i>				MAD4581	No
(6)	<i>SlitB56</i>				MAD3934	Parcial
(7)	<i>SlitB(1-477)::GFP</i>				MAD4362	No

Fig. R3.6. Expresión del dominio pseudoquinasa de SlitB. A) Esquemas que representan las construcciones realizadas para la expresión de las diferentes formas mutantes de SlitB, generadas para el estudio funcional del dominio Psk (parte superior). B) Test de crecimiento realizado en las condiciones de estrés indicadas con las diferentes cepas objeto de estudio, así como su repercusión en su funcionalidad.

Esta figura continua en la siguiente página.

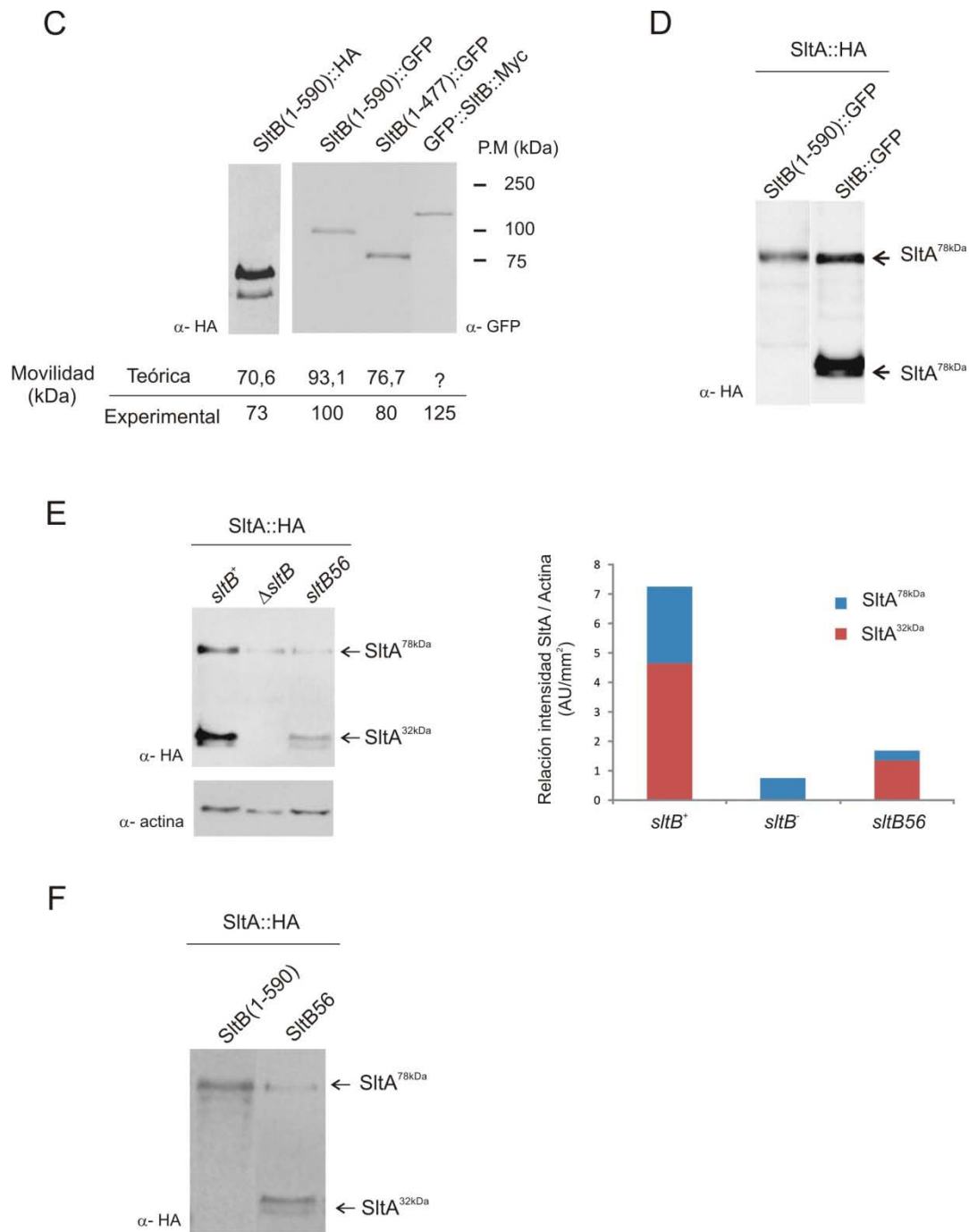


Fig. R3.6. (Continuación) Expresión del dominio pseudoquinasa de SltB. C) Movilidades electroforéticas en geles SDS-PAGE de las formas SltB truncadas y etiquetadas generadas en este estudio (MAD3694, MAD3815, MAD4362 y MAD4899), detectadas mediante el empleo de los anticuerpos α -HA y α -GFP. Se indican la movilidad y los pesos moleculares correspondientes a las diferentes proteínas del patrón utilizado (kDa). En la parte inferior se indican los pesos moleculares teóricos y experimentales definidos para cada caso (kDa). D) Inmunodetección de la quimera SltA::HA en un extracto proteico procedente de micelio de la cepa MAD3815 que expresa la fusión SltB(1-590)-GFP. E) Inmunodetección de las formas SltA^{78kDa} y SltA^{32kDa} en los extractos proteicos procedentes de micelio de la cepa MAD3934, *sltB56*. En la parte derecha se muestra un gráfico que representa la cantidad de proteína SltA (azul, SltA^{78kDa} y rojo, SltA^{32kDa}) en los fondos mutantes *sltB*⁺, *sltB* y *sltB56*. Los niveles de proteína fueron calculados mediante el empleo del software Multi Gauge, como se describe en Materiales y Métodos (apartado 6.2). La intensidad de pixel se muestra como AU/mm². F) *Western-blot* realizado para detectar a la proteína SltA::HA en los extractos proteicos de las cepas que expresan cada una de las dos formas proteicas correspondientes al dominio Psk sin etiquetar estudiadas (MAD4581 y MAD3934).

3.4.2 Estudio funcional del dominio proteasa de SltB (SltB^{Prot})

Para analizar el papel del dominio proteasa se procedió, siguiendo una estrategia similar a la descrita para el dominio pseudoquinasa, a generar cepas que expresaban la región de SltB desde el aminoácido 692 al 1272, SltB^{Prot}, bajo su propio promotor. Además, con el objetivo de estudiar a SltB^{Prot} en diferentes fondos mutantes, se generaron tres casetes de DNA que permitieron su fusión a diferentes epítomos y su selección durante el proceso de transformación (Fig. R3.7, panel A, izda.). Para ello, se amplificó por PCR la secuencia nucleotídica correspondiente a partir de DNA genómico de una cepa silvestre y se fusionó a los fragmentos *3xmyc::pyrG^{Af}*, *gfp::pyrG^{Af}* y *gfp::riboB^{Af}*. A continuación se transformó la cepa nula *sltB* MAD3669 con los casetes *sltB^{Prot}::3xmyc::pyrG^{Af}* y *sltB^{Prot}::gfp::pyrG^{Af}*, y la cepa MAD3652, *sltA::3xha*, con el casete *sltB^{Prot}::gfp::riboB^{Af}*. Tras seguir el proceso habitual de obtención de cepas recombinantes, se seleccionaron las estirpes MAD3710, MAD3711 y MAD3750 para trabajar con ellas.

A continuación se estudió la funcionalidad de cada una de las quimeras generadas mediante test de crecimiento en condiciones de estrés y alcalinidad. Todos los transformantes que expresaban la forma truncada SltB^{Prot} mostraron un crecimiento colonial similar al observado para el mutante *sltB* nulo en todas las condiciones ensayadas (Fig. R3.7, panel A, dcha.). Por lo tanto, estos resultados mostraban que la forma SltB^{Prot}, al igual que la forma SltB^{Psk} previamente estudiada, no debe permitir la correcta señalización de la ruta Slt.

Para demostrar que la forma SltB^{Prot} se estaba expresando correctamente se procedió a su inmunodetección en extractos obtenidos a partir del micelio de las estirpes generadas. En todos los extractos se pudo detectar la quimera (Fig. R3.7, panel B, izda.) y en el caso de la forma SltB^{Prot}::GFP su migración electroforética fue similar a la de la forma proteolizada carboxilo terminal de la proteína SltB::GFP (100 kDa). Este resultado demuestra que la región proteasa de SltB incluye aproximadamente los últimos 581 aminoácidos de su secuencia peptídica y que las diferentes quimeras producidas no son funcionales.

Para determinar si efectivamente la forma truncada 692-1272 de SltB no estaba induciendo apropiadamente la proteólisis de SltA se estudió la cepa MAD3750 que expresa a la forma SltA etiquetada con HA en este fondo mutante para SltB, como se indica más arriba. En los extractos proteicos de la cepa MAD3750 sólo pudo detectarse la banda correspondiente a la forma completa de SltA (SltA^{78kDa}), por lo tanto, la forma correspondiente al dominio proteasa de SltB no es suficiente para promover la proteólisis de SltA (Fig. R3.7, panel B, dcha.). Nuevamente, el fenotipo de pérdida de función de cada una de las cepas que expresan

la forma $\text{SlTB}^{\text{Prot}}$, que es idéntico al de la estirpe ΔsltB , es consecuencia de la ausencia de $\text{SlTA}^{32\text{kDa}}$ en dichas células.

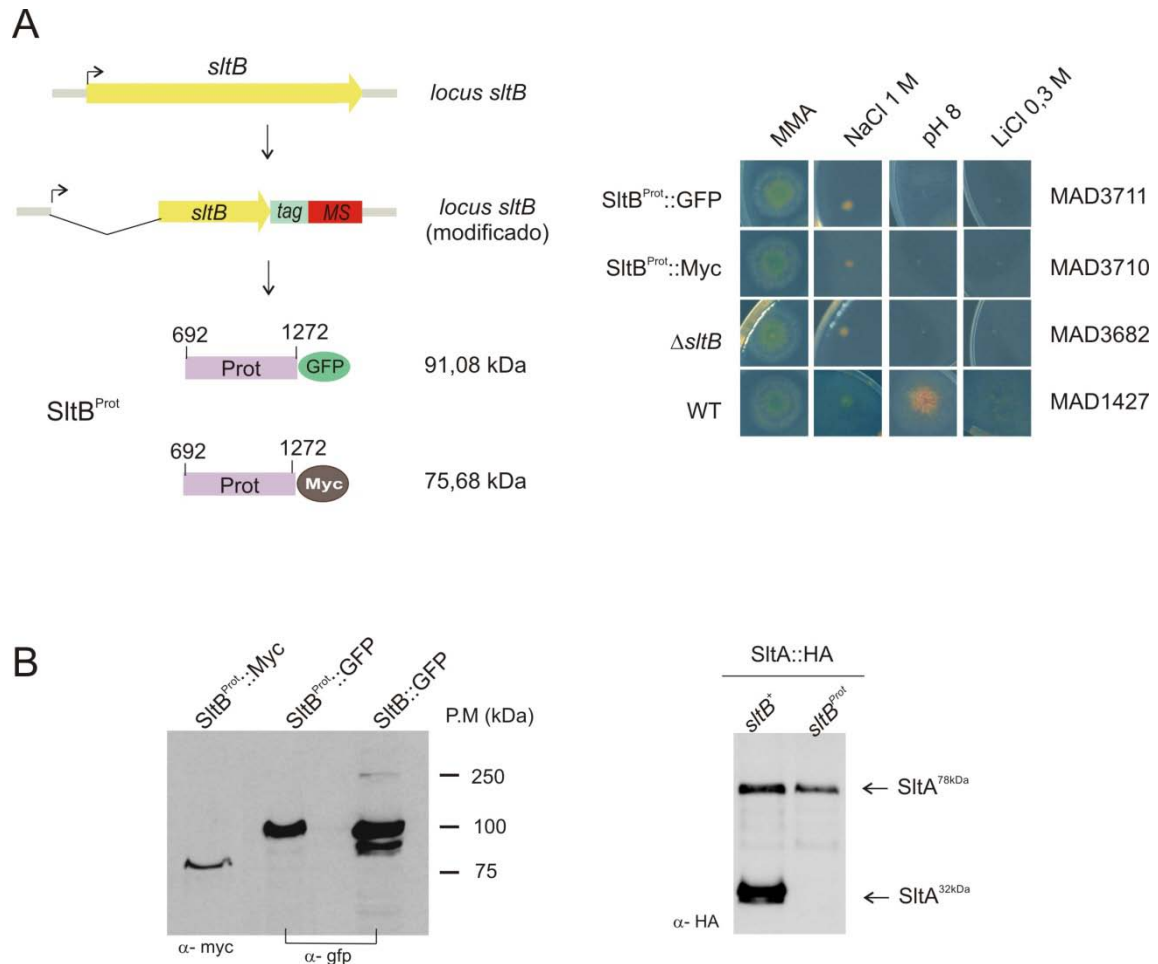
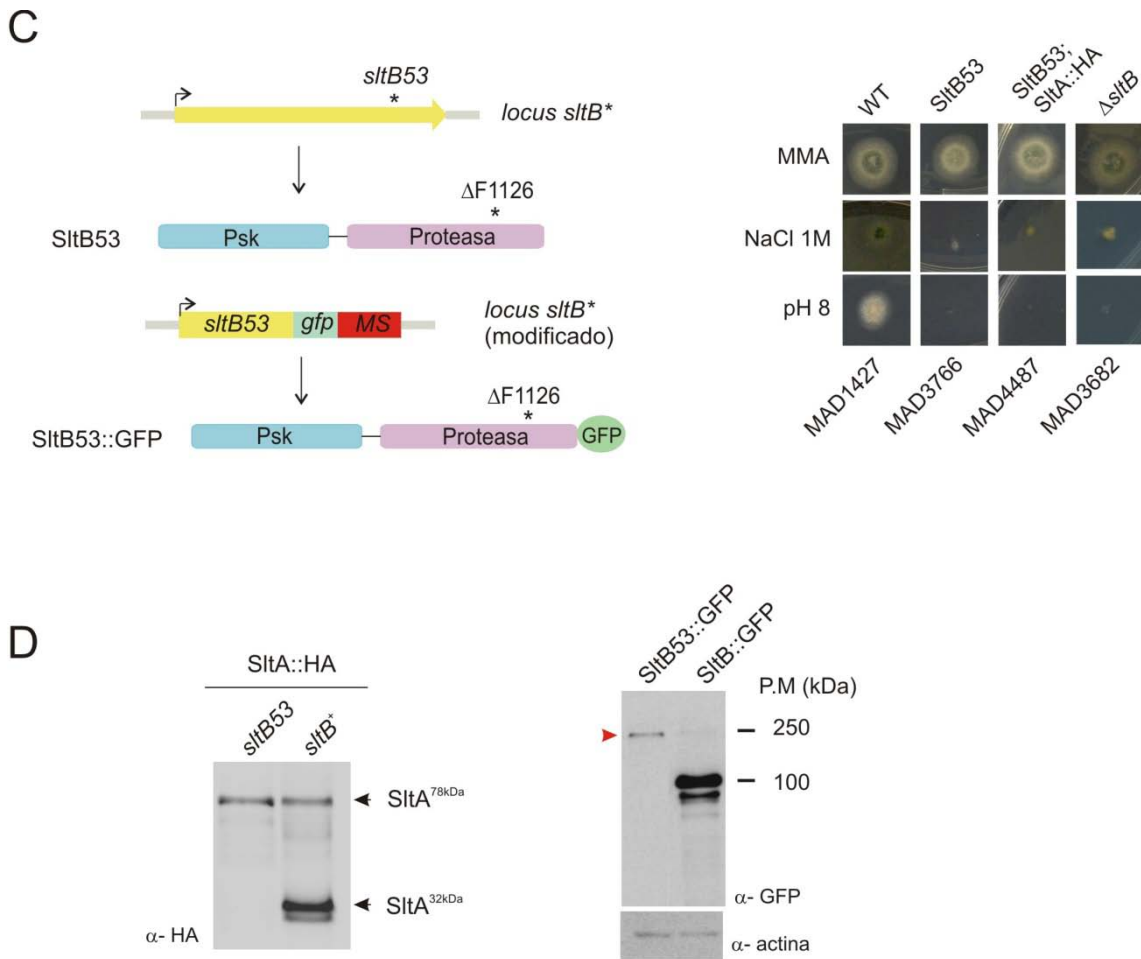


Fig. R3.7. Expresión del dominio proteasa de SlTB. A) Esquema de las diferentes versiones etiquetadas del fragmento de SlTB correspondiente al dominio proteasa o región comprendida entre los aminoácidos 692 y 1272 ($\text{SlTB}^{\text{Prot}}$). Análisis fenotípico de las cepas MAD3711 y MAD3710 portadoras de los alelos que expresan a las proteínas truncadas y etiquetadas indicadas. Este test se realizó como se describe en la leyenda de la figura R3.1. B) Inmunodetección de las formas etiquetadas de SlTB los extractos obtenidos de las estirpes MAD3710 y MAD3711, utilizando los anticuerpos indicados en la imagen (izda.). Se indica la movilidad y los pesos moleculares de las proteínas correspondientes al marcador de peso molecular utilizado (kDa). Detección de la forma SlTA predominante en el fondo genético $\text{SlTB}^{\text{Prot}}$. Se detectó únicamente la forma $\text{SlTA}^{78\text{kDa}}$ en extractos proteicos de la cepa MAD3750. (Siguiente página) C) Se muestra la estrategia seguida para etiquetar a la proteína mutante SlTB53 en su extremo C-terminal con GFP (izda.), y a la dcha. el análisis fenotípico correspondiente. D) Western- blots mostrando la ausencia de proteólisis de $\text{SlTA}^{78\text{kDa}}$ en el fondo genético *sltB53*, cepa MAD3933, imagen de la izquierda, y la ausencia de proteólisis de $\text{SlTB53}::\text{GFP}$, cepa MAD4013. Las formas etiquetadas de SlTA fueron visualizadas utilizando el anticuerpo $\alpha\text{-HA}$, y las de SlTB utilizando el anticuerpo $\alpha\text{-GFP}$.



Con los resultados obtenidos del estudio del mutante SltB56 ya habíamos descartado a SltB como la proteasa de SltA. Para comprender el papel del dominio proteasa de SltB fue determinante el estudio de la mutación *sltB53*. Al igual que la mutación *sltB56*, ésta fue seleccionada como supresora del fenotipo deletéreo del mutante $\Delta vps20$. Dicha mutación resulta en la deleción del triplete de nucleótidos TCT después de la posición 3376 en la secuencia genómica. Este cambio en la secuencia ocasiona la pérdida de la fenilalanina en posición 1126 ($\Delta F1126$). Esta fenilalanina se localiza en la región correspondiente al dominio definido como proteasa. El fenotipo mostrado por la cepa que portaba esta mutación, una vez eliminado el alelo mutante $\Delta vps20$, era comparable al de un mutante nulo $\Delta sltB$ (Fig. R3.7, panel C, dcha.).

Puesto que la mutación *sltB53* daba lugar a un fenotipo de pérdida de función total Slt, supusimos que la proteólisis de SltA debería estar afectada en la misma manera que en un mutante $\Delta sltB$. Para verificar esta hipótesis se construyó una cepa que expresaba la forma de SltA etiquetada con el epítipo HA en el fondo mutante *sltB53* (MAD4487). Efectivamente, sólo

se detectó la forma SltA^{78kDa} en extractos proteicos de la cepa MAD4487 (Fig. R3.7, panel D, izda.).

Seguidamente, quisimos determinar cuál era el efecto de la mutación *sltB53* sobre la propia proteína SltB. Con este objetivo, generamos una cepa que expresaba la quimera SltB53::GFP. Para ello, se extrajo DNA genómico de la cepa MAD3766 y se utilizó para amplificar el fragmento con la mutación *sltB53*. Una vez obtenido el casete de DNA correspondiente, se transformó en la cepa MAD3766 (ver Materiales y Métodos). Tras seguir el protocolo habitual de generación de cepas del laboratorio, seleccionamos a la cepa MAD4013 para realizar los siguientes experimentos.

Los extractos obtenidos de la cepa MAD4013 fueron analizados mediante *Western-blot* (Fig. R3.7, panel D, dcha.). Detectamos una única banda cuya movilidad electroforética correspondía a un peso molecular de aproximadamente 250 kDa. Esta migración era la correspondiente a la forma completa o nativa de SltB, y que ya habíamos detectado minoritariamente en los extractos proteicos de la cepa que expresaba a SltB::GFP cuando se aumentó el tiempo de exposición del *Western-blot*. Sin embargo los niveles detectados de la forma SltB53::GFP eran menores que los de SltB::GFP, lo que sugería que esta forma de SltB no se estaba acumulando en la célula a pesar de no estar sometida a proteólisis. El resultado obtenido demostró que el residuo de fenilalanina 1126 es esencial en el truncamiento de SltB y sugirió la existencia de un proceso de auto-proteólisis de SltB en el que participaría este dominio proteasa. Por otro lado, estos resultados también muestran que el proceso proteolítico de SltB parece ser un paso previo al de SltA dado que la sola presencia de la forma completa de SltB no induce la proteólisis de SltA.

Para seguir profundizando en el conocimiento del sistema Slt, dirigimos nuestro estudio hacia la proteólisis de SltB. Con este objetivo, generamos una cepa diploide que expresara la quimera SltB53::GFP junto con la proteína silvestre SltB. Si el dominio proteasa pudiese tener actividad en *trans*, o intermolecular, la proteína SltB podría reconocer en la secuencia de SltB53 su diana de corte y proteolizarla, de manera que se liberasen los dos dominios de igual manera que en la proteína silvestre.

Para generar esta cepa diploide se fusionaron protoplastos de las estirpes MAD4013 y MAD2743, seleccionando aquellas colonias que crecieron sobre el medio de regeneración selectivo (ver Materiales y Métodos, apartado 4.2, y Fig. R3.8, panel A). Al realizar los test de crecimiento en medio con estrés salino y en alcalinidad con varios de los diploides obtenidos (MAD4519 y MAD4520), se observó un crecimiento colonial similar al de la cepa silvestre (Fig. R3.8, panel B, líneas 3 y 4). Es interesante resaltar que este resultado demostraba que el

fenotipo causado por la proteína SltB53 era recesivo. Para determinar si existe proteólisis de SltB53 en presencia de una forma silvestre SltB, se realizó una extracción de proteína total a partir del micelio de los diploides MAD4519 y MAD4520 y se comparó con los extractos proteicos de las cepas MAD2743 y MAD4013. En ambos diploides se detectó una banda con una migración correspondiente a la quimera SltB53::GFP (Fig. R3.8, panel C, carriles 5 y 6). En otro ensayo de *Western-blot* se aumentó el tiempo de la inmunodetección y se visualizó una banda con una movilidad que podría corresponder al dominio proteasa, resultado de la posible actividad intermolecular de SltB (Fig. R3.8, panel C, dcha.). De ser así, estos niveles de proteína serían residuales comparados con la forma no proteolizada detectada que es claramente mayoritaria.

También se estudió si el dominio SltB^{Prot} podría proteolizar la proteína mutante SltB53. Para ello se generó una cepa diploide que expresaba las proteínas SltB^{Prot}::_{3x}Myc y SltB53::GFP. Para su obtención se fusionaron protoplastos de las cepas MAD3710 y MAD4013, seleccionando aquellas colonias que crecieron sobre el medio de regeneración selectivo (ver Materiales y Métodos y Fig. R3.8, panel A). Con varios de los diploides obtenidos (entre ellos, MAD4510 y MAD4511) se realizaron test de crecimiento en placa en condiciones de estrés catiónico y alcalinidad (Fig. R3.8, panel B, líneas 5 y 6). En este caso, el fenotipo que mostraron fue idéntico al de la cepa Δ *sltB*, lo que sugería que el dominio pseudoquinasa de la forma SltB53 no estaba siendo liberado por una actividad proteolítica derivada de SltB^{Prot}::_{3x}Myc. De acuerdo con esta hipótesis en los extractos proteicos del diploide SltB^{Prot}::_{3x}Myc; SltB53::GFP se detectó una única banda cuya movilidad correspondía a la proteína SltB53::GFP (Fig. R3.8, panel C, carriles 3 y 4). Este resultado explicaba la ausencia de función SltB que mostraba el diploide.

El conjunto de los resultados obtenidos nos permitió concluir que la forma mutante SltB53 está bloqueada en su proteólisis, y aparentemente una proteína silvestre SltB no puede actuar sobre ella. Esto podría deberse a un determinado estado conformacional de la proteína SltB53 o bien porque la proteólisis de SltB sólo tenga lugar en *cis*, es decir intramolecularmente (ver Discusión). La ausencia de proteólisis en el segundo diploide podría explicarse de la misma manera, añadiendo a su vez la posibilidad de que la forma SltB^{Prot} generada no contenga todos los elementos necesarios para su función.

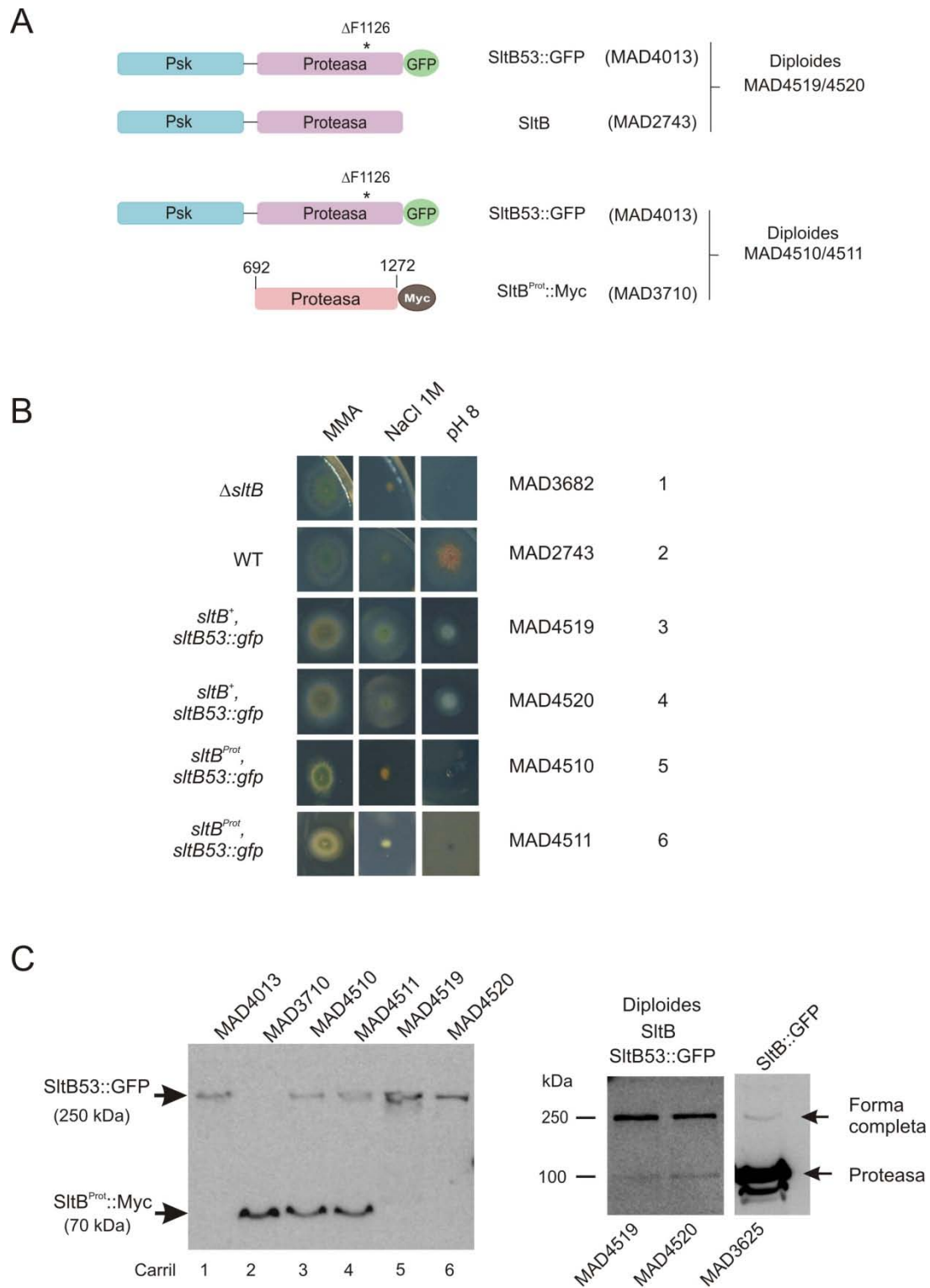


Fig. R3.8. Estudio de la actividad proteasa *cis-trans* de SlitB mediante la generación de cepas diploides. A) Análisis funcional de los diploides obtenidos. Las conidiosporas fueron inoculadas en MMA y MMA con NaCl 1 M y pH alcalino (pH 8). Los cultivos se realizaron como se detalla en la leyenda de la figura R3.1. B) Representación esquematizada de las proteínas que expresan cada uno de los dos tipos de diploides generados. En la parte inferior, se muestra la inmunodetección de las diferentes formas etiquetadas de SlitB en cada uno de los diploides generados. En la parte inferior derecha se muestra una sobreexposición del revelado de la membrana que contenía extractos proteicos de los diploides MAD4519/4520. En esta imagen se observa una banda con la movilidad que correspondería a la parte C-terminal de SlitB tras la proteólisis de la forma completa (la interpretación de cada banda detectada se explica en el texto).

3.5 Estudio de la triada catalítica de SltB

El análisis *in silico* del dominio proteasa sugería que pertenecía a la familia de las tripsinas y había propuesto a los residuos de histidina 1033 y serina 1142 como los candidatos para formar parte del centro catalítico del dominio proteasa de SltB (Capítulo 2). Para verificar esta hipótesis se generaron cepas que expresaban formas de SltB con mutaciones en estos residuos.

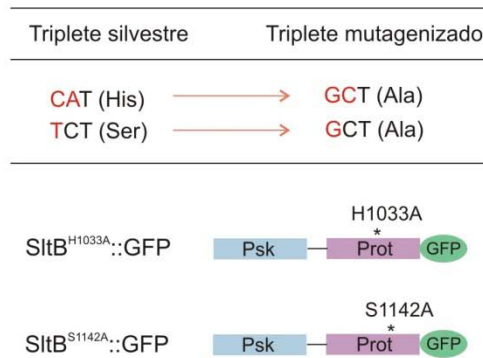
Mediante un proceso de mutagénesis dirigida *in vitro*, sobre la secuencia genómica de *sltB* (ver Materiales y Métodos, apartado 5.2), se generaron casetes de DNA con cambios en los tripletes que codifican para la histidina 1033 y para la serina 1142, de manera que fueran reemplazados por residuos de alanina en ambos casos. Una vez originados los cambios nucleotídicos correspondientes, se procedió a fusionar cada uno de los dos fragmentos mutados del gen *sltB* con el gen *gfp*, para obtener la correspondiente quimera (Fig. R3.9, panel A). Se utilizó la cepa MAD3652 como receptora del casete de transformación en ambos casos, para determinar el efecto de estas mutaciones sobre la proteólisis de la forma SltA etiquetada con HA. Tras seguir el proceso habitual de obtención de cepas, se seleccionaron las estirpes MAD4731 (SltB^{H1033A}::GFP) y MAD4760 (SltB^{S1142A}::GFP) para ser estudiadas.

Se estableció la funcionalidad de cada una de las quimeras generadas mediante el análisis del fenotipo que mostraban las cepas correspondientes en condiciones de estrés salino y alcalinidad. Se comparó el crecimiento colonial de cada una de ellas con los de las cepas silvestre y nula *sltB* (Fig. R3.9, panel B). La cepa que expresaba la quimera SltB^{H1033A}::GFP mostró un fenotipo de tolerancia a las sales NaCl 1 M, MgCl₂ 0,2 M y KCl 0,6 M similar al de la cepa silvestre. Sin embargo mostró un fenotipo de sensibilidad a alto niveles de litio, LiCl 0,3 M, y a la alcalinización del medio, con un crecimiento de la colonia prácticamente similar al de la cepa Δ *sltB*. La cepa que expresaba la quimera SltB^{S1142A}::GFP mostró un fenotipo de sensibilidad, a las diferentes sales ensayadas y a la alcalinidad del medio, idéntico al de la cepa nula *sltB*.

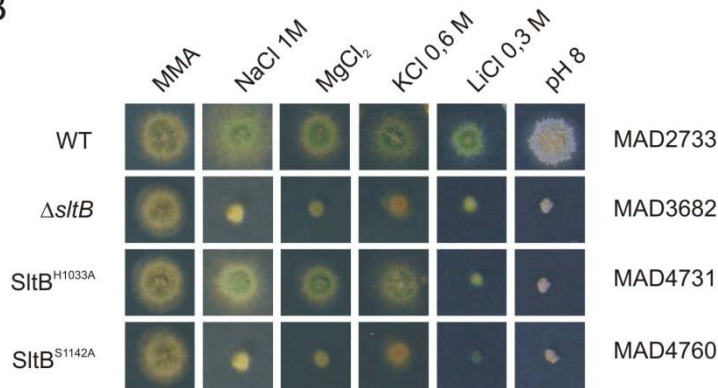
A continuación, se extrajo proteína total del micelio de las anteriores cepas por lisis alcalina y en primer lugar se procedió a detectar a SltA, con el objetivo de estudiar el efecto de las diferentes mutaciones generadas sobre la proteólisis de este factor transcripcional (Fig. R3.9, paneles C). En los extractos correspondientes al mutante *sltB*^{H1033A} se pudo observar proteólisis de SltA, pero la cantidad de forma truncada estaba por debajo de los niveles observados en la cepa silvestre. Un nuevo ensayo de *Western-blot*, Fig. R3.9, panel D, mostró que los niveles de SltA hallados en este fondo mutante y en el de *sltB56* eran similares (en el conjunto de sus tres formas), lo cual es coherente con la funcionalidad descrita para cada caso

en particular. Este resultado además sugería que en el fondo mutante *sltB56* la cantidad de $\text{SlA}^{78\text{kDa}}$ proteolizada es mayor que en el fondo $\text{SlB}^{\text{H1033A}}::\text{GFP}$. En los extractos correspondientes a la cepa mutante *sltB*^{S1142A} se detectó una única banda con una movilidad electroforética que correspondía a la forma de $\text{SlA}^{78\text{kDa}}$.

A



B



C

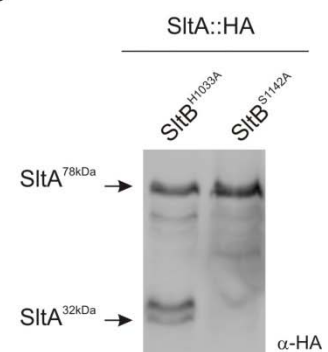
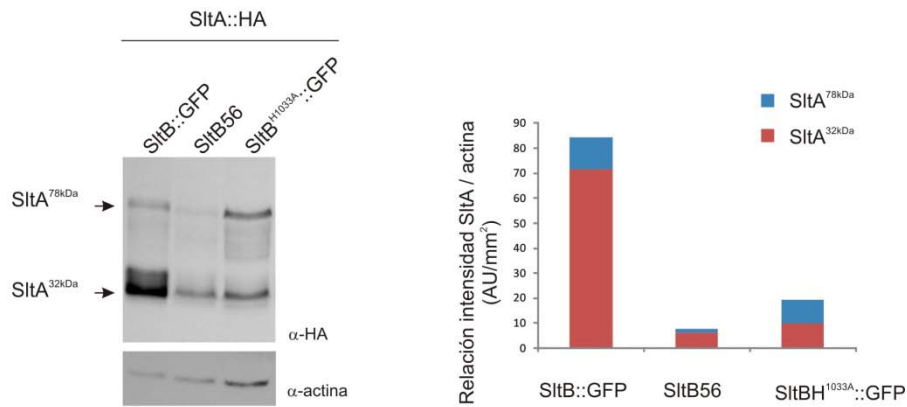
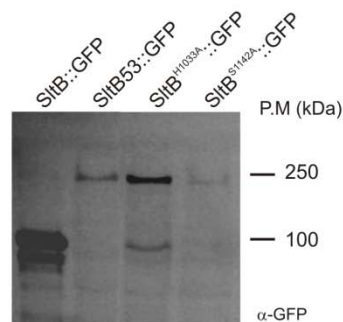


Fig. R3.9. Mutagénesis dirigida sobre residuos catalíticos del centro activo de *SlB*. A) Representación esquemática de las formas mutagenizadas y etiquetadas de *SlB*. B) Test de crecimiento realizado con las cepas que portan los alelos modificados de *sltB* para dar lugar a los cambios aminoacídicos indicados en el panel A. Las esporas de cada cepa fueron inoculadas sobre MMA y MMA conteniendo NaCl 1 M, MgCl₂ 0,2 M, KCl 0,6 M, LiCl 0,3 M y 100 mM de Na₂HPO₄ (pH 8). C) Análisis por *Western-blot* del efecto de las mutaciones generadas en *SlB* en la proteólisis de *SlA*. (Siguiente página) D) Comparación de los niveles de proteína *SlA* detectados en el fondo mutante *sltB*^{H1033A} y *sltB56*, puesto que ambos permiten una función parcial de la proteína. Los niveles de proteína fueron calculados mediante el empleo del software MultiGauge, de la misma manera que se describe en la figura R3.7. E) *Western-blots* que muestran como los cambios aminoacídicos introducidos en la secuencia de *SlB* repercuten en su propia proteólisis. En las formas mutantes se detecta preferentemente la forma completa de la proteína.

D



E



En segundo lugar se procedió a detectar las quimeras generadas con las formas mutantes de SltB (Fig. R3.9, panel E). En los extractos correspondientes a la cepa mutante *sltB^{H1033A}*, se detectó una banda mayoritaria que migraba a la distancia correspondiente para un peso molecular de 250 kDa, es decir la forma no proteolizada de SltB. También se observó, con muy baja intensidad, una banda correspondiente al tamaño de la forma proteolizada carboxilo terminal de SltB. Los niveles detectados de esta forma proteasa SltB^{H1033A} eran muy bajos comparado con los detectados con un dominio proteasa silvestre etiquetado, sin embargo son suficientes para producir el corte proteolítico de SltA. En el caso de los extractos correspondientes a la cepa mutante *sltB^{S1142A}*, se detectó una única banda correspondiente a la forma sin proteolizar de SltB.

Los datos obtenidos a partir de las diferentes inmunodetecciones realizadas y del análisis del fenotipo mostrado por estas cepas mutantes en condiciones de estrés catiónico y alcalinidad, están de acuerdo con que los residuos S1142 y H1033 formen parte del centro catalítico de un dominio proteasa funcional, definiéndola como una serina proteasa.

3.6 Generación de un alelo mutante de SltA que mimetiza la forma de 32 kDa

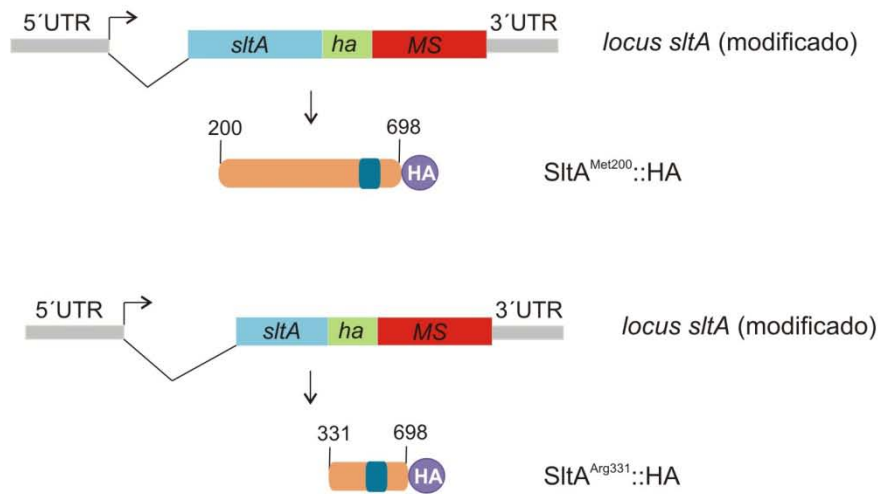
Nuestro siguiente objetivo fue generar un alelo mutante de SltA que mimetizase la forma de 32 kDa para determinar si la mera expresión de esta forma truncada proporcionaba la función requerida de este factor transcripcional para mediar en la tolerancia a los diferentes estreses analizados.

Para ello buscamos en la secuencia peptídica de SltA la posible diana o región donde ocurre el corte proteolítico. Basándonos en el análisis de la movilidad electroforética de las bandas detectadas en *Western-blot* procedentes del truncamiento de la quimera SltA::_{3x}HA y en los alineamientos realizados con las secuencias de los ortólogos de SltA, localizamos una zona conservada entre los aminoácidos 267 y 321. Así, decidimos generar una cepa que expresara una forma truncada y etiquetada de SltA a partir de la metionina 200 (corriente arriba de la hipotética zona de corte), y otra que lo hiciera a partir de la arginina 331 (por debajo de la hipotética zona de corte).

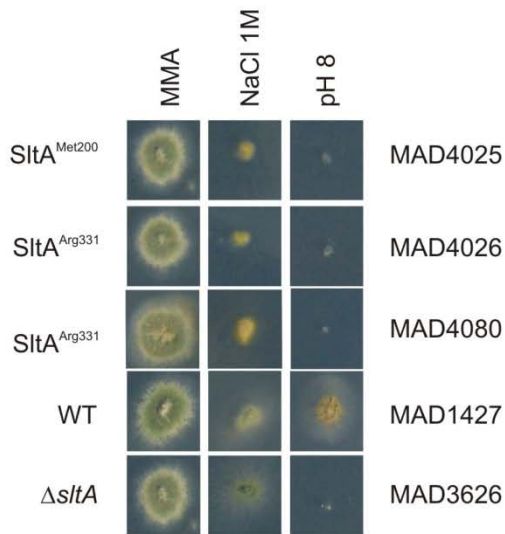
Los diferentes casetes de DNA para generar estas quimeras se obtuvieron mediante PCR de fusión como se detalla en los Materiales y Métodos, apartado 5.1. El fragmento correspondiente a la menor delección de la región amino terminal (*sltA^{Met200}*), se obtuvo amplificando la zona correspondiente en la secuencia nucleotídica a partir de gDNA de una cepa silvestre y se fusionó al fragmento *_{3x}ha::pyrG^{Af}*. Para generar la quimera SltA^{Arg331}::_{3x}HA se procedió de la misma manera que en el caso anterior, excepto por la adición del triplete de nucleótidos ATG al comienzo de la misma para permitir el inicio de la traducción. Se utilizó la cepa Δ *sltA* MAD3919 como receptora de los dos casetes para poder reemplazar la secuencia nucleotídica de *sltA* que corresponde a la región comprendida entre los aminoácidos indicados (Fig. R3.10, panel A).

Tras la transformación se obtuvo un número de transformantes muy bajo, lo que contrastaba con la alta eficiencia de transformación habitual utilizando cepas Δ *nkuA*. Con el objetivo de obtener un mayor número de transformantes para ser analizados, el proceso de transformación se repitió varias veces, pero en todas las ocasiones se repitió este fenómeno. De todos los transformantes obtenidos se extrajo gDNA para comprobar la correcta integración en el *locus* mediante *Southern-blot* y PCR diagnóstica. La detección de numerosas bandas de hibridación con la sonda radioactiva sugirió la existencia de diferentes tipos de reorganización del *locus* *sltA* en cada transformante. Finalmente, de entre todos los transformantes analizados sólo se seleccionaron tres con la inserción, aparentemente correcta, de los casetes de transformación, de estos uno debería expresar la forma truncada SltA^{Met200}::_{3x}HA (MAD4025) y dos la forma SltA^{Arg331}::_{3x}HA (MAD4026 y MAD4080).

A



B



C

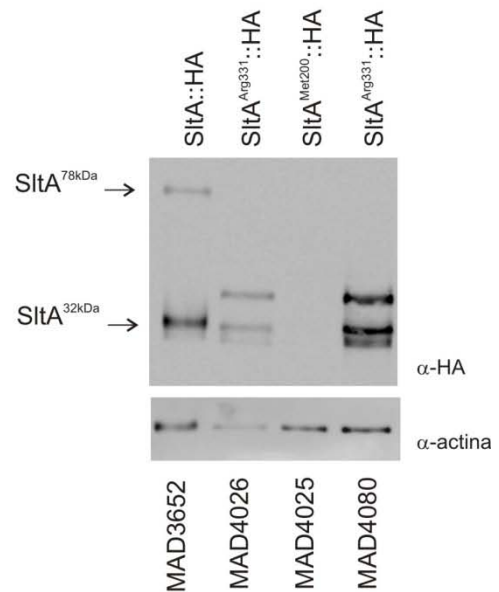


Fig. R3.10. Obtención de cepas que expresan formas de SltA que incluyen el dominio de unión a DNA. A) Nuevos alelos mutantes en *sltA* generados mediante reemplazamiento génico. Se ilustra cada uno de los elementos introducidos en el locus *sltA* así como la representación esquemática de la proteína de fusión truncada de SltA que generan. B) Análisis fenotípico de las cepas que expresan los alelos que dan lugar a las dos versiones truncadas de SltA. El test de crecimiento se realizó en MMA y MMA con NaCl 1 M y pH alcalino (pH 8), y las imágenes fueron tomadas como se describe en la figura R3.1. C) Estudio por *Western-blot* de las formas truncadas de SltA, iniciadas desde el aminoácido 200 ó 331, y expresadas por las cepas que se indican en la parte inferior de la imagen. Las formas SltA fueron detectadas utilizando el anticuerpo α -HA. Se utilizó el nivel de actina como control de cantidad de carga de extracto proteico.

Dado que estos resultados sugerían que la expresión de estas formas podría estar causando un efecto perjudicial en la célula, se decidió secuenciar el *locus sltA* en las tres cepas objeto de estudio para comprobar la integridad de la construcción insertada. Se encontró que en la secuencia genómica de la cepa que expresaba la quimera $SlA^{Met200}::_{3x}HA$ había ocurrido una delección del nucleótido timina correspondiente al triplete de la metionina inicial. El siguiente ATG encontrado en la secuencia daba lugar a una pauta de lectura con un codón Stop prematuro.

Al analizar las secuencias genómicas de los dos transformantes que habrían de expresar la quimera $SlA^{Arg331}::_{3x}HA$, también se encontraron mutaciones en ellas. En el caso de la cepa MAD4026 la mutación encontrada se localizaba en el dominio de unión a DNA, en la zona correspondiente al segundo dedo de zinc (G1396T). Este cambio conduce a una sustitución del aspártico en la posición 466 por tirosina (D466Y). El análisis de secuencia llevado a cabo para la cepa MAD4081 indicó un cambio nucleotídico en la posición 1415, de citosina a timina (C1415T). El efecto en la secuencia peptídica es una sustitución de la prolina 472 por una leucina, localizada en la secuencia que conecta los dedos de zinc 2 y 3.

A continuación se evaluó la función de cada una de las dos formas mutantes generadas, mediante el análisis fenotípico en diferentes condiciones de estrés. Se observó que las tres estirpes a analizar mostraban un crecimiento colonial similar al de una cepa $\Delta sltA$, en cualquiera de las condiciones ensayadas (Fig. R3.10, panel B). Una posible interpretación de la selección de estas mutaciones podría estar relacionada con una ganancia de función que diera lugar a una proteína inactiva, de manera que se evitase su efecto deletéreo en la célula.

Seguidamente, se procedió a extraer proteína del micelio de las tres cepas indicadas para llevar a cabo la inmunodetección de las quimeras (Fig. R3.10, panel C). En el extracto proteico correspondiente a la cepa MAD4025 que expresaba el alelo mutante $sltA^{Met200}$ no se detectó ninguna banda correspondiente a la quimera $SlA^{Met200}::_{3x}HA$. Este resultado es coherente con la mutación adicional encontrada en la secuencia genómica de esta cepa. En el caso de los extractos correspondientes a las cepas que expresaban los alelos doblemente mutantes $sltA^{Arg331}$, se detectó una banda con una movilidad correspondiente al peso molecular de la quimera $SlA^{Arg331}::_{3x}HA$ (~ 48 kDa). Además, se detectó el patrón de doble banda característico de las formas SlA^{32kDa} etiquetadas con HA, lo que nos indicaba que la secuencia de corte de *SlA* debía estar más cerca del dominio de unión a DNA de lo que habíamos hipotetizado.

3.7 Expresión condicional de formas truncadas SltA^{32kDa}

Debido a los problemas encontrados al realizar los truncamientos de las regiones amino terminales a los dedos de zinc, generamos cepas donde la expresión de *sltA* estuviese regulada. Así, utilizamos el promotor regulable de la tiamina, *thiA*, para expresar de forma controlada a SltA^{32kDa}::_{3x}HA.

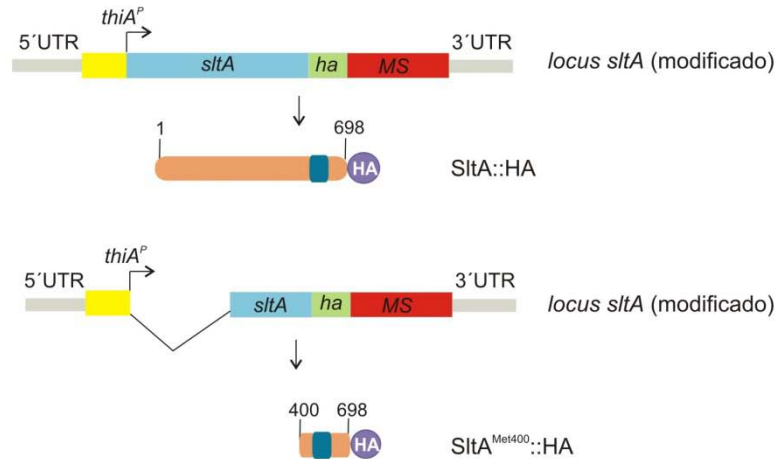
Puesto que al expresar la forma truncada y etiquetada SltA^{Arg331}::_{3x}HA se seguía produciendo un corte proteolítico en ella, se generó una nueva cepa que portaría una delección más amplia del alelo *sltA*. Este nuevo alelo expresaría una forma de SltA a partir de la metionina 400 y su expresión estaría regulada por tiamina, a este alelo se le denominó *thiA^p::sltA^{Met400}::_{3x}ha*. De esta manera, al añadir tiamina al medio de regeneración estaríamos reprimiendo la expresión de esta forma truncada de *sltA* y minimizando su posible efecto deletéreo.

La estrategia llevada a cabo para la construcción de este alelo mutante se basó nuevamente en el reemplazamiento del *locus sltA* con un casete de transformación generado mediante PCR de fusión. También se generó, como control, una cepa que expresaba de manera regulada a la proteína completa SltA::_{3x}HA (Fig. R3.11, panel A). La estirpe receptora de ambos casetes de DNA fue la cepa Δ *sltA* MAD3919 (Materiales y Métodos). Siguiendo esta nueva estrategia, se obtuvieron muchos transformantes en las placas de regeneración en ambas transformaciones, que fueron viables en homocariosis. Para comprobar que la expresión de las quimeras generadas era condicional a la presencia o ausencia de tiamina en el medio, así como su funcionalidad, se prepararon placas de medio mínimo con NaCl 1 M, LiCl 0,3 M y con un pH alcalino suplementadas con tiamina.

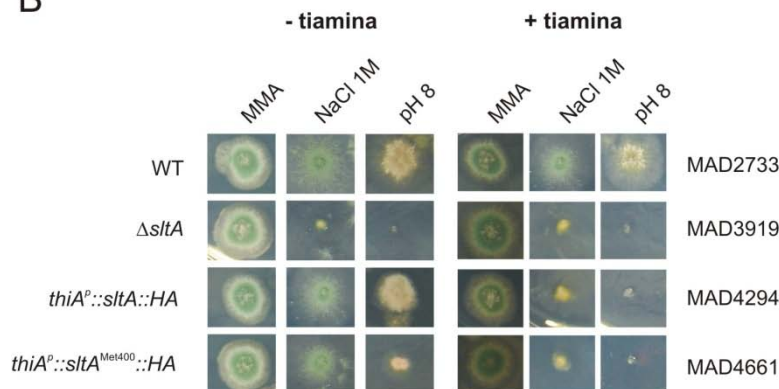
En el panel B de la figura R3.11 se muestra el crecimiento colonial comparado de los transformantes seleccionados MAD4294 y MAD4661, con el de la cepa nula *sltA* (MAD3919) y con la cepa silvestre MAD2733. Cuando el medio de cultivo se suplementó con tiamina, el fenotipo que mostraban estas cepas fue idéntico al mostrado por la cepa Δ *sltA* lo que evidenciaba que el promotor *thiA* había sido reprimido y se impidió la expresión de las quimeras SltA::_{3x}HA y SltA^{Met400}::_{3x}HA. En las placas con medio sin tiamina, todas las cepas crecieron sobre el medio con estrés. Señalar que, sobre medio alcalino, el diámetro de la colonia de la cepa que expresaba la forma SltA^{Met400}::_{3x}HA se vio reducido respecto al de la cepa silvestre. Este resultado sugiere una funcionalidad parcial de la proteína generada en estas condiciones de ensayo. Antes de continuar el trabajo con estas cepas *thiA^p::sltA^{Met400}* se verificó la correcta inserción de los casetes de transformación y de la secuencia codificante del nuevo alelo SltA mediante *Southern-blot* y secuenciación del *locus sltA*, en dos de los

transformantes obtenidos que expresaban la quimera $SltA^{Met400::3xHA}$. Así se confirmó la ausencia de mutaciones en la totalidad de la secuencia de estas construcciones integradas en el locus *sltA*.

A



B



C

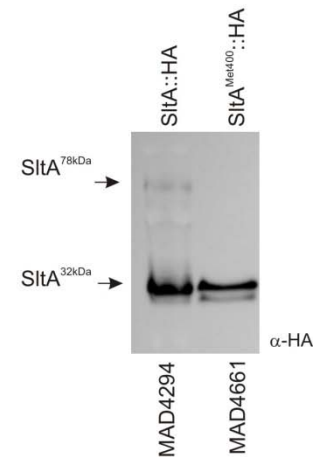


Fig. R3.11. La expresión condicional de una forma truncada $SltA^{32kDa}$ permite su funcionalidad. A) Representación gráfica de los nuevos *loci sltA* mutantes generados mediante reemplazamiento génico. *thiA^P* indica el promotor del gen *thiA*. MS indica marcador de selección. Debajo de cada nuevo *locus* se representa la proteína codificada en cada caso, arriba la forma completa de SltA y debajo la forma truncada $SltA^{Met400}$, ambas etiquetadas con HA. B) Análisis de la tolerancia de las estirpes MAD4294 y MAD4661 al estrés causado por NaCl 1 M y pH alcalino (pH 8), tanto en presencia como en ausencia de tiamina (100 μ M), condiciones de represión o desrepresión del promotor *thiA*, respectivamente. Las cepas fueron cultivadas y las imágenes tomadas como se indica en la leyenda de la figura R3.1. C) Detección de formas SltA presentes en los extractos proteicos obtenidos del micelio de las cepas MAD4294 y MAD4661 crecidos en MMA sin tiamina.

A continuación se procedió a estudiar la expresión y movilidad electroforética de la proteína $SltA^{Met400}::3xHA$ expresada en la cepa MAD4661. Como control se estudió a la cepa MAD4294 que expresa una versión completa de $SltA::3xHA$. Se procedió a la extracción de proteína total a partir del micelio de las cepas MAD4661 y MAD4294, cultivado en MMA

líquido sin tiamina, para permitir la expresión de la quimera. Respecto al extracto de la cepa MAD4294, En el extracto proteico de la cepa MAD4294 se detectaron las bandas correspondientes a SltA^{78kDa} y SltA^{32kDa} (Fig. R3.11, panel C). En el carril correspondiente al extracto de la cepa MAD4661, se detectó solamente las dos bandas cuya movilidad electroforética se identifica con las formas SltA^{32kDa}, y que corresponden, aproximadamente, al peso molecular teórico esperado (~38,4 kDa).

El conjunto de resultados obtenidos permite concluir que la proteína truncada SltA^{Met400} es parcialmente funcional y su movilidad electroforética coincide con la forma SltA^{32kDa} apareciendo, además, en sus dos formas características.

3.8 Estudio de la relación funcional entre SltA^{32 kDa} y SltB

Habiendo demostrado que la expresión de los últimos 298 aminoácidos de SltA eran suficientes para tener una función parcial de SltA, quisimos estudiar cómo afectaba la ausencia de la forma SltA^{78kDa} a la expresión del gen *sltB* y si SltA^{32kDa} también participaba en la regulación de la expresión de *sltB*.

Para ello, se construyó una cepa que expresaba la fusión SltB::GFP en el fondo genético *thiA^P::sltA^{Met400}::_{3x}ha* mediante la transformación de la cepa MAD4661 con el casete de DNA generado previamente para etiquetar a SltB en su extremo carboxilo terminal con GFP (Apartado 3.1 de Resultados). Señalar que, durante el proceso de obtención y selección de transformantes, tanto al medio mínimo líquido de cultivo como al medio de regeneración se le añadió tiamina 100 μ M para mantener reprimida la expresión de este alelo mutante de *sltA*. Se obtuvieron transformantes viables en homocariosis de entre los que se seleccionó y verificó la cepa MAD4733 para realizar los siguientes experimentos.

El crecimiento colonial de la cepa MAD4733 se analizó sobre medio mínimo alcalino o suplementado con NaCl 1 M o LiCl 0,3 M (Fig. R3.12, panel A, líneas 1-5) y se comparó con el de las cepas silvestre MAD2733, nula *sltA* (MAD3919), la que expresaba la quimera SltA::_{3x}HA bajo el promotor de la tiamina (MAD4294) y con el de la estirpe que expresaba la quimera truncada SltA^{Met400}::_{3x}HA regulada también por tiamina (MAD4661). Sobre el medio con estrés que además contenía tiamina, sólo creció la cepa silvestre como era esperado. En condiciones de estrés y sin tiamina, el crecimiento colonial de la cepa silvestre y de la MAD4294 fue similar, así como también fue comparable, especialmente a pH alcalino, los de las estirpes MAD4661 y MAD4733.

Seguidamente se procedió a analizar la expresión de la quimera SltB::GFP extrayendo proteína total del micelio de la cepa MAD4733 y, como control, también del micelio de la cepa

MAD3751 que expresa simultáneamente las proteínas etiquetadas *SltA*::_{3x}HA y *SltB*::GFP. En el *Western-blot* que se muestra en la (Fig. R3.12, panel B) se identifica una banda en cada extracto proteico con una movilidad electroforética de ~100 kDa, correspondiente al dominio carboxilo terminal de *SltB*::GFP. Comparado con los niveles de actina, los niveles de proteína *SltB* truncada hallados en el fondo mutante *thiA^P::sltA^{Met400}::_{3x}ha* fueron menores a los detectados en los extractos de la cepa control *sltA*::_{3x}ha y puede que sean responsables de la menor tolerancia de la cepa MAD4733 al estrés alcalino. Este resultado contrasta con la ausencia de expresión de *sltB* en el fondo nulo *sltA* (apartado 3.2 de Resultados), por tanto, se concluye que la forma truncada de *SltA*^{Met400} es suficiente para expresar el gen *sltB*.

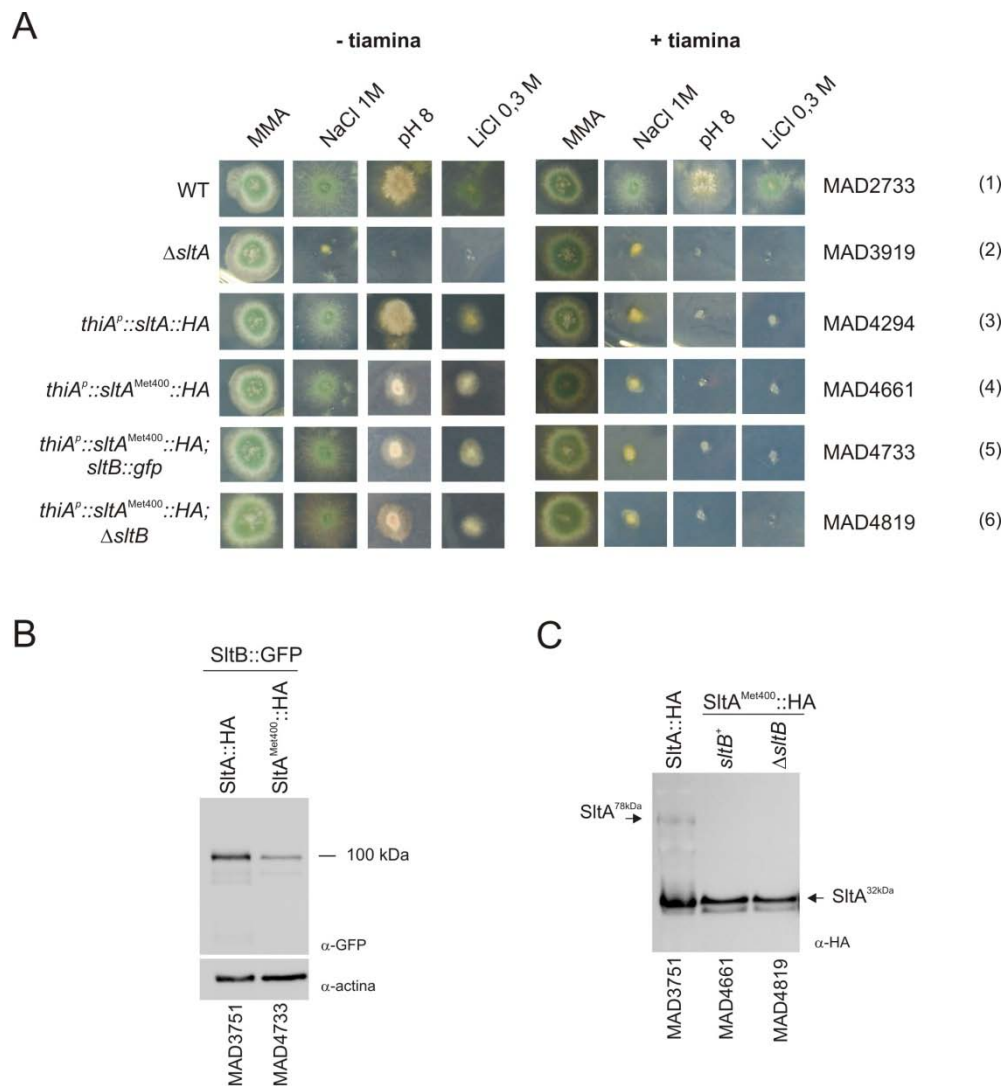


Fig. R3.12. Relación funcional entre *SltA*^{32kDa} y *SltB*. A) Test de crecimiento realizado con las estirpes MAD4733 y MAD4819 en condiciones de estrés salino y alcalinidad, tanto en condiciones permisivas como restrictivas de la expresión de *SltA*^{32kDa}::HA. B) Niveles de expresión de *SltB* en el fondo mutante *SltA*^{32kDa}::HA. Inmunodetección de la proteína *SltB*::GFP en extractos proteicos de la cepa MAD4733 cultivada en MMA sin tiamina. Como control de carga de extracto proteico se utilizó el nivel de actina. C) *Western-blot* realizado con extractos proteicos procedentes del micelio de las cepas MAD4733 y MAD4819, y donde se detectó a *SltA*^{32kDa}::HA.

Seguidamente determinamos si la expresión de SltA^{32kDa} tenía un efecto epistático frente a la ausencia de SltB puesto que según el modelo de trabajo, Fig. R3.4, la actividad de SltB se requiere para que ocurra la proteólisis de SltA a la forma SltA^{32kDa}. Con este objetivo se generó una cepa doble mutante $\Delta sltB; thiA^P::sltA^{Met400}::_{3x}ha$ utilizando la cepa MAD4661 como receptora del casete de delección de *sltB*, y manteniendo una concentración de 100 μ M de tiamina tanto en el medio mínimo de cultivo líquido como en el medio de regeneración. Se obtuvieron muchos transformantes en las placas de regeneración, los cuales fueron viables en homocariosis. Tras comprobar de la forma habitual la correcta integración del casete de transformación en el *locus sltB*, se seleccionó la estirpe MAD4819 para realizar el estudio indicado.

El crecimiento colonial de la cepa MAD4819 fue idéntico al de la cepa que expresaba la forma SltA^{Met400} en un fondo *sltB*⁺ (Fig. R3.12, panel A, línea 6). Este resultado estaba de acuerdo con el modelo de señalización de SltA y ponía de manifiesto la funcionalidad de la forma truncada SltA^{Met400} en ausencia de SltB. Para verificar que los niveles de proteína truncada SltA^{Met400}::_{3x}HA eran independientes de la función SltB se extrajo proteína total del micelio de las cepas MAD4661 y MAD4819. Como se aprecia en el panel C de la figura R3.12, se detectó el mismo nivel de proteína y patrón de doble banda correspondiente a la forma SltA^{32kDa}, tanto en un fondo *sltB*⁺ como en uno *sltB*⁻.

Estos análisis muestran que SltA debe ser el efector final de la ruta Slt, que la modificación postraducciona que ocurre en SltA^{32kDa} no es dependiente de SltB y que la actividad primaria de esta proteína bifuncional parece quedar restringida exclusivamente a nivel de la proteólisis de SltA.

Resultados: Capítulo 4
La señalización del sistema Slt en
respuesta al estrés

4.1 Efecto del estrés por cationes y de la alcalinización en la señalización de las proteínas SltA y SltB.

El siguiente paso en el conocimiento de la ruta Slt fue dirigido hacia el estudio del mecanismo de activación y señalización del factor transcripcional SltA. Por ello, decidimos estudiar los posibles cambios postransduccionales que ocurriesen en las proteínas SltA y SltB cuando el micelio fuese cultivado en diferentes condiciones de estrés osmótico y de pH.

Para este trabajo se utilizaron cepas que expresaban las quimeras SltA::_{3x}HA (MAD3652) y SltB::_{3x}Myc (MAD3734), en medio mínimo líquido suplementado con las siguientes sales de forma independiente: KCl 0,6 M, MgCl₂ 0,2 M y NaCl 1 M. También se varió el pH del medio ajustándolo a un valor de 8. El micelio fue recolectado tras 16 h de incubación a 37 °C para proceder a obtener los extractos proteicos y ser analizados por *Western-blot*. La inmunodetección realizada con el anticuerpo α -HA nos permitió visualizar las bandas correspondientes a SltA^{78kDa} y las dos formas SltA^{32kDa}, características de este factor, en todas las condiciones de estrés ensayadas (Fig. R4.1, panel A).

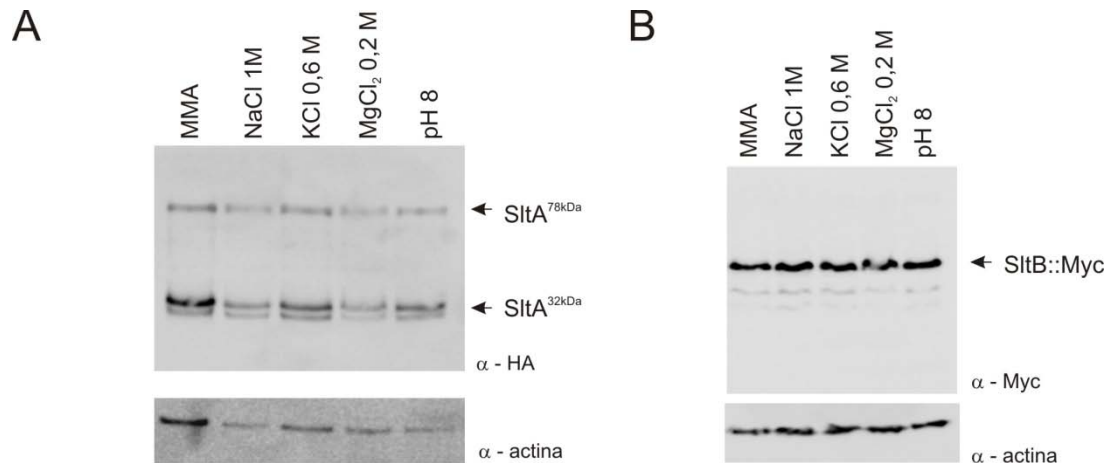
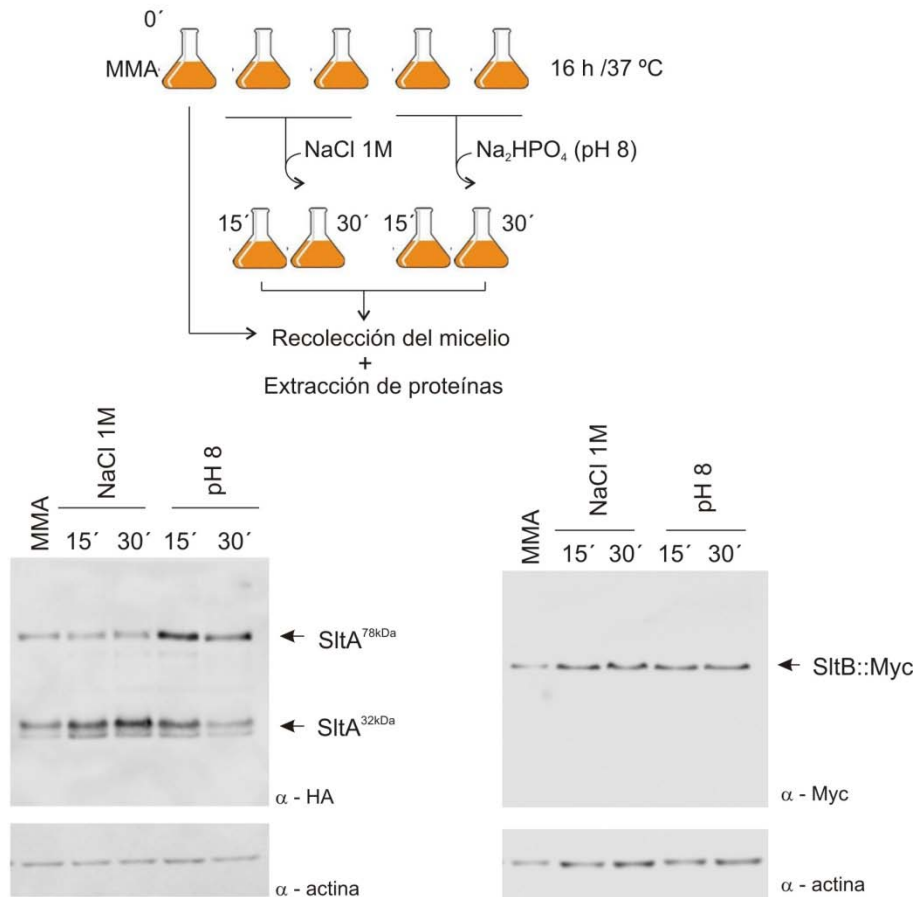


Fig. R4.1. La señalización de SltA y SltB es independiente del estímulo de estrés ambiental. Inmunodetección de las quimeras SltA::HA y SltB::Myc en extractos proteicos procedentes del micelio de la cepa MAD3652 (A), y de la MAD3734 (B), incubadas en MMA suplementado con diferentes sales que se indican en la parte superior de la imagen. (Página siguiente) C) Parte superior, esquema del desarrollo del experimento realizado para estudiar la señalización de SltA y SltB seguidamente a la adición de sales al medio de cultivo. El tiempo de incubación con las diferentes sales se expresa en minutos. En la parte inferior se muestra el *Western-blot* realizado para cada caso, empleando para su inmunodetección los anticuerpos α -HA y α -Myc. En todas las inmunodetecciones se utiliza la actina como control del nivel de carga del extracto proteico.

C



No se apreciaron diferencias en los niveles de cada una de estas formas entre las diferentes condiciones de estrés analizadas y con respecto a la ausencia de los mismos. Este resultado mostraba que la señalización de SltA, entendida como la existencia del corte proteolítico, era independiente del estrés abiótico que hubiera en el medio de cultivo. Además, la cantidad de proteína detectada también fue similar entre las distintas condiciones, por lo que no se evidenciaba un cambio en la expresión del gen *sltA* en las condiciones de estrés estudiadas.

Utilizando la misma estrategia, se estudió la evolución de la quimera SltB::_{3x}Myc en las diferentes condiciones de estrés osmótico descritas anteriormente. La inmunodetección de esta proteína en los extractos proteicos correspondientes reveló la presencia de una única banda, cuya movilidad electroforética fue ~70 kDa y que corresponde a la parte carboxilo terminal de SltB::_{3x}Myc tras sufrir su proteólisis (Fig. R4.1, panel B). El resultado fue el mismo en todos los casos, y los niveles detectados de proteína también fueron similares. De igual

manera que para SltA, la proteólisis de SltB y su expresión parecía no variar con las condiciones ensayadas.

Era posible que existiese una señalización de SltA y/o SltB en los primeros momentos tras la inducción de estrés y que la observación de dichas proteínas a las 16 horas nos estuviese ofreciendo una situación de equilibrio entre las posibles formas de cada proteína. Para verificar esta hipótesis se cultivaron los micelios de las cepas anteriormente utilizadas en condiciones sin estrés durante 16 horas y seguidamente se añadieron los diferentes compuestos causantes de estrés, siendo recogidas muestras de micelio inmediatamente (t0), a los 15 (t15) y 30 (t30) minutos (Fig. R4.1, panel C). En este caso, las incubaciones sólo se realizaron en dos condiciones de estrés: NaCl 1 M y alcalinidad. En los extractos proteicos obtenidos del micelio crecido en las condiciones descritas, de nuevo encontramos tanto para SltA como para SltB, el mismo patrón de bandas, sin diferencias aparentes entre las muestras recogidas a distintos tiempos frente a ambos estreses. Los resultados obtenidos establecen que tanto la proteólisis de SltA como la de SltB debe ser constitutiva e independiente del estímulo de estrés que exista en el medio de cultivo.

4.2 Efecto del estrés sobre la transcripción de los genes *sltA* y *sltB*

Los bajos niveles de la quimera SltB::GFP en el fondo nulo *sltA* (MAD3705) sugerían que la expresión de *sltB* podría estar regulada por el factor transcripcional SltA, a modo de un bucle de retroalimentación positiva (Capítulo 3, apartado 3.2).

En primer lugar se extrajo RNA de la cepa silvestre MAD2733 para estudiar la expresión de ambos genes, tanto en condiciones normales de cultivo como en condiciones de estrés. Dado que experimentalmente habíamos observado una correlación entre la pérdida del fenotipo mostrado por las cepas nulas *sltA* y/o *sltB* y la adición de CaCl₂ al medio de cultivo, y puesto que se caracterizó que un mutante Δ *sltA* presenta un mayor flujo de entrada intracelular de Ca⁴⁵ [43], nos pareció de interés estudiar además la expresión de ambos genes en presencia de calcio en el medio de cultivo. Para comprobar de qué manera la ausencia de SltA o SltB repercutía en sus respectivos niveles de expresión, también se extrajo RNA de las cepas Δ *sltA* y Δ *sltB* (MAD3651 y MAD3682, respectivamente), para ser analizados mediante *Northern-blot* con sondas específicas.

Las cepas indicadas crecieron en MMA líquido durante 16 h a 37 °C. Tras ese tiempo de incubación se añadió al medio de cultivo NaCl 1 M y CaCl₂ 10 mM de forma independiente. El micelio se incubó en estas condiciones durante una hora, recolectando cada una de las muestras a los tiempos cero, quince, treinta y sesenta minutos. Seguidamente se procedió a

extraer el RNA total del micelio en cada una de las condiciones ensayadas, como se describe en Materiales y Métodos (apartado 5.6).

La sonda radioactiva correspondiente a la región codificante de *sltB* detectó un transcrito con un tamaño aproximado de 5 kb (5046 pb, según los datos de RNAseq) en las muestras correspondientes a la cepa silvestre (Fig. R4.2, carril 1 de los paneles A y B) Los niveles estacionarios de mensajero de *sltB* detectados fueron muy similares tanto en el medio con estrés (Figura R4.2, carriles 2-4 de los paneles A y B) como sin estrés, indicando una expresión constitutiva del gen como ya señalaban los *Western-blot* realizados previamente. El mismo resultado fue observado en las muestras silvestres cuando se utilizó la sonda radiactiva correspondiente a la región codificante de *sltA*, cuyo transcrito comprende 3142 pb (datos RNAseq) (Figura R4.2, paneles A y B, carriles 1-4).

Respecto al análisis de la expresión de *sltB* en el fondo nulo *sltA*, se detectaron unos niveles muy bajos de transcrito independientemente de la condición de estudio (Figura R4.2, paneles A y B, carriles 5-8), lo cual era esperado tras los bajos niveles de proteína de fusión SltB::GFP detectados en el mutante MAD3705 (SltB::GFP, Δ *sltA*). Este nuevo resultado indicó que la transcripción del gen *sltB* dependía de la acción de SltA, lo cual concuerda con el fenotipo idéntico del nulo simple *sltA* y del doble nulo *sltB*; *sltA*.

La expresión del gen *sltA* en la cepa Δ *sltB* incubada en MMA sin estrés o con CaCl₂ se mantuvo constante durante el periodo de tiempo y las condiciones ensayadas (Figura R4.2, panel B, carriles 9-12). Sin embargo, se observó una tendencia en la disminución de sus niveles respecto a la cepa silvestre en las muestras incubadas con NaCl 1 M (Figura R4.2, panel A, carriles 9-12). Este hecho podría indicar que la actividad SltB fuese necesaria para obtener unos niveles adecuados de transcripción de *sltA*, quizás promovido por la forma de SltA^{32kDa}.

El mutante *sltA1* es una pérdida de función SltA. Como se describió en la Introducción, este alelo da lugar a una proteína truncada que finaliza en el aminoácido 502 (Trp) careciendo así de 196 aminoácidos de su región C-terminal. Dado que SltA media en la expresión transcripcional de SltB, nos preguntamos si dicha región carboxilo terminal, a pesar de estar muy poco conservada entre los diferentes ortólogos de SltA, sería determinante para llevar a cabo esta función.

Con este objetivo se hibridó una membrana que contenía el RNA total del micelio de una cepa *sltA1* (MAD1123) con la sonda *sltB* correspondiente, de la misma manera que se hizo previamente con la cepa Δ *sltA*. Tanto el proceso de extracción del RNA como la obtención de

la membrana indicada fueron realizados por otros miembros del laboratorio. La cepa indicada creció en MMA suplementado con KCl (1 M).

Como se puede observar en el panel C de la figura R4.2 los niveles de transcrito *sltB* detectados en estas condiciones fueron muy bajos, similares a los encontrados en el fondo mutante Δ *sltA*. Para cerciorarnos que esta baja transcripción del gen *sltB* se correspondía con una muy baja cantidad de proteína SltB, insuficiente para dar lugar a la proteólisis de SltA^{78kDa} y llevar a cabo su correcta función en la célula, se generó una cepa que expresase la quimera SltB::GFP en el fondo mutante *sltA1* (MAD4247) y se realizó la inmunodetección correspondiente. No se observó ninguna banda con la movilidad electroforética correspondiente al fragmento C-terminal de SltB etiquetado (100 kDa) resultado de su proteólisis, al igual que ocurría en el fondo Δ *sltA* (Fig. R4.2, panel D).

La información obtenida de estos experimentos nos permitió concluir que el alelo mutante *sltA1* es una pérdida de función que afecta a la expresión del gen *sltB*, poniendo de manifiesto la región C-terminal de la proteína SltA como esencial para llevar a cabo dicha función.

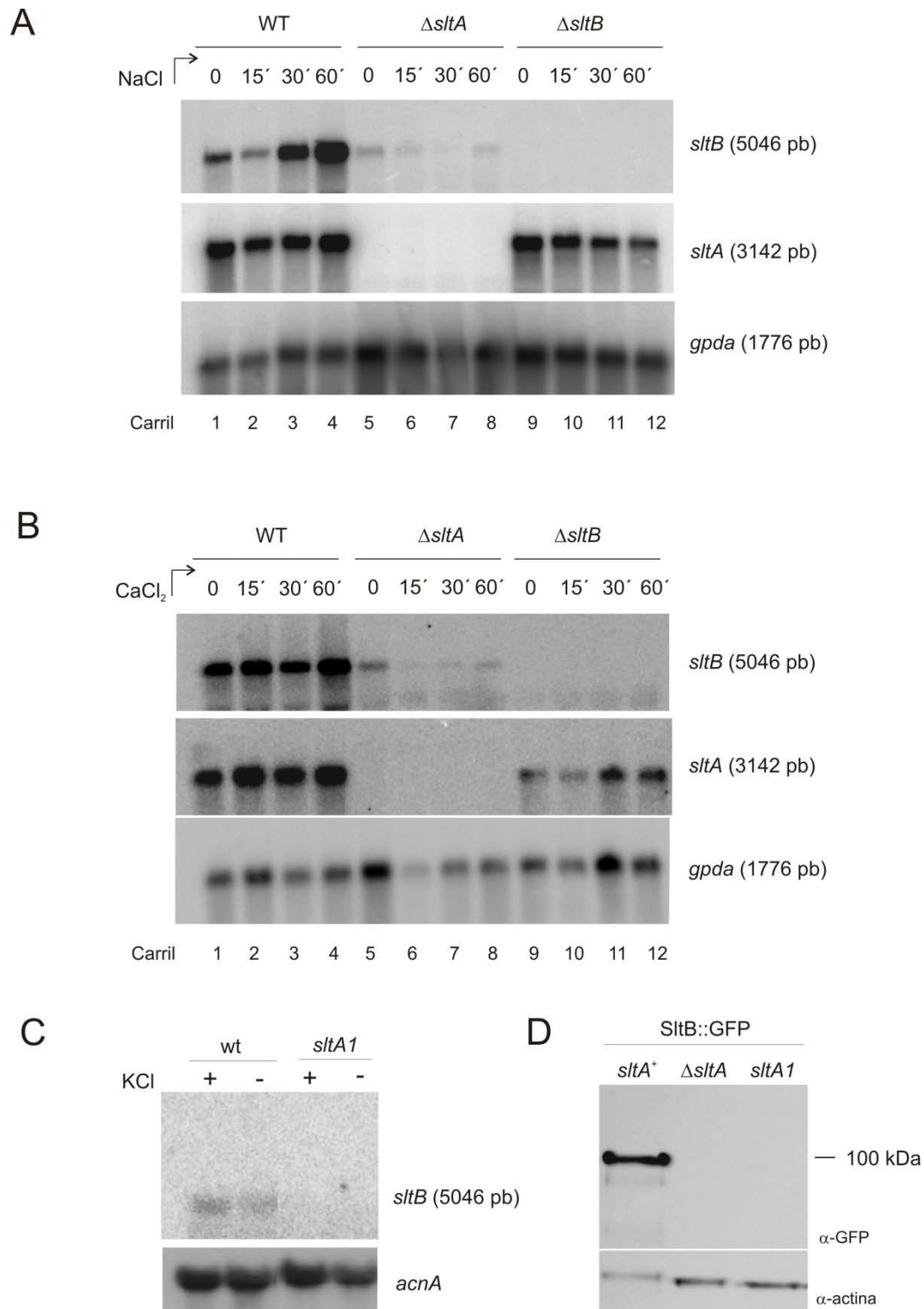


Fig. R4.2. La actividad del factor transcripcional SlfA regula positivamente la expresión del gen *sltB*. En el panel A se muestran los niveles estacionarios de mRNA detectados para *sltB* y *sltA* en presencia de NaCl 1 M, y en el panel B en presencia de CaCl₂ 10 mM. En la parte superior de cada imagen se indica el tiempo en minutos de incubación con las diferentes sales. Se utilizaron los niveles de transcrito del gen *gpdA* como control de la expresión en las muestras estudiadas. C) Niveles estacionarios de mRNA detectados para *sltB* en el fondo mutante *sltA1* y *Western-blot* (D) realizado para la detección de SlfB::GFP en extractos de dicho fondo mutante. Se utilizó la inmunodetección de actina como control del nivel de carga de los tres extractos ensayados.

4.3 Modificación postraduccional de SltA^{32kDa}

Las diferentes inmunodetecciones realizadas para visualizar a la quimera SltA::_{3x}HA en los extractos proteicos, habían mostrado la existencia de tres formas de SltA. La banda con movilidad electroforética intermedia, cuya migración es muy próxima a la definida para SltA^{32kDa}, fue interpretada como una posible modificación postraduccional del mismo fragmento proteico. Dado que la fosforilación de proteínas es uno de los principales mecanismos de regulación de su actividad y puesto que el dominio pseudoquinasa de SltB podría tener actividad quinasa, además de ser requerido para el corte proteolítico de SltA, decidimos estudiar si esta banda de SltA^{32kDa} correspondía a una versión fosforilada de la misma.

Para determinar si existían cambios de movilidad en el patrón electroforético de SltA debido a la presencia de grupos fosfatos en alguna de sus tres formas detectadas, se realizó un ensayo de desfosforilación *in vitro* usando la proteína fosfatasa del fago lambda (PPλ). Para llevar a cabo este análisis fue necesario el empleo de extractos proteicos en estado nativo, utilizando el tampón A-50 en lugar de la solución utilizada para la extracción alcalina (Método 2, apartado 6.1 de Materiales y Métodos). Cada ensayo se realizó utilizando 100 μg de proteína de extractos totales de micelio de la cepa MAD3652 (SltA::_{3x}HA) que fueron incubados con 400 U de PPλ según se describe en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos. Simultáneamente se realizaron controles internos del ensayo de desfosforilación empleando el vanadato de sodio, inhibidor específico de la λPP. A continuación, se procedió a la inmunodetección de la quimera SltA::_{3x}HA con el anticuerpo α-HA. Como se observa en el panel A de la figura R4.3, el tratamiento con PPλ produjo una modificación en el patrón electroforético de una de las formas que componen SltA^{32kDa}. La banda de menor movilidad electroforética no se detectó, y en su lugar la intensidad de la banda de mayor migración en el gel se vio incrementada.

Este resultado nos permitió concluir que esta banda con una movilidad intermedia entre SltA^{78kDa} y SltA^{32kDa} detectada en los extractos proteicos se corresponde con una forma fosforilada de SltA^{32kDa}, que coexiste con otra forma no fosforilada de la misma y con la forma completa SltA^{78kDa}.

En el Capítulo 3 se describió la relación entre la forma de SltA^{32kDa} y SltB. Mediante el estudio del extracto proteico de la cepa MAD4819 (SltA^{Met400}::_{3x}HA, Δ*sltB*), detectamos el mismo patrón de doble banda característico de la forma SltA^{32kDa}. Este resultado descartaba a

la región pseudoquinasa de SltB como quinasa específica de SltA. Para verificar que en este caso la quimera SltA^{Met400}::_{3x}HA también se encontraba en una forma fosforilada y en otra sin fosforilar, se realizó el mismo ensayo *in vitro* de desfosforilación con PP λ que con los extractos correspondientes a la quimera SltA::_{3x}HA. El resultado fue el esperado, la desaparición de la banda de menor movilidad electroforética, y un aumento en la intensidad de la banda de mayor movilidad (Figura R4.3, panel B).

El estudio de la forma SltA^{Met400}::_{3x}HA indica que la región C- terminal de SltA debe contener los residuos fosforilables implicados en su modificación. Este resultado, junto con el estudio del mutante *sltA1*, señalan a esta región de SltA como esencial para llevar a cabo su función, a pesar de estar muy poco conservada entre los ortólogos de la proteína SltA.

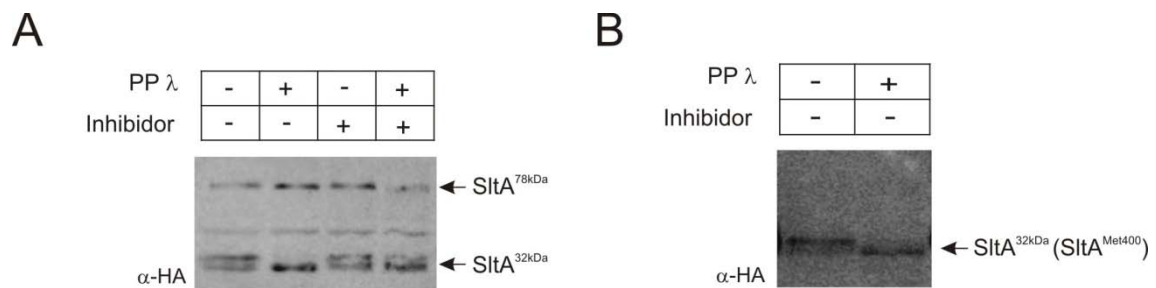


Fig. R4.3. El tratamiento con PP λ permite la detección de una forma fosforilada de SltA. A) SltA^{32kDa} se encuentra en una forma fosforilada y en una forma no fosforilada en extractos proteicos de la cepa MAD3652. B) Análisis por *Western-blot* de los extractos procedentes del micelio de la cepa MAD4849 tras realizar el tratamiento con PP λ . En la parte superior de cada imagen se muestra el tratamiento de las muestras con la fosfatasa PP λ y/o el inhibidor específico (orto-vanadato sódico) de la reacción de desfosforilación.

Resultados: Capítulo 5
Estudios adicionales del sistema Slt

A) Determinación de la localización celular de SltA y SltB

La actividad de un factor transcripcional y de las proteínas que participan en su regulación está estrechamente relacionada con su localización celular.

Con el objetivo de estudiar la localización celular tanto de SltA como de SltB, se generaron cepas que expresaban quimeras fluorescentes mediante la fusión a la proteína fluorescente verde (GFP).

5.1 Localización celular de SltA

En un trabajo previo, utilizando el sistema estandarizado de etiquetado mediante la integración de casetes de DNA como se describe en esta tesis, se habían construido dos cepas MAD2544 y MAD2545 que debían expresar la proteína SltA etiquetada con GFP o con mCherry en su extremo C- terminal, respectivamente. Sin embargo, el análisis más detallado de estas cepas mostró que no debían estar produciéndose formas funcionales de SltA. Mientras que el patrón de bandas en *Southern-blot* de los transformantes correspondía con el esperado de una correcta integración del casete en el *locus sltA*, se detectaron unos niveles muy bajos de proteína de fusión y de diferentes tamaños a los esperados, no correspondiéndose ni con el peso molecular teórico ni con el patrón electroforético determinado previamente utilizando el epítipo HA. Además, no fue posible la detección de estas quimeras mediante microscopía de fluorescencia. El conjunto de resultados sugería que la expresión de una forma etiquetada fluorescente de SltA debe ocasionar graves problemas en el hongo.

Debido a la imposibilidad de obtener una quimera fluorescente de SltA mediante etiquetado en su extremo carboxilo terminal con GFP, se decidió hacerlo en el extremo amino terminal. Para generar el casete de transformación correspondiente se siguió la misma estrategia descrita para realizar el etiquetado en el extremo amino terminal de SltB (Apartado 5.1 de Materiales y Métodos). Se utilizó la cepa nula *sltA* MAD3919 como receptora de esta construcción. Se obtuvieron transformantes viables en homocariosis, muchos de los cuales, incluida la cepa MAD4249 que fue seleccionada para la mayor parte del trabajo realizado a continuación, mostraban la correcta integración del casete en el *locus sltA* tras su análisis mediante *Southern-blot*.

Posteriormente, se comprobó la funcionalidad de la quimera generada mediante el estudio de los transformantes obtenidos en condiciones de NaCl 1 M y alcalinidad. Se observó un crecimiento colonial similar al silvestre sobre el medio que contenía NaCl, y un diámetro de la colonia menor en condiciones de alcalinidad (Fig. R5.1, panel A). Este resultado indicaba una

función parcial de la quimera generada. A continuación, se estudiaron varios de los transformantes con el microscopio óptico de fluorescencia, observándose niveles de fluorescencia muy bajos. La proteína fluorescente apareció dispersa por el citoplasma y con puntos de acumulación que aparentemente no estaban asociados con estructuras como los núcleos, septos o en la punta de la hifa.

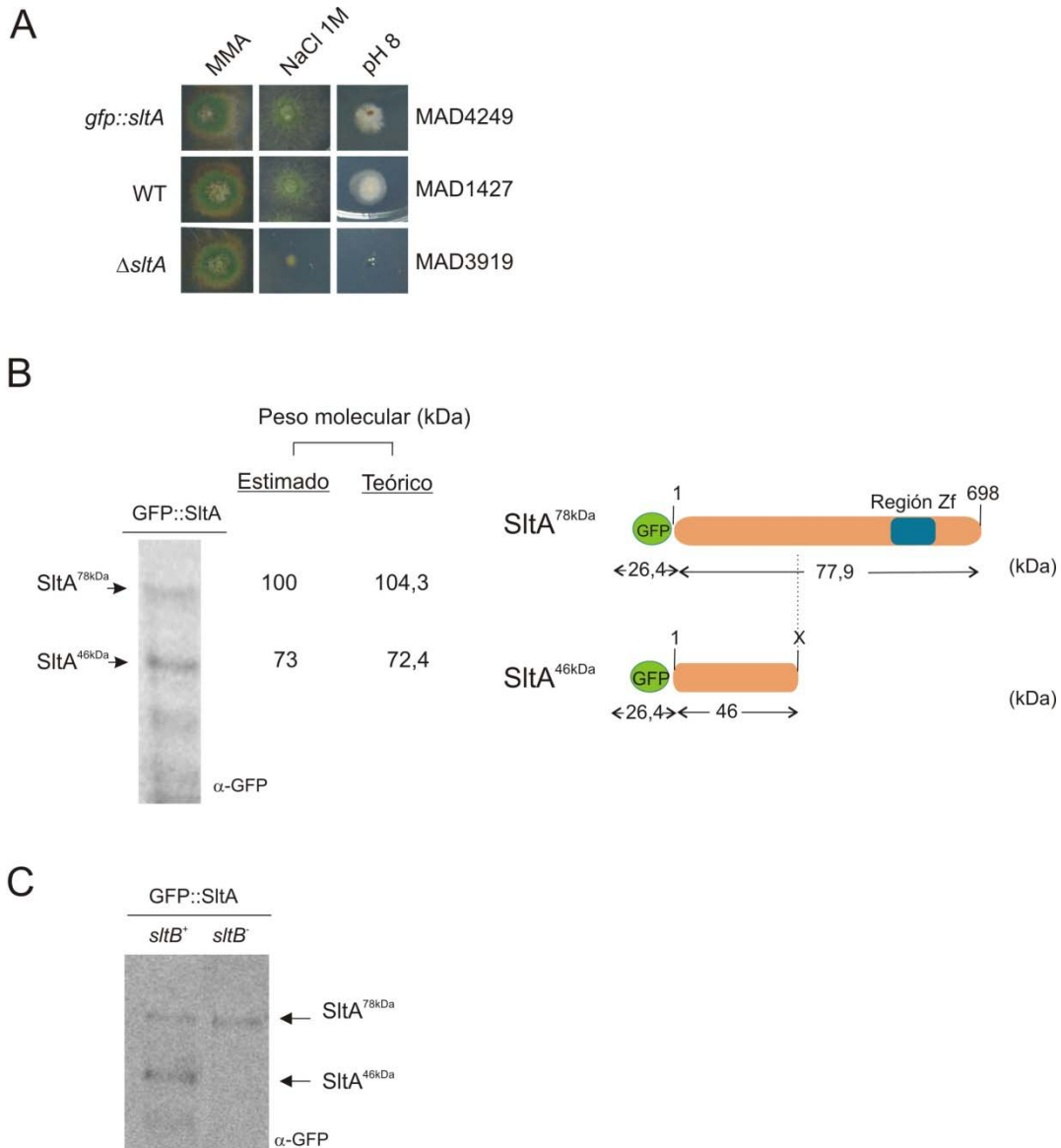


Fig. R5.1. Etiquetado en el extremo amino terminal de SltA. A) Análisis fenotípico de la cepa portadora del alelo mutante *sltA* que da lugar a la quimera GFP::SltA. Las esporas de cada cepa fueron inoculadas sobre MMA y MMA conteniendo NaCl 1 M y 100 mM de Na₂HPO₄ (pH 8). Las imágenes de las diferentes colonias, o puntos de inóculo en caso de no crecimiento, fueron tomadas tras su incubación a 37 °C durante 48 horas. Como control se muestra el crecimiento en las mismas condiciones de la cepa silvestre, MAD1427 y la cepa nula *sltA*, MAD3919. B) *Western-blot* (izda.) realizado con el extracto proteico del micelio de la cepa MAD4249, en condiciones basales de cultivo, y representación esquemática (dcha.) de las diferentes formas GFP::SltA detectadas en el ensayo mediante el empleo del anticuerpo α-GFP. Se indican los pesos moleculares teóricos y estimados para cada una de las formas etiquetadas de SltA. C) Comparación de las formas GFP::SltA^{78kDa} y GFP::SltA^{46kDa} detectadas en extractos procedentes de cepas que expresan o no el gen *sltB* (MAD4249 y MAD4282).

En los extractos proteicos obtenidos a partir de micelio de varios transformantes, entre ellos la cepa MAD4249, se observaron diferentes formas de SltA. Por un lado se detectó una forma que migraba con la movilidad esperada para la quimera GFP::SltA^{78kDa} cuyo peso teórico era de 104,3 kDa (Fig. R5.1, panel B). Además, se observó una banda con una movilidad electroforética cercana a los 73 kDa. Este fragmento de SltA, al proceder de la proteólisis de la quimera GFP::SltA^{78kDa}, debería corresponder a la fracción amino terminal fusionada a GFP. Este fragmento de SltA tendría un peso molecular estimado de 46 kDa, que en su forma etiquetada con GFP sería incrementado hasta los 72,4 kDa. Por lo tanto, la banda de 73 kDa debe corresponder al fragmento de fusión, GFP::SltA^{46kDa}.

Adicionalmente se observó una serie de bandas de menor tamaño que el estimado para GFP::SltA^{46kDa} y que podrían, al contener la proteína fluorescente, estar interfiriendo en la observación de estas quimeras al microscopio. Así, para determinar la localización de la proteína GFP::SltA^{78kDa} se generó una cepa nula *sltB* que expresase dicha proteína de fusión. Para ello, se generó el alelo nulo de *sltB* en la cepa MAD4249 mediante el reemplazamiento de la secuencia codificante del gen *sltB* por el marcador de selección *riboB^{Af}*. Se obtuvieron transformantes viables en homocariosis y, de entre estos, se seleccionó a la cepa MAD4282, tras seguir el método general de obtención de cepas del laboratorio y verificar la ausencia de función SltB en ensayos de sensibilidad a estrés salino y alcalinidad.

La inmunodetección de la quimera GFP::SltA en el fondo genético nulo *sltB* nos permitió observar, con una intensidad muy baja, una única banda proteica cuya movilidad electroforética era la correspondiente a la forma de 78 kDa de SltA (Fig. R5.1, panel C). Este resultado muestra que la forma GFP::SltA^{46kDa}, así como la forma SltA^{32kDa}, proceden de la actividad SltB. Habiendo establecido que la única forma de SltA que existía en la célula era la correspondiente a la quimera GFP::SltA^{78kDa}, se procedió a su observación con el microscopio óptico de fluorescencia. Sin embargo, en concordancia con los bajos niveles de proteína detectados en el *Western-blot*, la emisión de fluorescencia fue extremadamente baja no siendo posible determinar su localización en la célula.

Los problemas encontrados al generar una forma etiquetada de SltA con GFP, tanto en el extremo amino como en el carboxilo, sugerían que la expresión de esta forma mutante podría producir un efecto deletéreo en la célula. Como estrategia alternativa se generó una cepa que expresaba la quimera SltA::GFP de forma controlada utilizando para ello el promotor del gen *thiA*, que es regulado negativamente por tiamina. Así, añadiendo tiamina al medio de regeneración durante el proceso de transformación inhibiríamos su expresión lo que produciría un efecto similar a la pérdida de función SltA (Δ *sltA*), evitándose así cualquier efecto

negativo derivado de su expresión. La regulación de la expresión de una forma no etiquetada de *sItA* mediada por el promotor *thiA^P* ya había sido probada por otros componentes del grupo [73]. La estrategia molecular para introducir el promotor de *thiA* en el locus *sItA* se resume en la figura R5.2 (panel A).

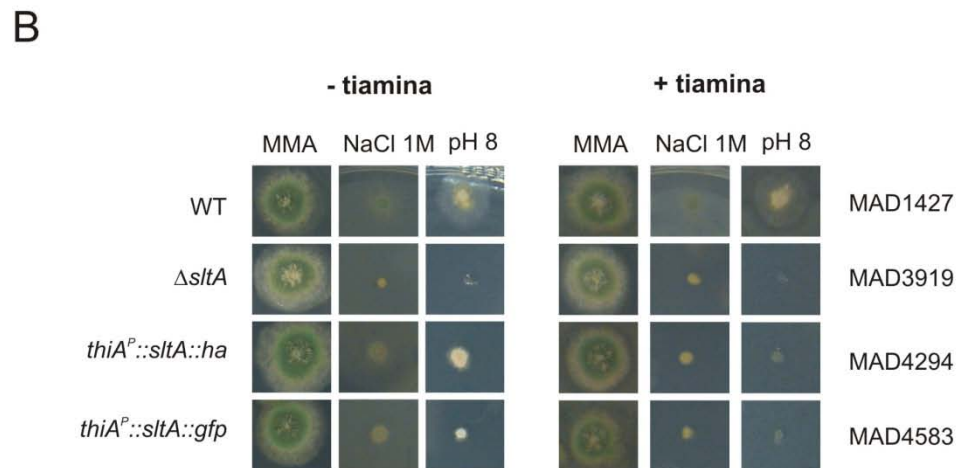
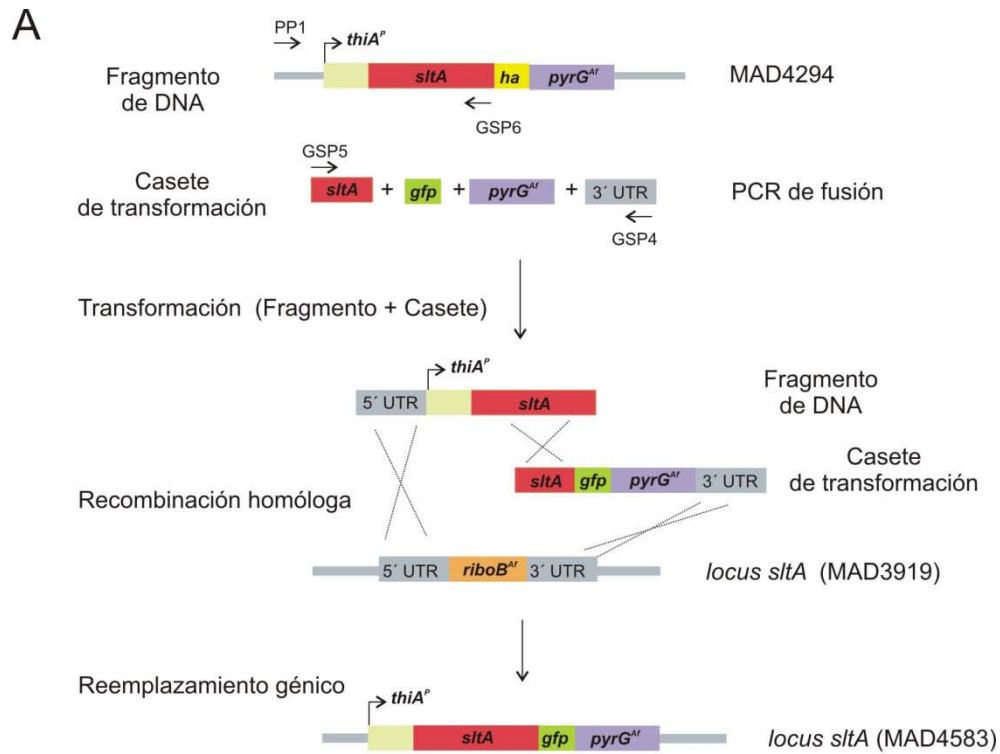


Fig. R5.2. Expresión de la quimera *SItA::GFP* de forma regulada mediante el promotor *thiA*. A) Estrategia seguida para la generación de la cepa MAD4583. Se amplificó el fragmento de DNA que contenía el promotor de *sItA* seguido del promotor de *thiA* y del gen *sItA*, a partir del DNA genómico de la cepa MAD4294. A continuación se transformó la cepa nula *sItA* (MAD3919) con el fragmento de DNA indicado y junto con el casete generado previamente para realizar el etiquetado de *SItA* con *GFP* en el extremo C-terminal, esperando su integración en el locus *sItA* mediante tres sucesos de recombinación. B) Test de crecimiento realizado con la estirpe MAD4583 en condiciones de estrés salino (NaCl 1 M) y alcalinidad (pH 8), tanto en condiciones permisivas como restrictivas de la expresión de *SItA::GFP* añadiendo tiamina 100 μ M al medio mínimo de cultivo.

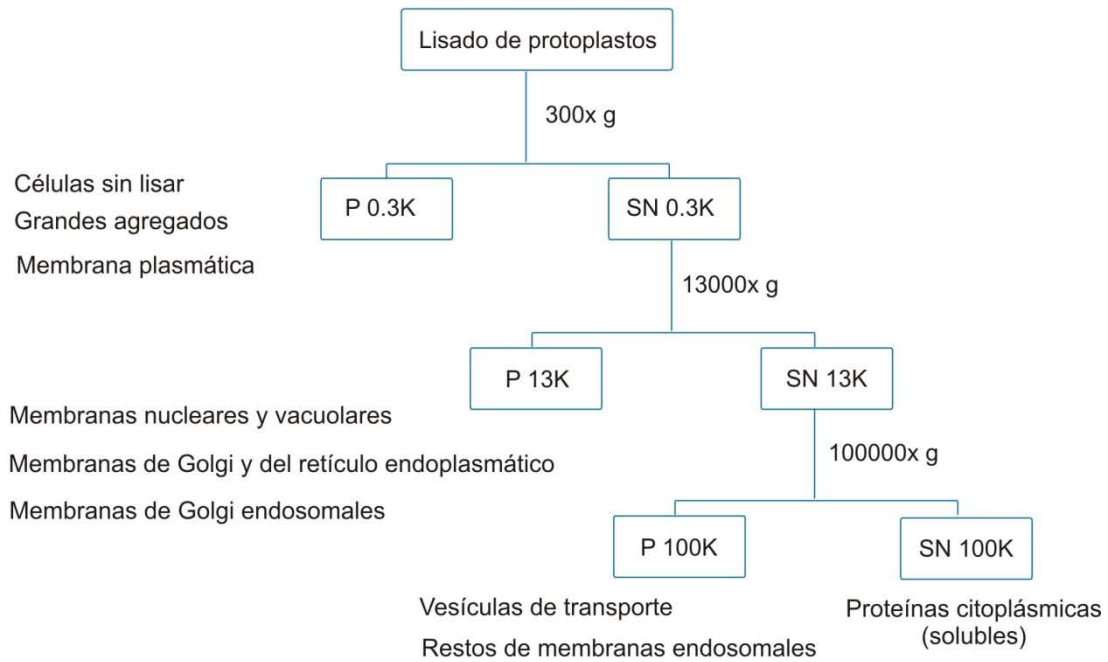
Se obtuvieron pocos transformantes, pero el *Southern-blot* realizado con los gDNA mostró el patrón de bandas esperado para la correcta integración de los dos casetes en el *locus sltA*. De entre los transformantes se seleccionó a la cepa MAD4583 para realizar los experimentos descritos a continuación. Se comprobó la funcionalidad de la proteína de fusión generada mediante test de crecimiento en medio con NaCl 1 M y pH alcalino, comparándose el crecimiento colonial de los transformantes obtenidos con el de la cepa silvestre MAD1427, con el de la cepa nula *sltA* (MAD3919) y con el de la cepa que expresaba la quimera *SlmA::_{3x}HA* utilizando el promotor de *thiA* (MAD4294). Tanto en condiciones permisivas como restrictivas de la expresión de *SlmA::GFP*, el diámetro colonial observado fue idéntico al de la cepa nula *sltA*. Por tanto, asumimos que el etiquetado con GFP en el extremo carboxilo terminal de la proteína sigue siendo no funcional aunque la expresión se mantenga reprimida durante el proceso de regeneración de los protoplastos y purificación de los transformantes (Fig. R5.2, panel B).

Todos los transformantes que mostraron la correcta integración de la construcción fueron analizados con el microscopio óptico de fluorescencia. Los niveles de fluorescencia detectados fueron muy bajos y nuevamente no fue posible determinar la localización de esta quimera de *SlmA* en la célula.

Para verificar la expresión de *SlmA::GFP* dependiente del promotor *thiA* y que ésta se proteolizaba en sus formas características, se realizó la correspondiente inmunodetección de la fusión en los extractos proteicos de dos de los transformantes seleccionados (MAD4583 y MAD4584). Las cepas fueron cultivadas en MMA líquido con y sin suplemento de tiamina, en las condiciones habituales de incubación. Se compararon los extractos obtenidos con el extracto de la cepa MAD4249 como control (*GFP::SlmA*). El peso molecular teórico para la quimera *SlmA::GFP* es de 104,4 kDa, y para la quimera *SlmA^{32 kDa}::GFP* de 58,4 kDa. Se observaron multitud de bandas que en ningún caso correspondían con las dos formas esperadas (hecho que contrastaba con el resultado obtenido para la cepa MAD4294, donde se observó el patrón electroforético característico de *SlmA* sólo en ausencia de tiamina en el medio).

Llegados a este punto, decidimos no continuar con el abordaje experimental de etiquetar a *SlmA* con epítomos fluorescentes para determinar su localización celular. En su lugar, se estudió la distribución de *SlmA* en un experimento de fraccionamiento subcelular en el que es posible separar de una forma básica los componentes de las células mediante una serie de centrifugaciones diferenciales (Fig. R5.3, panel A, y detallado en apartado 7 de Materiales y Métodos). Para ello, se escogió la cepa que expresa *SlmA::_{3x}HA* (MAD3652), puesto que el análisis de la presencia de *SlmA* en las diferentes fracciones se realizó mediante *Western-blot*.

A



B

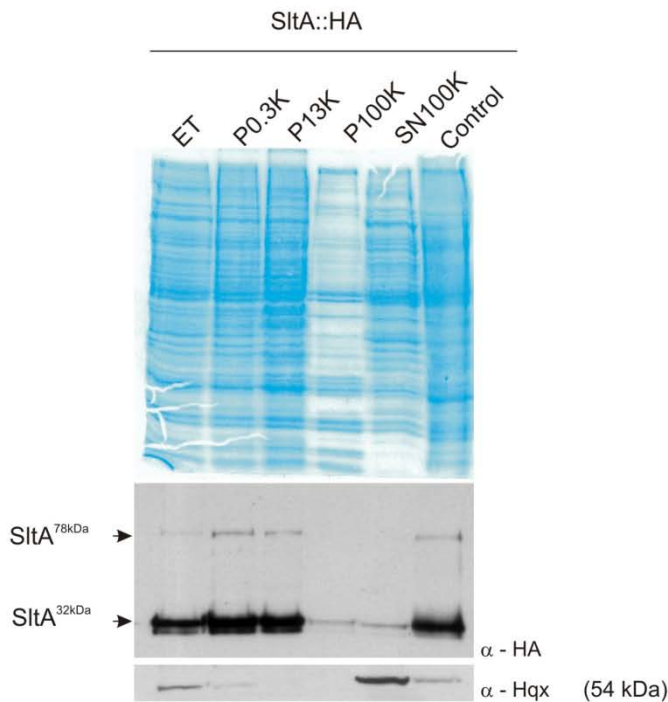


Fig. R5.3. Distribución de SitA en fracciones subcelulares de protoplastos. A) Esquema de los pasos de centrifugación seguidos en el fraccionamiento de protoplastos y el contenido esperado para cada una de las fracciones obtenidas. B) Análisis de las fracciones de la cepa MAD3652 mediante gels de poliacrilamida-SDS. El gel mostrado en la parte superior se sometió a tinción con Coomassie, y en la parte inferior se muestra el *Western-blot* realizado para la detección de la proteína etiquetada. La proteína soluble hexoquinasa fue utilizada como control de calidad de la correcta lisis celular así como de la correcta separación de las fracciones celulares, utilizando el anticuerpo específico α -hxq para su detección.

El material de partida fue una suspensión de protoplastos obtenidos de la cepa indicada, por lo que se siguieron los pasos iniciales del protocolo de la transformación de *A. nidulans* (apartado 4.1 de Materiales y Métodos). Los protoplastos fueron tratados mecánicamente para causar su ruptura y liberar el contenido intracelular. Se obtuvo una mezcla homogénea que se sometió a los diferentes pasos de centrifugación descritos en la figura R5.3 y cuyas fracciones se denominan: P0.3K, P13K, P100K y SB100K. Las proteínas contenidas en las fracciones fueron precipitadas por el procedimiento habitual con TCA (Materiales y Métodos, apartado 6.1, método 2) y posteriormente resuspendidas en tampón de electroforesis de SDS-PAGE para su análisis. Las diferentes muestras se separaron electroforéticamente en dos geles de poliacrilamida-SDS, uno para su tinción con Coomassie y el duplicado para la detección de SltA por *Western-blot* utilizando el anticuerpo α -HA.

En el panel B de la figura R5.3 se muestra el resultado del experimento de fraccionamiento celular. En el carril ET (extracto total), que contiene las proteínas procedentes del lisado inicial de los protoplastos, se detectan ambas formas SltA::_{3x}HA de forma similar a lo que se observa en un lisado por el método estandarizado. En las fracciones P0.3K y en la P13K, se detectan igualmente la misma distribución de bandas para la quimera. Es decir, demuestra la presencia de SltA, ambas formas, en la fracción P13K que debe contener el material nuclear. Es interesante el elevado nivel de detección de las diferentes formas de SltA en la fracción P0.3K que debe contener restos celulares de gran tamaño, incluidas membranas, y complejos de alto peso molecular. Este resultado sugiere que SltA debe estar formando parte o asociado a grandes estructuras celulares. A esta conclusión se suma el hecho de que se detectan muy bajos niveles de SltA tanto en la fracción microsomal, P100K, como en la fracción soluble, SB100K. Por lo tanto este resultado muestra una posible distribución conjunta de la forma completa y truncadas de SltA (al menos SltA^{32kDa}), posiblemente dentro o en las proximidades del núcleo así como en asociación con otros elementos celulares de gran tamaño, siendo muy bajos los niveles de SltA libre en el citoplasma.

5.2 Localización celular de SltB

Para determinar la distribución en la célula de SltB se realizaron diferentes fusiones a la proteína fluorescente verde. El proceso de obtención de la cepa que portaba el alelo *sltB::gfp* se describe en el apartado 3.1 de Resultados y en los Materiales y Métodos (MAD3625). Esta cepa no era adecuada para microscopía dado que debe ser suplementada con riboflavina y dicho compuesto interfiere al ser fluorescente, por lo que se reemplazó el

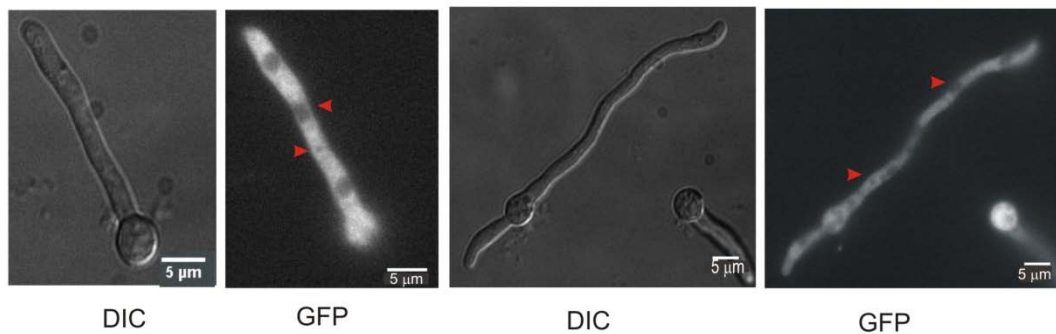
alelo mutante *riboB2* con el gen *riboB* silvestre. De entre los transformantes se seleccionó la cepa MAD3650 para realizar los experimentos de microscopía de epifluorescencia.

En la cepa MAD3650 se observaron buenos niveles de fluorescencia (figura R5.4, panel A). Dado que los experimentos de inmunodetección demuestran que la mayoría de la forma SltB etiquetada corresponde a la forma truncada SltB^{Prot}::GFP, asumimos que la fluorescencia visualizada procedía de esta forma proteolizada. Así, la forma truncada procedente de la quimera SltB::GFP mostraba una preferente localización citoplasmática. La fusión estaba siendo excluida de núcleos y vacuolas.

Para verificar que estábamos observando la localización de la forma truncada SltB^{Prot}::GFP, estudiamos la distribución de la quimera SltB^{Prot(692-1272)}::GFP, producida por la cepa MAD3711. Como se observa en el panel B, de la figura R5.4, esta proteína muestra también una preferente localización citoplásmica y exclusión nuclear.

A

SltB::GFP (MAD3650)



B

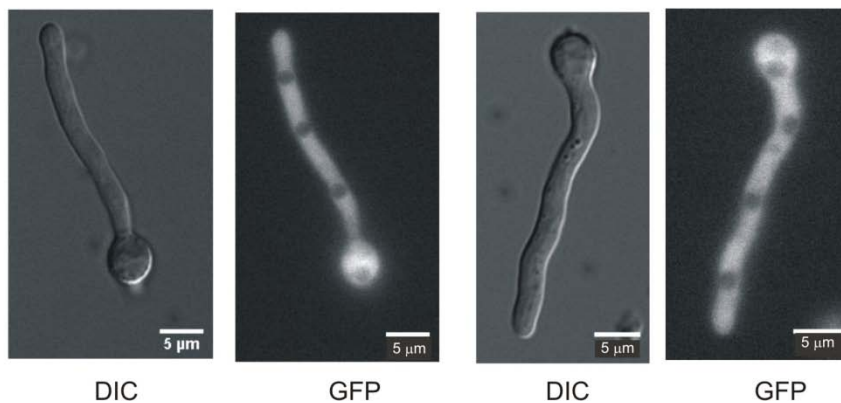
SltB^{Prot}::GFP (MAD3711)

Fig. R5.4. SltB es una proteína preferentemente citoplásmica. A) Las flechas indican la exclusión de la proteína SltB::GFP de núcleos y vacuolas. B) Localización del dominio SltB^{Prot} etiquetado con GFP. Barra de escala: 5 µm.

Igualmente se determinó la localización del dominio pseudoquinasa de SltB mediante el estudio conjunto de las siguientes quimeras: de la forma truncada y etiquetada SltB^{Psk(1-590)}::GFP (MAD3711), de la proteína doble etiquetada GFP::SltB::_{3x}Myc (MAD4899) y de la forma mutante SltB56::GFP (MAD4362). La proteólisis de la forma GFP::SltB::_{3x}Myc permitió determinar la localización del dominio GFP::SltB^{Psk}, de la misma manera que para el dominio SltB^{Prot}::GFP mediante el etiquetado en el extremo C-terminal de SltB. La forma GFP::SltB^{Psk} se observó excluida de los núcleos, no detectándose diferencias con la localización observada para SltB^{Prot}::GFP. La expresión de una forma etiquetada del dominio pseudoquinasa, bien hasta el aminoácido 590 (SltB^{Psk(1-590)}::GFP) o hasta el 477 (SltB56::GFP) no altera la localización de dicha región aunque sí los niveles de fluorescencia, que fueron con diferencia menores (Fig. R5.5, panel A).

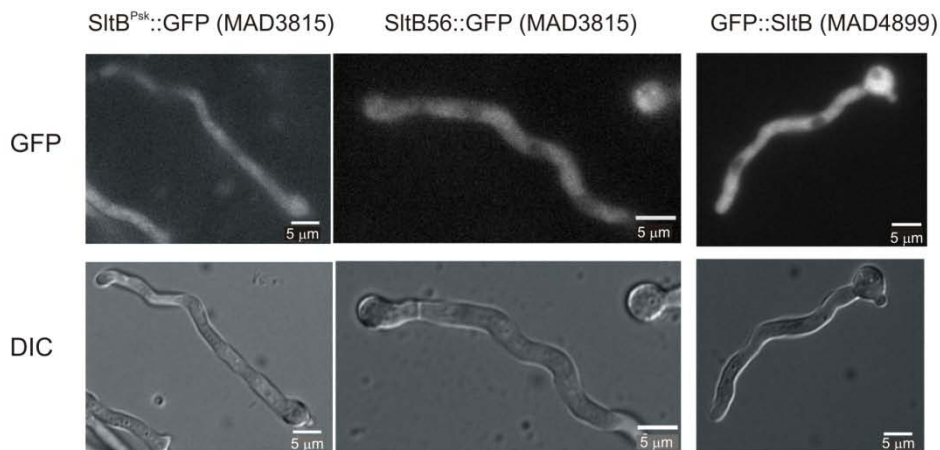
Dado que las quimeras mutantes SltB53::GFP, SltB^{H1033A}::GFP y SltB^{S1142A}::GFP (MAD4013, MAD4731 y MAD4760, respectivamente) permitían visualizar la forma completa de SltB en los *Western-blot* realizados, se observaron con el microscopio para determinar si existía algún cambio en la localización celular establecida para ambos dominios. Este no fue el caso, y aunque los niveles de fluorescencia detectados eran muy bajos como consecuencia de la poca cantidad de proteína presente en la célula (excepto en la cepa MAD4731), se mantuvo excluida de los núcleos en las tres muestras indicadas (Fig. R5.5, panel B).

Adicionalmente, se estudiaron todas las cepas que expresaban la quimera SltB::GFP en los diferentes fondos genéticos generados en este trabajo. En primer lugar, se verificó que la expresión de SltB::GFP tanto en un fondo *ΔsltA* (MAD3705) como *sltA1* (MAD4247) debía dar lugar a unos niveles de fluorescencia muy bajos. Así fue, y la fluorescencia emitida por cada muestra fue prácticamente indetectable.

A continuación se estudió la cepa MAD4733, que expresaba a SltB::GFP únicamente en presencia de la forma SltA de 32kDa. Como se determinó en los *Western-blots* realizados, la forma SltA^{32kDa}::_{3x}HA permitía la expresión del gen *sltB* en unos niveles similares a los observados en un fondo SltA^{78kDa}::_{3x}HA, por lo que fue coherente hallar unos niveles de fluorescencia similares en cada uno de estos dos fondos genéticos así como su localización celular.

En todas las cepas estudiadas la localización celular determinada para cada forma de SltB::GFP fue la misma, y los niveles de fluorescencia detectados eran los correspondientes a los niveles de proteína detectados en los diferentes ensayos de *Western-blot*, y con el fenotipo que mostraban las distintas cepas en condiciones de estrés salino y alcalinidad (en el sentido de relacionar su funcionalidad con la cantidad de proteína presente en la célula).

A



B

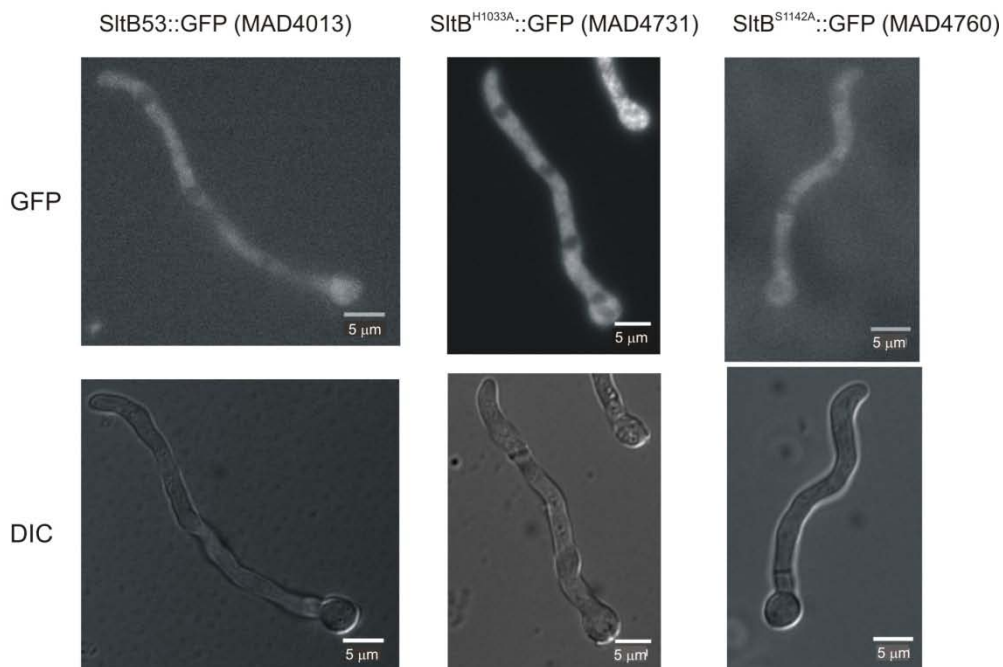


Fig. R5.5. El dominio Psk de SlitB y la proteína completa permanecen excluidos de núcleos y vacuolas. A) Las formas SlitB^{Psk}(1-590)::GFP o SlitB^{Psk}(1-477)::GFP dan unos niveles de fluorescencia muy bajos, aunque mantienen su localización citoplásmica. B) Distribución de las formas mutadas de SlitB que impiden su proteólisis. Barra de escala: 5 μm.

B) Estudio de la relación entre SlitA, CrzA y PacC

Los factores transcripcionales PacC, CrzA y SlitA son esenciales en la regulación de la expresión génica por pH ambiental en *A. nidulans*. Para determinar si existía alguna relación entre SlitA y CrzA/PacC en la ruta de transducción activada por pH, seguimos diferentes abordajes experimentales para cada proteína en cuestión.

5.3 La sensibilidad a la alcalinización del medio causada por la ausencia de función SltA no puede ser suprimida por la activación constitutiva de PacC.

En el caso del estudio de la relación entre SltA y PacC, estudiamos si la ausencia de función SltA podría verse compensada por una mayor función de PacC. Para ello se utilizó el alelo mutante *pacC14900*, que da lugar a una versión truncada de PacC, la forma PacC⁵³, fusionada al epítipo _{3x}Myc y que da lugar a la actividad constitutiva, independiente de pH ambiental, de PacC al ser directamente procesado a la forma funcional PacC²⁷ (_{3x}Myc::PacC²⁷). Así, buscamos evidencia de una supresión del fenotipo de sensibilidad a pH alcalino manifestado por una cepa Δ *sltA* mediante una hiperactividad de PacC. Para ello, construimos la cepa MAD4296, que se obtuvo mediante transformación de la estirpe MAD1441 (*pacC14900*) con el casete correspondiente para reemplazar el alelo *sltA* por el marcador de selección *pyrG*^{Af}.

Primeramente se estudió el patrón electroforético de PacC, para determinar si presentaba alguna alteración en el fondo mutante Δ *sltA*. En este caso, los cultivos se realizaron en MFA y se incluyó en el estudio a la cepa MAD3877, que expresa la quimera _{3x}Myc::PacC (Fig. R5.6, panel A). La movilidad electroforética de las formas PacC⁵³ y PacC²⁷, así como la proporción de una forma y otra, fue similar tanto en un fondo *sltA*⁻ como en uno *sltA*⁺.

Verificado el correcto procesamiento de PacC14900 independiente de pH, se determinó si existía supresión de la pérdida de función SltA debida a *pacC14900*. Para ello se realizaron test de crecimiento en condiciones de estrés catiónico, añadiendo LiCl 0,3 M y NaCl 1 M, y alcalinidad. La comparación del diámetro colonial de la cepa generada MAD4296 con el de la cepa silvestre (MAD1427), la cepa nula Δ *sltA* (MAD3651) y la cepa *pacC14900* (MAD1441), en las diferentes condiciones mostró claramente que todas las cepas Δ *sltA* mostraban un fenotipo de sensibilidad similar independientemente de la presencia de la forma desregulada PacC14900; es decir, la carencia de función SltA no se vio compensada por unos niveles mayores de actividad PacC (Fig. R5.6, panel B).

En busca de otro posible punto de conexión entre PacC y SltA, se generó una cepa que expresara a SltA etiquetado en un fondo nulo para la proteasa PalB, de manera que pudiésemos determinar si PalB llevaba a cabo el corte proteolítico de SltA^{78kDa} a SltA^{32kDa}. Para ello, se transformó la cepa MAD1770 con el casete de DNA correspondiente para obtener la quimera SltA::_{3x}HA. De entre los transformantes obtenidos, se seleccionó a la cepa MAD4645 tras seguir el protocolo habitual de generación de cepas. A continuación, se realizaron las comprobaciones fenotípicas correspondientes a la pérdida de función PalB; es decir un test de

crecimiento en medio alcalino y con LiCl 0,3 M. Para determinar si existía función *SltA* en el fondo mutante generado, se incluyó la condición NaCl 1 M en el test realizado (Fig. R5.6, panel C). El fenotipo de la cepa objeto de estudio (MAD4645) fue idéntico al de la cepa receptora MAD1770, no observándose crecimiento colonial ni en el medio alcalino ni en el suplementado con LiCl 0,3 M. En el medio con NaCl 1M el diámetro de la colonia fue similar al de la cepa silvestre, lo que sugería que no existía ninguna interacción génica entre *PalB* y *SltA*.

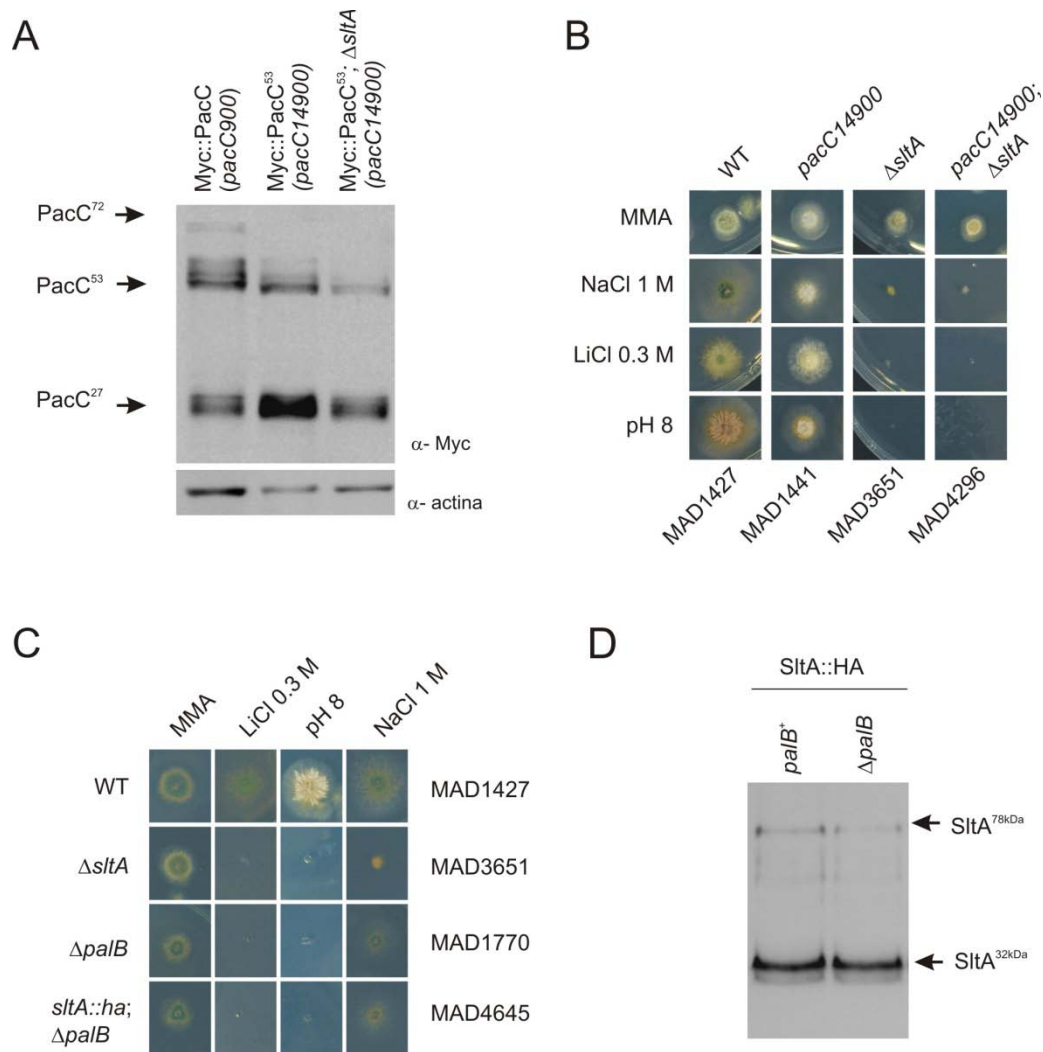


Fig. R5.6. No se ha encontrado una relación entre las rutas de señalización de *SltA* y *PacC*. A) Análisis de la distribución electroforética de *PacC*⁵³ y *PacC*²⁷, en extractos proteicos de una cepa que no expresa el gen *sltA*. Se utilizó como control extracto proteico de la cepa MAD3877 (*pacC900*), obtenido tras 15 minutos de incubación de esta cepa en condiciones alcalinas. Se utiliza la inmunodetección de actina como control del nivel de carga del extracto proteico. B) Análisis fenotípico de la cepa portadora del alelo nulo *sltA* y del alelo *pacC14900*, en MMA y MMA suplementado con NaCl 1 M, LiCl 0,3 M y 100 mM de Na₂HPO₄ (pH 8). Como control se muestra el crecimiento en las mismas condiciones de la cepa silvestre, MAD1427 y la cepa nula *sltA*, MAD3651. C) Test de crecimiento realizado para evaluar la función de la cepa MAD4645, utilizando MMA y MMA suplementado con LiCl 0,3 M, 100 mM de Na₂HPO₄ (pH 8) y NaCl 1 M. Las imágenes de los apartados B y C fueron tomadas como se describe en la leyenda de la figura R5.1. D) Inmunodetección de la proteína etiquetada *SltA::HA* en extractos correspondientes a la cepa MAD4645, mediante el empleo de del anticuerpo α -HA.

Para comprobar que SlmA estaba sometida a proteólisis en estas condiciones de estudio, se procedió a detectar a la quimera generada en los extractos proteicos obtenidos por lisis alcalina. Se observó tanto la banda correspondiente a la forma SlmA^{78kDa} como a la de SlmA^{32kDa}, en sus dos formas, descartándose con ello a PalB como proteasa específica de SlmA (Fig. R5.6, panel D).

Los resultados obtenidos de estos abordajes experimentales nos permiten proponer que SlmA y PacC actúan de manera independiente en la respuesta a pH alcalino de *A. nidulans*.

5.4 Evidencia de la ausencia de relación entre las funciones y la señalización de CrzA y de SlmA

Se han localizado hipotéticos sitios de unión para SlmA (5' AGGCA 3') en la región promotora de *crzA*. Si SlmA mediase la expresión de CrzA, siendo este el punto de convergencia de ambos factores en la ruta de respuesta a pH alcalino, deberíamos detectar cambios en los niveles de la proteína CrzA en un fondo mutante SlmA.

Con este objetivo, se generó una cepa que expresase la proteína CrzA::GFP en un fondo nulo *sltA* (MAD3786) siguiendo el protocolo general de obtención de cepas del laboratorio. Obtenidos los transformantes, se estudió el patrón electroforético de CrzA::GFP mediante *Western-blot*. En ningún caso se detectaron diferencias en movilidad ni en cantidad de proteína de fusión CrzA::GFP respecto a los encontrados en una cepa silvestre *sltA* (Fig. R5.7, panel A).

La regulación de la localización celular de CrzA tampoco parecía afectarse por la ausencia de función SlmA. Así, CrzA::GFP permanecía excluida del núcleo en ausencia de estímulo y la presencia de calcio en el medio de cultivo, así como su alcalinización, daban lugar a la acumulación nuclear de este factor transcripcional. Estas observaciones sugerían que la ausencia de SlmA no altera la señalización de CrzA. De hecho la función CrzA tampoco debía estar siendo afectada, dado que los test de crecimiento en condiciones de estrés salino y alcalinidad realizados, indicaron que el fenotipo mostrado por esta cepa MAD3786 era el correspondiente a la pérdida de función SlmA y no a la de un doble mutante de pérdida de función CrzA y SlmA (Fig. R5.7, panel B, y Fig. I3).

La calcineurina es una serina-treonina fosfatasa implicada en la defosforilación de CrzA [36]. Puesto que SlmA^{32kDa} presenta una forma modificada postraduccionalmente por fosforilación, y dado que existe una relación entre la pérdida de función SlmA y el catión calcio (una cepa Δ *sltA* es capaz de reducir su sensibilidad a los diferentes estreses abióticos ensayados mediante la adición de calcio al medio de cultivo), nos preguntamos si la calcineurina podría estar implicada en la regulación por fosforilación de SlmA^{32kDa}.

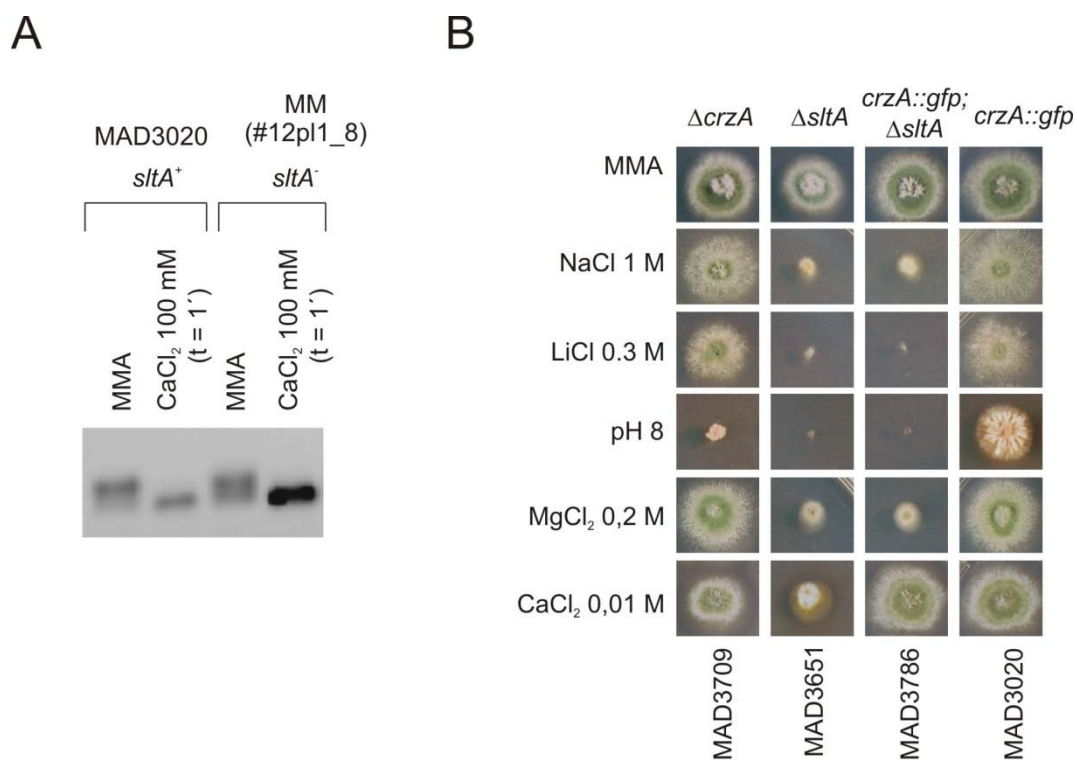


Fig. R5.7. La ausencia de función *SltA* no altera la señalización de *CrzA*. A) *Western-blot* realizado con extractos proteicos de las cepas MAD3020 y MM(#12p1_8). Las cepas crecieron en MMA, y tras 16 h de cultivo se añadió CaCl₂ 100 mM. Tras un minuto de incubación, se filtró el micelio y se trató como se indica en [5]. Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en gels en gradiente de SDS-poliacrilamida 4-15% MiniProtean® TGXTM *precast polyacrylamide gels* de BioRad. B) Test de crecimiento realizado para la cepa que porta los alelos mutados *crzA::gfp* y $\Delta sltA$. Se utilizó MMA y MMA suplementado con NaCl 1M, MgCl₂ 0,2 M, LiCl 0,3 M, CaCl₂ 0,05 M y 100 mM de Na₂HPO₄ (pH 8). Las imágenes fueron tomadas como se describe en la leyenda de la figura R5.1

En busca de un cambio en el perfil electroforético de *SltA*^{32kDa}, generamos una cepa que expresara la proteína *SltA* etiquetada con HA en un fondo nulo para el gen *cnaA*. Para ello se cruzaron las estirpes MAD3652 (*sltA::3xha*) y MAD2457 ($\Delta cnaA$), añadiendo MgCl₂ 0,1 M al medio de cultivo donde se sembraron los cleistotecios para poder observar el fenotipo compacto de las colonias $\Delta cnaA$. De esta manera, se seleccionó a la cepa doble mutante MAD3915 ($\Delta cnaA$; *sltA::3xha*) procedente de la progenie del cruce. Los test de crecimiento realizados demostraron la pérdida de función *cnaA*, mostrando sensibilidad a la toxicidad por calcio, litio y alcalinidad del medio (Fig. R5.8, panel A).

A continuación, se procedió a extraer proteína mediante lisis alcalina de la cepa indicada para realizar la inmunodetección de la proteína *SltA*::_{3x}HA. El resultado del experimento no mostró variación alguna en la movilidad de las bandas correspondientes a ambas formas de *SltA*^{32kDa}. Por lo tanto no se evidencia la participación de la calcineurina en la señalización de *SltA* (Fig. R5.8, panel B).

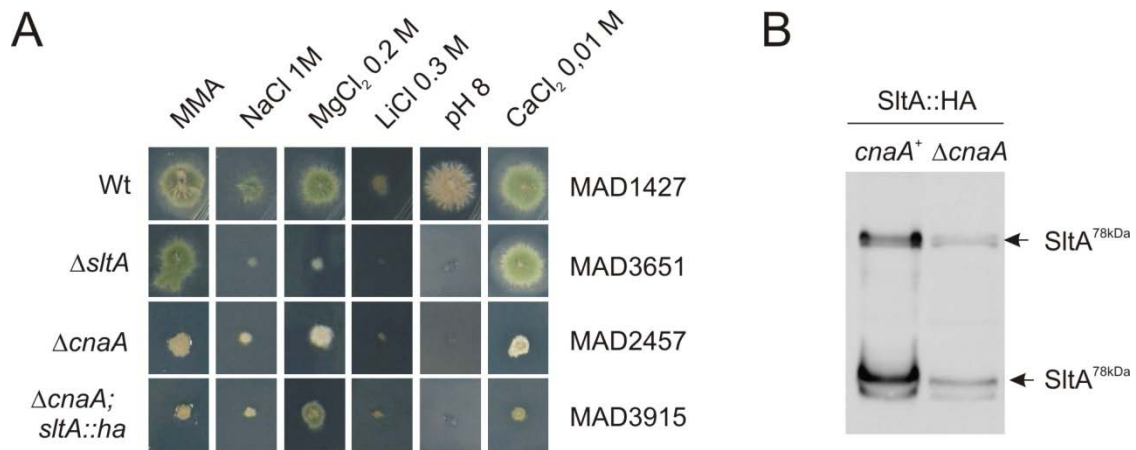


Fig. R5.8. La calcineurina no actúa sobre SlitA. A) Análisis fenotípico de la cepa portadora del alelo nulo *cnaA* y del alelo *sltA* modificado para expresar la quimera SlitA::HA, en MMA y MMA suplementado con NaCl 1 M, MgCl₂ 0,2 M, LiCl 0,3 M, 100 mM de Na₂HPO₄ (pH 8) y CaCl₂ 0,01 M. Como control se muestra el crecimiento en las mismas condiciones de la cepa silvestre, MAD1427 y la cepa nula *sltA*, MAD3651. B) *Western-blot* realizado con extractos de la cepa MAD3915 en los que se detectó la proteína etiquetada SlitA::HA utilizando el anticuerpo α -HA.

C) Estudio de la posible función de PskA en el sistema Slit de respuesta a estrés catiónico.

A través de las búsquedas realizadas con la secuencia correspondiente al dominio pseudoquinasa de SlitB, se identificó otra posible proteína pseudoquinasa en la secuencia genómica de *A. nidulans* a la que hemos denominado PskA. La secuencia proteica codificada por el gen *pskA* (AN7985) consta de 561 aminoácidos. La conservación de secuencia entre PskA y SlitB es muy baja. Un alineamiento entre ambas proteínas muestra una identidad del 27% (66/249 residuos de solapamiento) y un grado de conservación del 42% (107/249 residuos de solapamiento), sin embargo se encontraron diferentes proteínas con relativa alta conservación de secuencia en genomas de otros hongos. Interesantemente su distribución filogenética también estaba restringida al subfilo *Pezizomycotina*. La mayoría son muy probablemente pseudoquinasas.

El locus AN7985 se sitúa en el cromosoma II y corresponde a un único gen de 1686 nucleótidos, organizado en un solo exón. Los límites del marco abierto de lectura (ORF) vienen definidos por la región 5'UTR que comprende las posiciones -16 y -1, y la región 3'UTR, que abarca desde la posición 1687 a la 1883 (Fig.R5.9). No obstante, los datos del *RNA sequence* depositados en AspGD muestran un número muy reducido de lecturas de este transcrito. Este hecho nos llevó a realizar un ensayo de *Northern-blot* para detectar los niveles de expresión del gen *pskA*. Para ello, se extrajo RNA de la cepa silvestre MAD2733 según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Seguidamente se transfirió a una membrana de

nitrocelulosa para ser hibridado con una sonda de DNA correspondiente a la región codificante del gen *pskA*. El resultado confirmó unos niveles muy bajos de expresión de este gen, pero suficientes para afirmar que no se trataba de un pseudogen y comenzar así su estudio.

Estructura del gen *pskA*

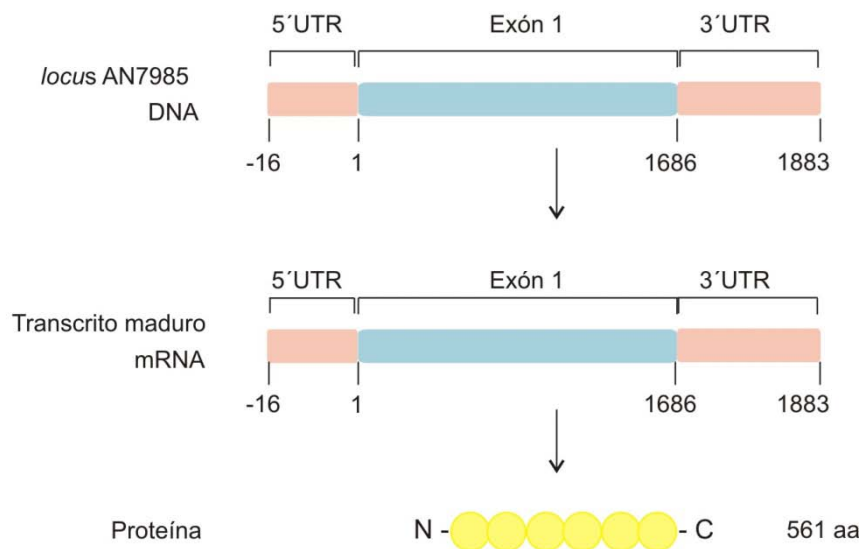


Fig. R5.9. Organización del locus *pskA* (AN7985).

Con el objetivo de determinar si la proteína PskA formaba parte del sistema regulador Slt, se procedió a generar una cepa portadora de un alelo nulo *pskA*. Para ello, se sustituyó este gen por el marcador de selección *ribB^{Af}* de la forma habitual. Se utilizó la cepa que expresaba la quimera SltA::_{3x}HA (MAD3652) como receptora del casete de transformación, con el objetivo adicional de determinar si había alguna variación en la distribución de las distintas formas de SltA en este fondo mutante (ver Capítulo 3).

Se obtuvo un elevado número de transformantes y todos fueron viables en homocariosis, por lo que se concluyó que el gen *pskA* no era esencial para *A. nidulans*. A continuación, se procedió a analizar el fenotipo de la cepa generada (MAD4663) en condiciones de estrés catiónico (NaCl 1 M, MgCl₂ 0,2 M, LiCl 0,3 M y CaCl₂ 0,5 M) y pH alcalino. Se comparó el crecimiento colonial de la cepa nula $\Delta pskA$ con el que presentaba la cepa nula $\Delta sltA$ (MAD3651) y la cepa que portaba la quimera *sltA::_{3x}ha* (MAD3652) sobre los diferentes medios de cultivo. Los fenotipos fueron estudiados tras 48 h de incubación a 37 °C (Fig. R5.10,

panel A). El crecimiento radial de la cepa $\Delta pskA$ fue similar al que mostró una cepa silvestre en cada una de las condiciones ensayadas.

Adicionalmente, se extrajo proteína total mediante lisis alcalina de la cepa $\Delta pskA$ MAD4663, junto con la cepa control MAD3652, para analizar los extractos proteicos en *Western-blot* siguiendo los protocolos habituales del laboratorio (ver Materiales y Métodos, apartados 6.1 y 6.2). Como se observa en el panel B de la figura R5.10, el patrón de bandas detectado en la cepa control SItA::_{3x}HA no se vio alterado en el fondo mutante $\Delta pskA$.

El conjunto de los resultados obtenidos mostró que la proteína PskA, a pesar de sus peculiares características, no debe formar parte del sistema regulador SIt.

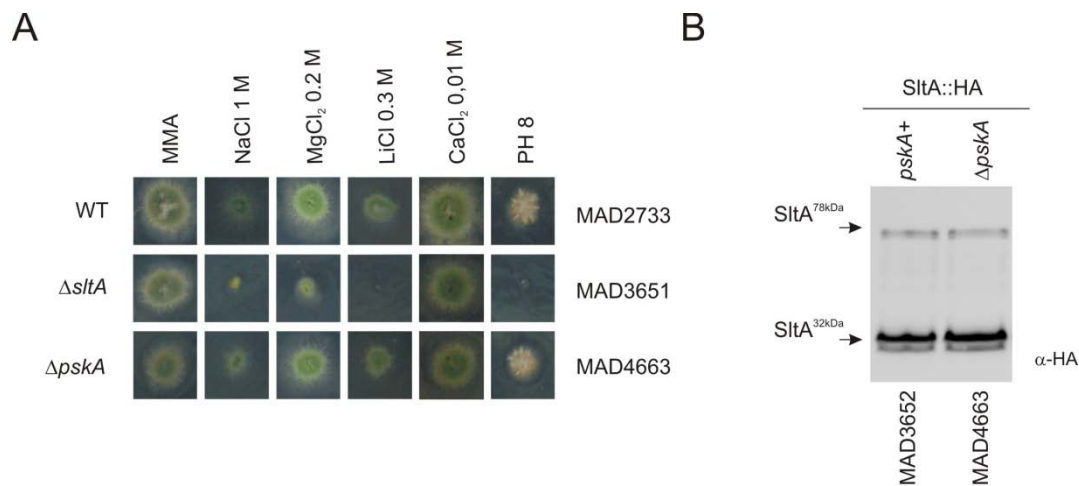


Fig. R5.10. PskA no forma parte de la misma ruta de respuesta a estrés que SItA y SItB. A) Análisis del fenotipo de la cepa que porta el alelo nulo *pskA*. Las esporas de las cepas indicadas a la izquierda de la imagen fueron inoculadas sobre MMA y MMA conteniendo NaCl 1 M, MgCl₂ 0,2 M, LiCl 0,3 M y Na₂HPO₄ 100 mM (pH alcalino, pH8). Las imágenes de las diferentes colonias, o puntos de inóculo en caso de no crecimiento, fueron tomadas tras su incubación a 37 °C durante 48 horas. B) *Western-blot* realizado con extractos de las cepas MAD3652 y MAD4663, en los que se detectó la proteína etiquetada SItA::HA utilizando el anticuerpo α-HA.

Discusión

En esta tesis doctoral se ha investigado sobre los mecanismos reguladores de la expresión génica que permiten al hongo tolerar elevadas concentraciones de cationes y la alcalinización del pH ambiental. En particular el trabajo se ha centrado en determinar cómo es señalizado el factor transcripcional SltA mediante la actividad de la proteína SltB. Los resultados obtenidos se presentan en el modelo de la figura D1 y su interpretación se discute en esta sección. El mecanismo molecular predominante que está implicado en la señalización de SltA y de SltB es la proteólisis. Desde el punto de vista funcional, la proteólisis de SltA es necesaria para generar una forma truncada de la que depende la respuesta a los estreses anteriormente citados. Por otro lado, la proteína SltB tiene dos dominios funcionales bien definidos en su secuencia. El dominio proteasa media la escisión del dominio pseudoquinasa localizado en la fracción amino-terminal de SltB. El dominio pseudoquinasa es necesario para que SltA sea proteolizado. En este apartado se profundiza en los resultados obtenidos desde el punto de vista del mecanismo molecular y la función biológica.

1. Del modelo genético al modelo molecular

Entre los objetivos principales de esta tesis está el estudio de los mecanismos moleculares que promueven la señalización, activación y regulación del factor transcripcional SltA. Para abordar este objetivo se han utilizado técnicas y métodos de genética directa (clásica) o en reverso. Los datos genéticos recopilados a través del trabajo de otros miembros del grupo de investigación indicaban que mutaciones en los genes codificantes de las proteínas SltA y SltB afectaban de forma similar la tolerancia a elevadas concentraciones de cationes y la alcalinidad. Entre los cationes no se encontraba el calcio, y de hecho, la presencia de este catión en el medio de cultivo remedia la toxicidad causada por otros cationes mono y divalentes como el sodio o el magnesio. Utilizando diferentes abordajes de obtención de mutantes se han aislado y caracterizado diversas mutaciones, todas ellas de pérdida de función, en ambos genes. El aislamiento de mutaciones supresoras del fenotipo de inviabilidad o debilidad en el crecimiento colonial causado por la pérdida total de función en diferentes genes *vps* ha permitido, por un lado identificar a *sltB* y por otro profundizar en el proceso de señalización de SltA y de la propia proteína SltB al proporcionar diferentes alelos mutantes en estos genes.

El modelo genético era, en principio, sencillo y está representado en el panel A de la figura D1 panel A. Una proteína señalizadora, SltB, mediaría en la transición entre dos formas de la proteína SltA, una inactiva y otra activa. Este modelo se sustenta sobre las siguientes

observaciones. La proteína SltA es un factor transcripcional con tres dedos de zinc y tanto el alelo nulo como el alelo mutante "clásico" *sltA1*, el primero en ser definido, causa que el hongo mutante muestre sensibilidad a elevadas concentraciones de sales o al pH alcalino. SltA está involucrado en la respuesta transcripcional necesaria, quizás mediando la expresión de genes codificantes para transportadores de estos cationes o para el mantenimiento de éstos en el medio intracelular, es decir en el proceso homeostático. Los datos obtenidos en esta tesis indican que la homeostasis interna debe mantenerse en ausencia de la función SltA o SltB, dado que no se ha observado acumulación de los cationes estudiados. Sin embargo la expresión, de al menos uno de los transportadores intracelulares de calcio, *vcxA*, es dependiente de la actividad SltA [1]. Hasta la fecha no se ha estudiado su papel transcripcional en detalle pero los datos actuales indican un posible papel dual como activador y represor, como se verá a continuación.

Las mutaciones aisladas en *sltB* y que suprimen el fenotipo causado por los alelos Δvps , (*vps20*, *vps32*, *vps33*), son pérdidas de función en SltB, como indica la comparación de los fenotipos de estas cepas con la cepa $\Delta sltB$. La ausencia de función SltB causa un fenotipo indistinguible al de los mutantes en *sltA*. Por lo tanto, la activación funcional del factor SltA a través de la actividad SltB debería ser directa o mediada por otros elementos señalizadores directamente relacionados con SltB. El modelo genético básico sobre el que se sustenta la mayor parte de esta tesis propone a SltB como una proteína involucrada en la señalización de SltA mediante la cual el factor transcripcional pasaría de una forma inactiva a una forma activa.

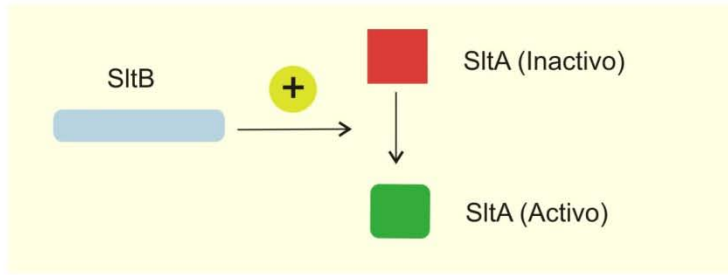
La distribución filogenética de los genes *sltA* y *sltB* es característica y a este nuevo circuito regulador lo hemos denominado la ruta Slt. Los posibles homólogos se encuentran en genomas de organismos restringidos al subfilo *Pezizomycotina*. Estos organismos son en su mayoría hongos dimórficos o preferentemente filamentosos. El estudio de la función SltA queda restringida a *Aspergillus nidulans* y su homólogo en *Trichoderma*, Ace1, en el que participa en la regulación de enzimas modificadoras de la pared [42]. Hasta la fecha no se ha estudiado la función de ninguno de los posibles homólogos de SltB. Determinar el papel en la célula de SltB ha sido posible mediante técnicas de genética en reverso. El estudio de la función y las modificaciones postraduccionales de las formas etiquetadas tanto de SltA como de SltB en diferentes fondos genéticos ha permitido establecer la complejidad del sistema regulador Slt. Este nuevo modelo se representa en el panel B de la figura D1 y se explica en los siguientes apartados.

La ruta Slt debe mediar en todos estos hongos la respuesta a los estreses ya indicados. En los hongos ascomicetos existe otro sistema regulador implicado en la respuesta a estrés

salino y catiónico, el mediado por el factor que responde a calcineurina, Crz1p. Este sistema está ampliamente distribuido por el reino fúngico e incluye a los subfilos *Saccharomycotina* y *Pezizomycotina*. En el caso de *A. nidulans* el homólogo de Crz1p, CrzA, también ha sido estudiado por el laboratorio. CrzA participa en la respuesta al calcio, catión que suprime el fenotipo de las mutaciones de pérdida de función en el sistema Slt. Es por lo tanto posible que en aquellos hongos que poseen ambas rutas reguladoras exista una acción coordinada de dichos sistema reguladores y la existencia de una especialización del sistema Crz. Esta última opción aún no ha sido explorada.

Sin embargo, es formalmente posible que estas rutas no actúen de forma independiente sino que frente a diferentes estímulos exista una regulación concertada. Este puede ser el caso de la respuesta al estrés por pH ambiental alcalino. El trabajo realizado refleja la necesidad de las rutas Pac/Pal, Crz y Slt en *A. nidulans* para tolerar la alcalinidad. Este resultado genético podría indicar que todas o parte de los elementos de estas rutas podrían trabajar de forma coordinada para mediar una respuesta final al pH alcalino. Los experimentos realizados en esta tesis para relacionar la señalización de SltA con la ruta Pal, tras el análisis de la posible función de la proteasa PalB, o con la ruta Crz, al tratar de detectar un posible papel de la fosfatasa calcineurina sobre los niveles de modificación postraduccionales de SltA, no han permitido establecer estas conexiones a nivel molecular. Por lo tanto en esta tesis se define de forma aislada el proceso de señalización de SltA, que está mediado por SltB y otros elementos no definidos, y sobre los que más adelante se razona su existencia y posible función (Fig. D1, panel B).

A



B

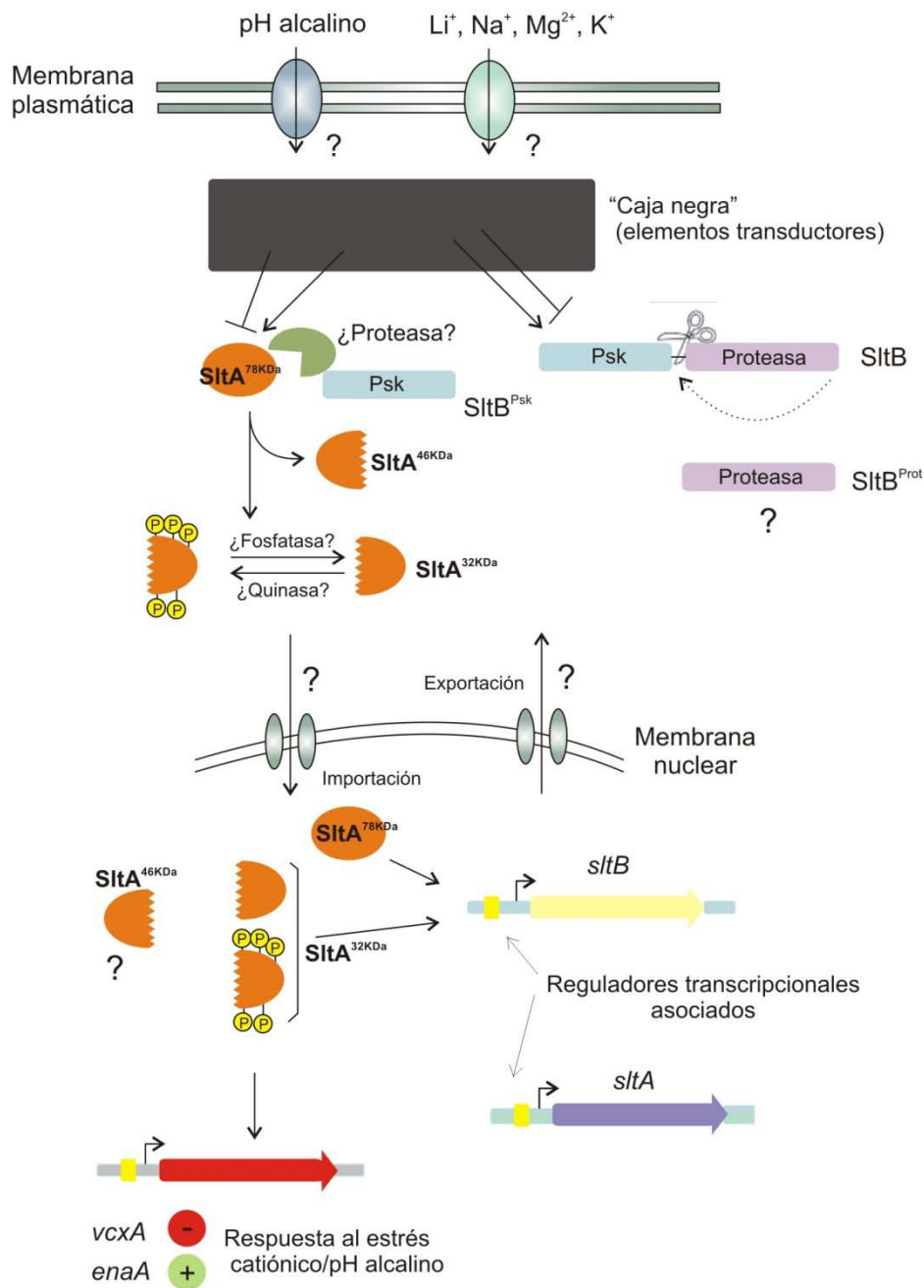


Fig. D1. Evolución de la complejidad del modelo propuesto para la señalización del factor transcripcional SltA.

2. Naturaleza y dinámica de la señalización de las proteínas Slt

Determinados factores de transcripción son activados para que puedan mediar su acción en el núcleo. Algunos se modifican mediante proteólisis, dando lugar a formas alternativas donde se eliminan ciertas partes de la proteína para ganar o perder actividad. En algunos casos estas modificaciones implican cambios en su localización celular eliminando o exhibiendo péptidos señal que determinan una localización específica. Ejemplos de factores de transcripción regulados por proteólisis en ascomicetos son PacC y Stp1/2. Un primer corte proteolítico en PacC supone su señalización mediada por la alcalinización del medio y el segundo corte da lugar a la forma funcional PacC²⁷, capaz de activar la expresión de los genes “alcalinos” y reprimir la de los genes “ácidos”. En este caso, el corte proteolítico regula tanto la actividad transcripcional de PacC como su localización celular [34]. Stp1 y Stp2 son dos factores de transcripción con dedos de zinc señalizados por la presencia extracelular de aminoácidos en *S. cerevisiae* [88]. Son sintetizados como proteínas latentes citoplásmicas, donde la escisión de 10 kDa de la región N-terminal por la endoproteasa Ssy5 es determinante para la regulación de su actividad. Las formas procesadas Stp1/Stp2 se acumulan en el núcleo, donde se unen específicamente a UAS_{aa} (“*upstream activating sequences*”).

En este trabajo se demuestra que SltA también es un factor transcripcional regulado mediante proteólisis limitada. El panel B de la figura D1 muestra la formas SltA detectadas en este estudio y su relación con los otros elementos del circuito regulador. SltA en su forma nativa tiene un tamaño estimado de 78kDa y por ello a esta forma, detectable en cualquier condición de cultivo, se le ha denominado SltA^{78kDa}. Sin embargo no es la única forma en la célula y se aprecia, cuando se utilizan formas etiquetadas en su extremo C-terminal, la aparición de dos formas que hemos denominado como SltA^{32kDa}. Una de dichas formas es una versión modificada mediante fosforilación de SltA^{32kDa}.

Hemos detectado también la forma SltA^{46kDa}, resultante del truncamiento de una forma etiquetada en el extremo amino-terminal de SltA^{78kDa}. Este resultado muestra claramente que en la producción de las formas proteolizadas SltA^{46kDa} y SltA^{32kDa} está actuando una endoproteasa. La invariabilidad de la movilidad electroforética de estas bandas en diferentes condiciones ambientales sugiere que la proteasa tiene una sola diana bien definida en la secuencia de SltA. La búsqueda de dianas para posibles actividades proteasas conocidas ha sido infructuosa, no obstante en la región adyacente a los dedos de zinc, donde estimamos que radica la diana de la proteasa, existen varios grupos de residuos muy conservados entre los diferentes ortólogos de SltA. La ausencia de datos en otros hongos sobre el sistema Slt nos permite establecer si la proteólisis de SltA es un proceso conservado evolutivamente, pero

de serlo, la diana podría estar conservada por lo que la maquinaria (mecanismo) molecular también podría estarlo.

La forma SltA^{78KDa} es funcional y proponemos que la proteólisis de SltA supone la existencia en la célula de una nueva forma funcional de SltA y, puesto que conserva el dominio de unión a DNA, es muy probable que su actividad primera sea la de regular la transcripción. La forma SltA^{78KDa} se requiere para que el gen *sltB* se exprese (Fig. D1, panel B). No hemos investigado un posible papel para SltA^{46KDa} pero aparentemente la forma SltA^{32KDa} es suficiente para mediar en la actividad transcripcional requerida para la tolerancia al estrés estudiado y también para la expresión de *sltB*. No se descarta que la forma SltA^{46KDa} o al menos la región que comprende dicho fragmento pueda tener un papel regulador en la actividad de la forma SltA^{78KDa} o incluso sobre la forma SltA^{32KDa}, como se discutirá más adelante.

La proteína SltB también está sujeta a un proceso proteolítico (Fig. D1, panel B). La forma nativa de SltB debería constar de 1272 aminoácidos, sin embargo, dicha forma no se detecta fácilmente en extractos proteicos del hongo. De hecho, el etiquetado en el extremo C-terminal de SltB con la proteína fluorescente verde, GFP, facilita su detección. Puesto que la utilización de epítomos más pequeños permite la detección preferente de formas truncadas de SltB, hipotetizamos que el etiquetado con GFP debe reducir la actividad de SltB, al menos a nivel del proceso proteolítico necesario. Los resultados muestran que este proceso proteolítico en SltB es el resultado de la propia actividad proteasa residente en el dominio en localización más C-terminal. El análisis de la estructura primaria de SltB propone, al menos, dos dominios bien definidos. Un dominio pseudoquinasa y un dominio proteasa. El dominio pseudoquinasa es esencial para que se lleve a cabo la proteólisis de SltA. El dominio proteasa está implicado en, al menos, la escisión y liberación de ambos dominios en SltB.

En este estudio no ha sido posible determinar la localización en la célula donde ocurre este proceso de señalización. No obstante todas las formas de SltB estudiadas mantienen una localización preferentemente citoplásmica. Independientemente de los niveles de proteína etiquetada presentes en la célula, todas las formas truncadas de SltB estudiadas en este trabajo se localizaron en el citoplasma excluidas de los núcleos. La exclusión nuclear de factores y otras proteínas es un proceso de transporte activo y es dependiente de varios sistemas de transporte mediados por exportinas. Es posible que ambos dominios de SltB porten señales reconocidas por estos sistemas de transporte, la denominadas NES (“*nuclear export sequences*”), o que se mantengan con dicha distribución gracias a un anclaje a estructuras u orgánulos citoplásmicos. Sin embargo, esta posibilidad no ha sido explorada.

El etiquetado de SltA para su seguimiento en la célula ha dado lugar a formas no funcionales. En algunos casos incluso a formas que posiblemente causen interferencia en los procesos normales de la célula dado que el alelo nulo no resulta en pérdida de viabilidad celular mas allá de la sensibilidad a los estreses estudiados. Puesto que SltA es un factor transcripcional, es previsible que se encuentre localizado en el núcleo. Las actividades transcripcionales propuestas tanto para SltA^{78kDa} como SltA^{32kDa} hacen suponer que ambas formas pueden colocalizarse en los diferentes núcleos de cada compartimento celular.

Como alternativa al estudio de quimeras fluorescentes se procedió al análisis de la distribución celular de SltA mediante el fraccionamiento subcelular. Este análisis sitúa a una parte del contenido celular de SltA (ambas formas) en el citoplasma y otra parte en el núcleo. La fracción citoplásmica de SltA seguramente no es una proteína libre, sino que podría estar asociada formando complejos proteicos de gran tamaño o incluso con estructuras membranosas. Esta porción de SltA podría ser aquella que recibiese la señalización o estuviese en proceso de ello. El hecho de que las pseudoquinasas pueden estar mediando en la formación de heterocomplejos y la necesidad de la actividad SltB^{Psk} para la proteólisis de SltA, sugiere una línea de investigación futura donde SltA sería reclutado por SltB^{Psk} a un compartimento/estructura donde debe residir la actividad proteasa que actúa sobre el factor transcripcional (Fig. D1, panel B).

3. La actividad proteasa de SltB

El papel propuesto inicialmente para la proteína SltB se ha visto modificado continuamente a lo largo del desarrollo de esta tesis (Fig. D1). Primeramente el modelo genético proponía a la actividad de SltB como la iniciadora de la activación de SltA. Al investigar el efecto de carecer de la actividad de SltB sobre el proceso señalizador de SltA nos permitió proponer una relación directa entre la actividad propuesta para su dominio proteasa y la proteólisis del factor transcripcional. Para descartar definitivamente esta hipótesis, la genética clásica nos proporcionó un nuevo modelo molecular al caracterizar la proteína mutante del alelo *sltB56*.

La proteína codificada por el alelo *sltB56* está truncada en el aminoácido 477. Esta forma truncada de SltB mantiene gran parte del dominio pseudoquinasa. El fenotipo de dicha mutación no es de pérdida de función total sino parcial. La explicación a dicho fenotipo se obtuvo al observar que una forma etiquetada de SltA seguía siendo proteolizada en dicho fondo genético. Este resultado mostraba indudablemente que el dominio proteasa de SltB no

estaba directamente involucrado en la proteólisis de SltA. Por otro lado, indicaba la necesidad del dominio pseudoquinasa de SltB en este proceso señalizador.

SltB no es la endoproteasa de SltA, pero esta actividad es necesaria para otro proceso endoproteolítico, el de la propia proteína SltB. Nuevamente los experimentos de genética clásica proporcionaron un mutante de pérdida de función, *sltB53*, que resulta en la pérdida de un aminoácido, fenilalanina 1126, en la región que contiene este dominio proteasa. La proteína mutante SltB53 se visualiza en su forma nativa y en dicho fondo genético, SltA tampoco es proteolizado a su forma de SltA^{32kDa}. Por lo tanto estos mutantes proveen de información muy valiosa sobre el mecanismo de actuación de SltB. SltB se debe auto-proteolizar y dicho proceso rinde la separación de ambos dominios funcionales en SltB. El dominio pseudoquinasa es el necesario para transmitir la señalización de SltA (Fig. D1, panel B).

Respecto al dominio pseudoquinasa de SltB, aunque existen ejemplos descritos de proteínas pseudoquinasas, como la titina o VNK, donde la falta de alguno de los residuos catalíticos definidos como esenciales aún les permite mantener su actividad catalítica quinasa [59], no se le ha podido atribuir una implicación en la fosforilación de SltA^{32kDa}. Esta forma truncada de SltA está fosforilada en un mutante Δ *sltB*. La función que consideramos más probable para este dominio es su participación en la posible formación del complejo multiproteico detectado en los fraccionamientos. Esta idea se basa en las posibles funciones descritas para proteínas pseudoquinasas. Una de éstas es actuar como armazón reclutando los elementos necesarios para la regulación de una proteína determinada [59]. En este sentido, un posible papel para el dominio pseudoquinasa de SltB podría ser el de reclutar a los elementos necesarios para que se produzca la proteólisis de SltA, ya que esta es indispensable para ello. Experimentos de fraccionamiento celular o de inmunoprecipitación de macro-complejos deberán llevarse a cabo en el futuro para determinar este hipotético papel del dominio pseudoquinasa.

La función primaria del dominio proteasa de SltB es la propia digestión de esta proteína. No se descarta que dicho fragmento, que se detecta en grandes cantidades en los extractos proteicos, tenga actividades adicionales. Es posible también que, como ocurre en otros sistemas con proteasas, este fragmento de SltB sea inactivado temporalmente mediante inhibidores específicos cuya naturaleza se desconoce actualmente [89]. El análisis de la secuencia del dominio proteasa muestra cierta similitud entre SltB y la proteína de *S. cerevisiae* Ssy5. En la base de datos de peptidasas MEROPS, Ssy5 se clasifica dentro de la familia de endopeptidasas S64, y aunque se desconoce la estructura molecular, la presencia de

motivos reminiscentes a la familia S1 sugieren que pertenece al clan PA. Los algoritmos comúnmente usados en la búsqueda de similitud de secuencias (BLAST; PSI-BLAST) no revelaron ninguna similitud entre Ssy5 y cualquier otra peptidasa caracterizada hasta ese momento [90-93]. Únicamente se encontraron proteínas similares a Ssy5 en especies fúngicas. La base de datos InterProScan clasificó a esta proteína como un posible miembro de la familia de serín proteasas tipo tripsina, señalando a los residuos H465, D545 y S640 como los elementos de la triada catalítica [94]. Los análisis de la secuencia de SltB utilizando las herramientas *on line* de MEROPs mostraban la conservación del posible centro activo entre Ssy5 y SltB.

Los alineamientos realizados entre Ssy5 y SltB identificaban la posible triada catalítica en SltB, compuesta por los residuos H1008/1033, D1036 y S1142. Estos residuos están altamente conservados entre la mayoría de los ortólogos de SltB entre los hongos filamentosos. Mediante genética en reverso hemos podido demostrar que la sustitución del residuo H1033 por alanina causa la pérdida parcial de función de SltB y que la sustitución de Ser 1142 de SltB también por una alanina, sin embargo, conduce a la pérdida total de función en SltB. Ambos fenotipos son debidos a la reducción, en el primer caso, o a la ausencia de proteólisis de SltB y como consecuencia la alteración de la proteólisis de SltA. Este resultado era consistente con los estudios funcionales de Ssy5. En los que la pérdida de la Ser 640 de Ssy5 conllevó tanto la ausencia de la auto-catálisis como la proteólisis de los factores transcripcionales Stp1/Stp2 [94]. Así, definimos al residuo Ser 1142 de SltB como un elemento funcional y esencial de la posible triada catalítica del dominio proteasa de SltB y por ello clasificamos a SltB dentro del grupo serina-proteasa.

La expresión conjunta combinada de dos formas mutantes, o mutante y silvestre, de SltB en cepas diploides nos permitió establecer la existencia de actividades intra o intermoleculares. Los resultados obtenidos del estudio de las cepas diploides SltB53/SltB y SltB53/SltB^{Prot} sugieren que la actividad proteasa SltB se lleva a cabo en *cis* o de manera intramolecular, puesto que no se ha detectado proteólisis de SltB53 cuando está presente en la célula la forma silvestre SltB o la forma mutante truncada SltB^{Prot}. Hipotetizamos que cada molécula de SltB sintetizada sería responsable de mediar su propio corte endoproteolítico. No podemos descartar que las proteínas mutantes se encuentren en una conformación que impida su proteólisis. En cualquier caso la presencia en la célula de formas no proteolizadas o la expresión de la región que corresponde al dominio proteasa no interfieren con la actividad de la forma silvestre, que serían síntomas de envenenamiento en la reacción de proteólisis

sobre SlbB o SlbA por estas formas no funcionales, o en la formación de posibles complejos multiproteicos, también no funcionales, que compitan en la señalización de SlbA.

Es interesante resaltar que las similitudes entre SlbB y Ssy5 se extienden más allá de su parecido funcional. La serín proteasa Ssy5 es un elemento de la ruta de señalización por aminoácidos SPS y regulada por los factores transcripcionales Stp1/Stp2 [94]. La proteína Ssy5 se encuentra asociada al receptor de membrana Ssy1 y a la proteína Ptr3, constituyendo el "sensor SPS". En ausencia de aminoácidos en el medio extracelular, el sensor SPS se encuentra en una conformación pre-activa. Ante la señal de inducción (presencia de aminoácidos), Ssy5 sufre un auto-procesamiento que desencadena de forma constitutiva la proteólisis de Stp1/Stp2. Estos factores de transcripción se localizaban hasta entonces retenidos en el citoplasma (inactivos) y tras sufrir la proteólisis, posiblemente llevada a cabo por la propia Ssy5, se libera el dominio de retención y se permite su migración al núcleo activando la expresión de permeasas de aminoácidos [88]. El mecanismo de actuación de la endopeptidasa Ssy5 sobre Stp1/Stp2 se asemeja mucho a los resultados obtenidos en esta tesis con el estudio de SlbB y SlbA. Desconocemos cuales son los mecanismos sensores de la presencia de elevadas concentraciones de cationes o del pH alcalino y como se transduce la señal hasta SlbB. A este grupo de elementos desconocidos los incluimos en el diagrama de la figura D1 como la caja negra del sistema Slb. Sin embargo no hemos observado condiciones ambientales o de cultivo (e.g. sin estrés) que reduzcan la auto-proteólisis de SlbB. Es posible que este paso no esté regulado en este sistema. La proteólisis de SlbB es un requisito previo a la proteólisis de SlbA, lo cual sugiere que el dominio proteasa regula la actividad del dominio pseudoquinasa, quizás eliminando un "dominio inhibitorio" de su actividad. Este dominio negativo podría ser la región comprendida entre los aminoácidos 477 y 590, tal y como muestra el análisis de la función de las versiones de SlbB truncadas en estos aminoácidos. Alternativamente, la activación del dominio pseudoquinasa necesita que el extremo C-terminal quede libre o expuesto, circunstancia que podría estar evidenciando la pérdida de función de la forma SlbB56 (SlbB^{Psk(1-477)}) al ser etiquetada con la proteína GFP.

En el caso que las similitudes entre SlbB y Ssy5 fuesen "significativas" y existiese un mecanismo molecular de proteólisis muy similar, ambas podrían reconocer la misma secuencia peptídica como diana de corte. Se ha identificado la posible diana proteolítica de Ssy5, que se compone de los aminoácidos PISMS. La delección de estos 5 residuos de la proteína impide tanto la proteólisis de Ssy5 como de Stp1/Stp2, lo que sugiere que esta secuencia conservada corresponde al sitio de corte endoproteolítico de Ssy5. En el caso de SlbB, se ha localizado una región con cierta similitud que incluye los aminoácidos PISRL entre las posiciones 534 y 538, la

cual, aunque no está muy conservada entre el resto de ortólogos de SltB, podría ser la mejor candidata a la diana proteolítica para un futuro estudio funcional.

Además, estos residuos se localizan dentro de la región denominada como “dominio inhibitorio”. Parte del trabajo futuro podría enfocarse hacia un estudio mediante mutagénesis dirigida de esta región de la proteína para determinar su implicación en la proteólisis de SltB. Los datos genéticos sugieren que este fragmento de la proteína es un elemento funcional de SltB. Es interesante mencionar que entre las mutaciones en *sltB* que suprimen el fenotipo de los alelos Δvps se incluyen dos que afectan a residuos muy conservados en esta región, *sltB57* ($\Delta N544$) y *sltB100* (Y520S). Las cepas que portan estas mutaciones no mostraron diferencias respecto a la cepa silvestre ante los diferentes estreses analizados. Para verificar que estas mutaciones no repercutían ni en el auto-procesamiento de SltB ni en el de SltA, se generaron cepas que expresaban las proteínas mutantes etiquetadas, SltB57::GFP o SltB100::GFP, y la quimera SltA::HA. En concordancia con el fenotipo silvestre observado previamente, no se vio alterada la proteólisis de las proteínas mutantes generadas. Estos resultados podrían estar poniendo de manifiesto un papel adicional al de señalar a SltA para el dominio pseudoquinasa y/o proteasa de SltB, en este caso un papel relacionado con las actividades de las proteínas Vps.

4. Regulación de la actividad de SltA. Regiones funcionales

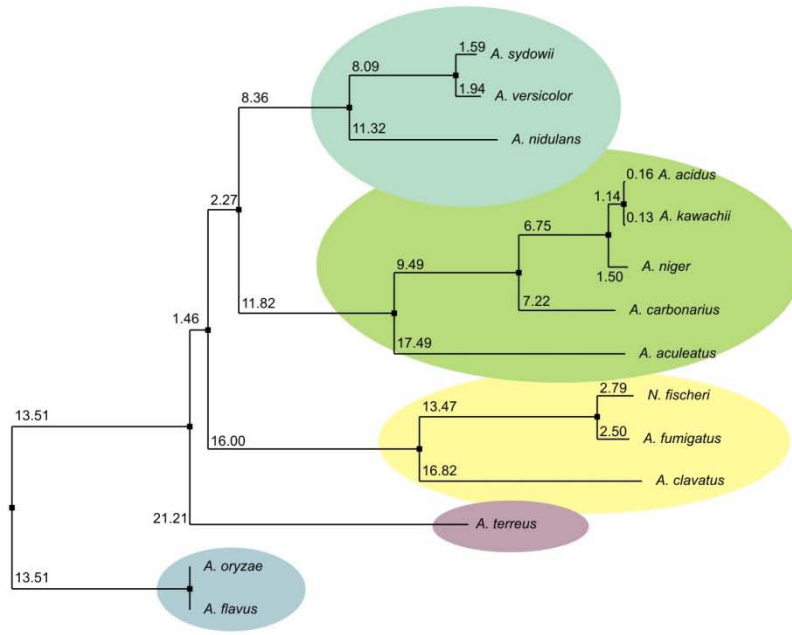
Los análisis de expresión de los genes *sltA* y *sltB* realizados en los fondos nulos *sltB* y *sltA*, respectivamente, evidenciaron el papel positivo de SltA en la expresión de *sltB*. A lo largo de este trabajo se ha demostrado que SltA^{78kDa} debe mediar en la expresión de SltB. No es necesario que en la célula existan formas funcionales de SltB para que este gen se exprese, pero si es necesaria la presencia de SltA, tanto en su forma de 78 como de 32 kDa, como demuestra la expresión condicionada de la forma que mimetiza a SltA^{32kDa} (*thiA::sltA^{Met400}*) y que permite la expresión de *sltB* en unos niveles similares a los observados en un fondo silvestre. De acuerdo con ello, el análisis del promotor de *sltB* muestra la presencia de secuencias candidatas a ser dianas del factor SltA.

Estos resultados muestran un papel positivo en la regulación de la expresión de *sltB* por SltA, al que activa la propia proteína SltB. Por lo tanto, nos sugieren un circuito regulatorio en el que podría existir un bucle de retroalimentación positivo sobre la transcripción de *sltB* que iría elevando su expresión conforme más actividad se generase por parte de SltB y SltA. Sin embargo esto no se ha observado, por lo que proponemos la existencia de un mecanismo

regulador negativo al menos para la expresión de SlkB que compitiese con SlmA y que, quizás, modulase la expresión del propio SlmA (Fig. D1, panel B).

El análisis de las formas mutantes obtenidas mediante genética clásica y las generadas en este estudio nos permiten definir dos regiones funcionales en SlmA. La similitud entre el fenotipo mostrado por el mutante *sltA1* y el mutante Δ *sltA* pusieron de manifiesto la importancia de los últimos 116 aminoácidos de la secuencia proteica de SlmA. Las dificultades encontradas en el trabajo desarrollado para etiquetar a esta proteína con epítopos fluorescentes en su extremo C-terminal sugieren que este extremo debe permanecer libre, quizás para adoptar una determinada conformación, que le permita llevar a cabo su función. Sin embargo, el grado de conservación de esta región es muy divergente entre los homólogos de SlmA en las diferentes especies del género *Aspergillus* identificados hasta la fecha. Se pueden distinguir 5 grupos de secuencias con similitudes significativamente diferentes (Fig. D2, panel A). El dominio Zf está muy conservado entre todos los ortólogos de SlmA, así como el grupo de residuos denominado *Zf-ACR*, “zinc-finger-adjacent conserved región”, y que incluye el triptófano 502 (mutado en *sltA1*)[1] (Fig. D2, panel B). La importancia de este residuo fue puesta de manifiesto en el aislamiento de supresores de la mutación *sltA1*, en el que la recuperación de la fase de lectura era un requisito, pero sólo aquellos que recuperaban el W502 tenían un fenotipo completamente silvestre [1]. A partir de esta región *Zf-ACR* no se encuentran bloques de aminoácidos muy conservados entre los alineamientos múltiples generados con las secuencias de SlmA de las 14 especies de *Aspergillus* analizadas; pero se distinguen los 5 grupos donde sí existe un nivel alto de conservación en la secuencia. Una interpretación a esta observación es que podrían existir diferencias en la función biológica de estas regiones C-terminales específicas de cada especie o grupo de especies. En este sentido, sería necesario estudiar al menos una de las proteínas de cada grupo y determinar, 1) el papel en la tolerancia a estrés de SlmA en cualquiera de sus formas, 2) la conservación de la proteólisis como mecanismo señalizador y de formación de SlmA^{32kDa}, y 3) determinar la funcionalidad de la región C-terminal.

A



B

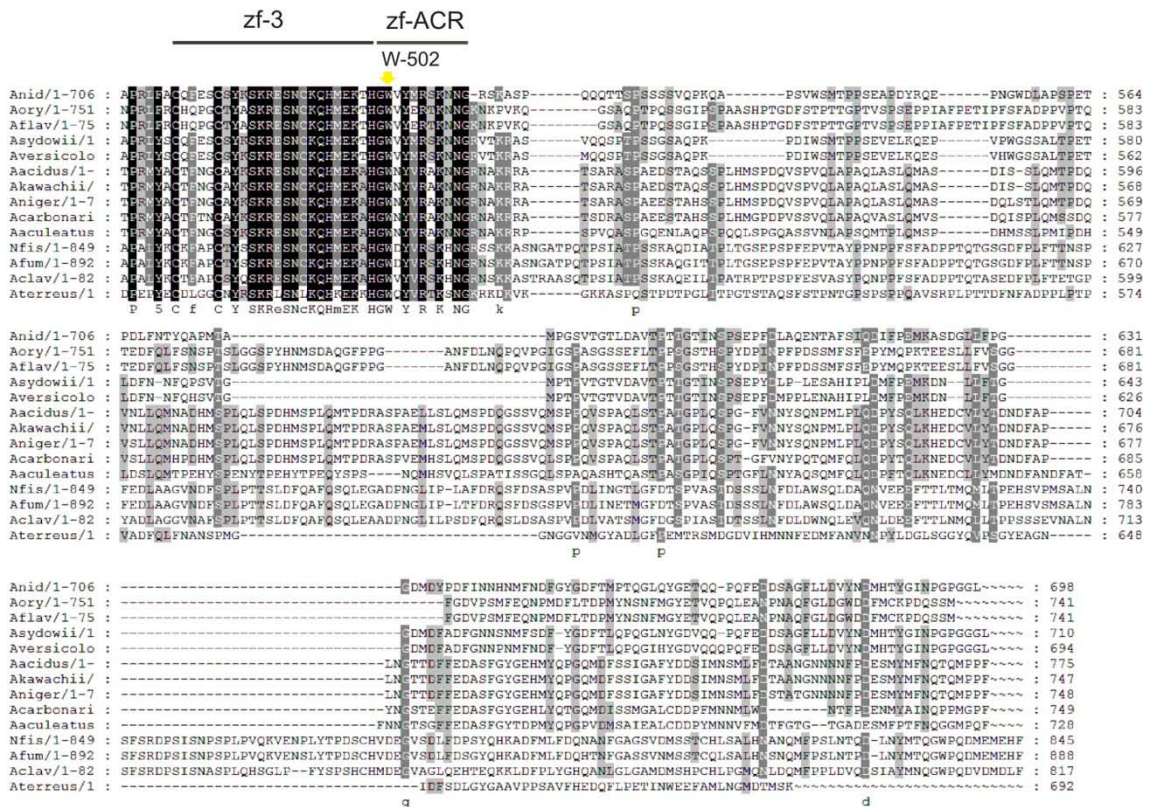
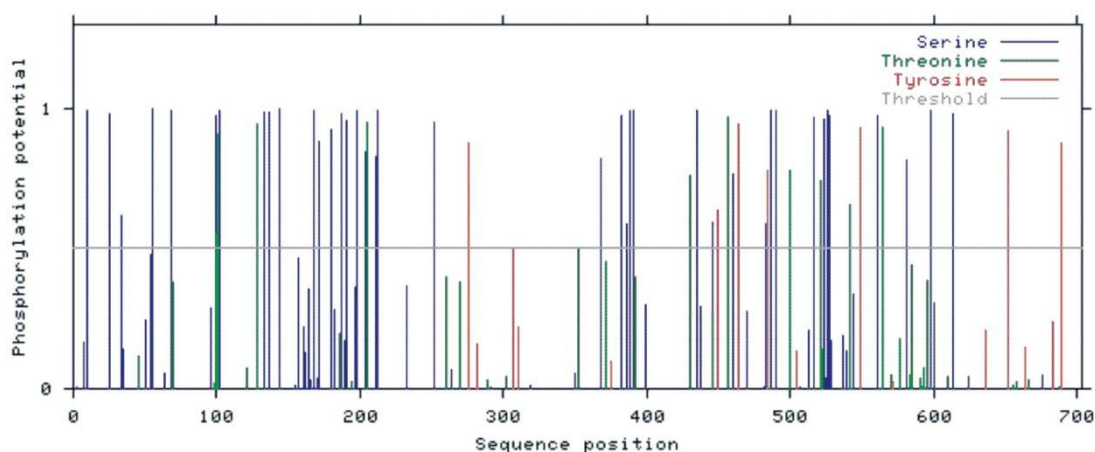


Fig. D2. Divergencia de la región C-terminal de SItA. A) Dendrograma que muestra, marcadas con diferentes colores, los cinco grupos de secuencias con similitudes significativamente diferentes entre especies de *Aspergillus* (indicadas a la derecha). B) Alineamiento múltiple de las secuencias de la región C-terminal de 14 posibles ortólogos de SItA. La flecha amarilla señala el residuo de triptófano 502.

Esta región C-terminal de SltA podría haber estado sujeta a mecanismos evolutivos diferentes en cada especie, adquiriendo una función reguladora específica para cada caso. A pesar de este mecanismo de especialización que se propone, es posible que permanezcan elementos reguladores generales. En este sentido, la modificación por fosforilación determinada en la forma de SltA^{32kDa} y en las formas truncadas generadas SltA^{Arg331} y SltA^{Met400} señalan la importancia de esta región C-terminal en la regulación de la actividad de este factor transcripcional. En el sistema de señalización por aminoácidos SPS, los factores transcripcionales Stp1/Stp2 son fosforilados por Ckl, *casein kinase I*, como pre-requisito para su proteólisis [94]. En el caso de SltA se desconoce si este paso es previo o no a su proteólisis. Una predicción realizada con el programa informático NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) ha permitido encontrar sitios potenciales de fosforilación (Ser: 39, Thr: 11 y Tyr: 7) repartidos a lo largo de la secuencia de SltA (Fig. D3, panel A). La zona que flanquea al triptófano 502 contiene varios residuos modificables por fosforilación, destacando en número aquellos que son diana para la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Fig. D3, panel B). Se ha estudiado el gen que codifica para esta proteína en *A. nidulans*, *pkcA*, y se ha caracterizado como un gen esencial para la viabilidad del hongo, manteniendo la integridad de la pared celular [95]. El trabajo de identificación y caracterización de las quinasas presentes en el genoma de *A. nidulans* desarrollado por el grupo del Profesor Osmani [17], ha permitido añadir un papel adicional a PkcA en condiciones de alta osmolaridad, debido a la incapacidad del desarrollo de colonias conidantes en cepas nulas *pkcA*. Este gen podría ser un candidato a estudiar para determinar si está implicado en la fosforilación de SltA. Además, de las 131 quinasas predecidas en el genoma de este organismo, 11 se han clasificado como específicas de hongos filamentosos y se las ha denominado FfkA-FfkK, "*filamentous fungal kinase*", sin embargo ninguna de ellas parece tener un papel en la tolerancia de elevadas concentraciones de cloruro sódico. No obstante, podría ser interesante continuar este estudio para determinar si su delección daría lugar a un fenotipo relacionado con la sensibilidad a otras sales/cationes o a la alcalinidad del medio, sugiriendo una relación con SltA/SltB. Tampoco puede descartarse que la quinasa implicada en la fosforilación de SltA sea un elemento general de la maquinaria celular y su función sea esencial para la célula.

La región amino terminal de SltA (SltA^{46kDa}) podría tener un papel regulador sobre su actividad, como se describe para muchos de los factores de transcripción eucariotas (e.g. Stp1 o Nrf1, *Nuclear factor-erythroid 2 -related factor 1*). Las mutaciones que se encontraron en la secuencia correspondiente a las proteínas truncadas SltA^{Met200}::HA y SltA^{Arg331}::HA, sugieren un papel regulador de esta región. En el caso de la proteína SltA^{Arg331}::HA se hallaron mutaciones

A



B

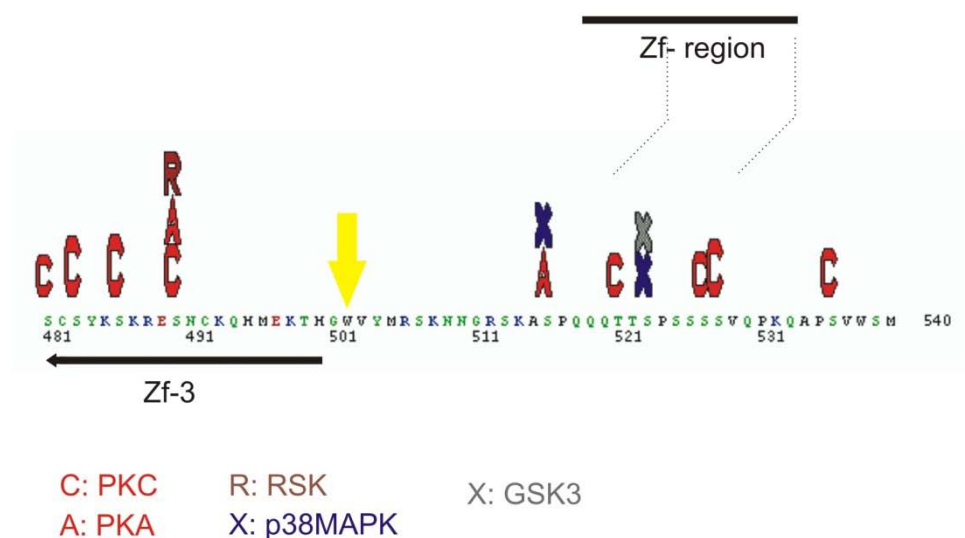


Fig. D3. Residuos potenciales de fosforilación hallados en la secuencia de SlA. A) Representación gráfica de la distribución de posibles dianas de quinasas en SlA. B) Se muestra una ampliación de la región donde se concentra un mayor número de dianas de quinasas y que corresponde al extremo C-terminal de los dedos de zinc del factor transcripcional y que incluye a la región zf-ACR. La flecha amarilla indica el aminoácido triptófano 502. En la imagen se indican las abreviaturas de las quinasas que reconocerían los sitios de fosforilación determinados.

en los dedos de zinc que podrían interpretarse como una disminución en su capacidad para unirse al DNA y por tanto, una atenuación del posible efecto deletéreo derivado de su expresión. Una prueba de ello, podrían ser los bajos niveles de proteína SlTB que se detectaron en este fondo mutante (no descrito en Resultados). Para la forma truncada SlA^{Met200}::HA se encontró una mutación en la metionina inicial que directamente impedía su expresión. No obstante, la ausencia total de esta región no es esencial para llevar a cabo la función SlA, al menos una vez que se ha producido el truncamiento de SlA, a la vista de los resultados obtenidos con la forma truncada SlA^{Met400}::HA. También podemos afirmar que los primeros

331 aminoácidos de SltA no están involucrados en su proteólisis, puesto que su ausencia no impide que ésta se produzca.

5. Búsqueda de nuevos componentes de la ruta Slt

Una de las dificultades encontradas para extender nuestro conocimiento de este sistema regulador ha sido la falta de elementos adicionales a SltA y SltB. Se ha demostrado que al menos deben participar dos proteínas más en este proceso señalizado, una proteasa y una quinasa, ambas mediando su acción sobre SltA. Estas dos proteínas podrían ser o no específicas de la ruta Slt. Se ha realizado una búsqueda *in silico* de genes candidatos que pudieran codificar para estos dos elementos de la ruta Slt. Así se identificó en la base de datos de proteínas de *A. nidulans* la secuencia de la proteína denominada PskA, una pseudoquinasa con alto grado de similitud al dominio pseudoquinasa de SltB y también específica de hongos filamentosos. Ambas características nos hicieron suponer que pudiera participar en la señalización de SltA. Sin embargo, tras generar una cepa portadora del alelo nulo de este gen no pudimos demostrar la existencia de un fenotipo de sensibilidad al estrés salino y pH alcalino como el que muestran las cepas nulas *sltA* y *sltB*. Tampoco la ausencia de PskA alteraba la señalización de SltA por lo que concluimos que la mera similitud a estos elementos Slt o una restricción en su distribución filogenética, no puede ser considerado diagnóstico de pertenecer a esta ruta regulatoria. No obstante, mantenemos nuestra cautela frente al papel de PskA dado que no se ha determinado si existe alguna interacción genética entre *pskA* y los genes *vps*.

La identificación de la quinasa y la proteasa de SltA mediante la búsqueda de genes candidatos en las bases de datos de quinasas y proteasas caracterizadas o hipotetizadas a partir de la anotación automática del genoma de *A. nidulans*, sería un trabajo tedioso y, pensamos, sin mucha posibilidad de éxito. Por lo tanto, proponemos como alternativa más viable la búsqueda de mutantes supresores del fenotipo letal causado por la delección de genes *vps* [73]. Hasta el momento no se han encontrado mutaciones en otros *loci* diferentes a los correspondientes a *sltA* o *sltB*, pero se han estudiado algunas de las mutaciones supresoras que aparecieron en estos genes que han sido muy útiles para ayudarnos a entender el funcionamiento del sistema Slt (e.g. *sltB53* y *sltB56*). En este sentido, es necesario poner a punto un proceso de obtención y selección de mutantes *slt⁻* que nos permita encontrar nuevos elementos del sistema.

Dado que sólo se conocen dos efectores de la respuesta a estrés salino y pH alcalino en *A. nidulans*, SltA y SltB, no podemos descartar que estos fueran moduladores en *trans* de una ruta o rutas de respuesta a estrés general. El mecanismo de activación descrito para una ruta típica de transducción de señal se basa en la unión de un ligando a su receptor de membrana, lo que modulará la actividad de los transductores citoplásmicos. Después de la amplificación de la señal mediante estos transductores, se produce finalmente la activación o inhibición de un factor transcripcional específico (FT), que en último lugar regula la expresión de un determinado conjunto de genes [50;96]. Muchos de los transductores en rutas de señalización son enzimas que producen modificaciones postraduccionales (MPT), cuyos sustratos pueden ser aminoácidos específicos de un determinado factor de transcripción incluidos en una secuencia consenso. En este sentido, los FTs podrían actuar como integradores de varios estímulos ya que su actividad podría modularse simultáneamente por varias rutas de señalización [50].

En el caso de la ruta Slt, se desconoce cuál es el estímulo desencadenante de la respuesta proteolítica de SltB y SltA. Puesto que la proteólisis de SltB es previa a la de SltA e independiente a ésta pero, a su vez, la expresión de *sltB* depende de la actividad SltA, podrían existir unos niveles basales de ambas proteínas en la célula. En este sentido, los datos obtenidos sugieren un sistema regulador que tuviera una actividad basal, es decir, una actividad mínima pero necesaria para que la célula subsista. Así, otros elementos de respuesta a estrés general, como por ejemplo los de la ruta de señalización HOG (High Osmolarity Glycerol) mediarían su señalización ante la presencia del estímulo ambiental, bien de forma directa o indirecta (por ejemplo, disminuyendo los niveles de calcio intracelulares debido a un efecto sobre transportadores vacuolares).

Dado que SltA está involucrado en diferentes procesos celulares (homeostasis de cationes, pH ambiental, conidiación y metabolismo secundario) la propuesta en la conexión entre diferentes cascadas de señalización podría darse por las modificaciones postraduccionales que regulasen la actividad global de SltA. Esta idea se describe para otros factores transcripcionales de metazoos, como es el caso del factor de transcripción FOXO de la familia *Forkhead* [50]. FOXO regula funciones tan diversas como el metabolismo de glucosa, diferenciación celular, longevidad, secreción de neuropéptidos, resistencia a estrés y apoptosis, progresión del ciclo celular y fertilidad [97-101]. Este FT puede modular la especificidad del proceso celular en el que interviene en respuesta a diferentes señales mediante sus modificaciones postraduccionales, como fosforilación, acetilación, glicosilación, metilación y ubiquitinación que ocurren cerca del DBD. Estas modificaciones afectan a la

actividad transcripcional, a la afinidad de unión a DNA y a su localización nucleo-citoplásmica [102]. Un papel similar podrían tener las modificaciones por proteólisis y fosforilación determinadas para SltA, modulando la expresión de un conjunto de genes específico para cada función en la que esté involucrado. En este sentido, se debería estudiar el estado de modificación postraduccional en el que se encuentra SltA en otras condiciones de estudio para las que se ha determinado su función.

Conclusiones

- 1) SltA y SltB son elementos de una misma ruta de señalización por estrés catiónico y pH ambiental, donde SltA es el efector final de la ruta y SltB es la proteína señalizadora.
- 2) SltA y SltB presentan una distribución filogenética restringida al subfilo *Pezizomycotina*.
- 3) SltA está sometida al menos a dos modificaciones postraduccionales. Un proceso de proteólisis que determina la existencia de dos formas fisiológicas de SltA, SltA^{78kDa} y SltA^{32kDa}, y un proceso de fosforilación de la forma SltA^{32kDa} que determina la existencia de la tercera forma caracterizada de SltA.
- 4) SltB es una proteína con dos dominios hipotéticamente funcionales identificados en su secuencia, un dominio pseudoquinasa en la región N-terminal y un dominio con actividad proteasa en el extremo C-terminal.
- 5) SltB también es modificada postraduccionally por proteólisis, liberando los dos dominios hallados en su secuencia.
- 6) El dominio proteasa se requiere para la propia proteólisis de SltB, sugiriendo un mecanismo de regulación por auto-proteólisis. El residuo Serina 1142 es un buen candidato a formar parte del centro catalítico de este dominio. El dominio pseudoquinasa media la proteólisis de SltA.
- 7) La expresión de SltB es dependiente de la actividad de SltA.
- 8) La señalización de SltA y SltB podría ser constitutiva, independiente del estímulo ambiental.
- 9) SltB presenta una distribución celular citoplasmática, y la expresión de sus dominios de forma independiente no altera dicha localización celular.
- 10) SltA, PacC y CrzA median rutas de señalización por pH ambiental diferentes.

Bibliografía

-
- [1] Spielvogel A, Findon H, Arst HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P, Stahl U, Meyer V, Espeso EA. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 2008; 414: 419-429.
- [2] Casselton L, Zolan M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 683-697.
- [3] Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 1995; 9: 576-596.
- [4] Peñalva MA, Arst HN, Jr. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 426-446.
- [5] Hernández-Ortiz P, Espeso EA. Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2013; 89: 532-551.
- [6] Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AW. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 1953; 5: 141-238.
- [7] Reese ML, Boyle JP. Virulence without catalysis: how can a pseudokinase affect host cell signaling? *Trends Parasitol* 2012; 28: 53-57.
- [8] Thom C, Raper KB. *A Manual of the Aspergilli*. Baillière Tindall y Cox (Ed) 1945, London.
- [9] Bold HC. *Morphology of plants*. Harper & Brothers 1957; 669p, New York.
- [10] Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Basturkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scaccocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 2005; 438: 1105-1115.
- [11] Harris SD, Read ND, Roberson RW, Shaw B, Seiler S, Plamann M, Momany M. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 225-229.
- [12] Todd RB, Davis MA, Hynes MJ. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* 2007; 2: 822-830.
- [13] Todd RB, Davis MA, Hynes MJ. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* 2007; 2: 811-821.
- [14] Harris SD, Momany M. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* 2004; 41: 391-400.

- [15] Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 35-54.
- [16] Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 2006; 172: 1557-1566.
- [17] De Souza CP, Hashmi SB, Osmani AH, Andrews P, Ringelberg CS, Dunlap JC, Osmani SA. Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS One* 2013; 8: e58008.
- [18] Markina-Iñarrairaegui A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Araújo-Bazan L, Fernández-Martínez J, Flores JA, Osmani SA, Espeso EA. Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 3874-3886.
- [19] Serrano R. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 1996; 165: 1-52.
- [20] Cyert MS, Philpott CC. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2013; 193: 677-713.
- [21] Harris SD, Turner G, Meyer V, Espeso EA, Specht T, Takeshita N, Helmstedt K. Morphology and development in *Aspergillus nidulans*: a complex puzzle. *Fungal Genet Biol* 2009; 46 Suppl 1: S82-S92.
- [22] Rossi A, Arst HN, Jr. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 54: 51-53.
- [23] Han KH, Prade RA. Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1065-1078.
- [24] Chang PK, Scharfenstein LL, Luo M, Mahoney N, Molyneux RJ, Yu J, Brown RL, Campbell BC. Loss of *msnA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid. *Toxins (Basel)* 2011; 3: 82-104.
- [25] Caddick MX, Brownlee AG, Arst HN, Jr. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 1986; 203: 346-353.
- [26] Calcagno-Pizarelli AM, Negrete-Urtasun S, Denison SH, Rudnicka JD, Bussink HJ, Munera-Huertas T, Stanton L, Hervas-Aguilar A, Espeso EA, Tilburn J, Arst HN, Jr., Peñalva MA. Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: Pal assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot Cell* 2007; 6: 2365-2375.
- [27] Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN, Jr., Peñalva MA. An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J Cell Sci* 2012; 125: 1784-1795.
- [28] Arst HN, Peñalva MA. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet* 2003; 19: 224-231.

- [29] Peñalva MA, Arst HN, Jr. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58: 425-451.
- [30] Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst HN, Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* 1995; 14: 779-790.
- [31] Espeso EA, Tilburn J, Sanchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN, Jr., Peñalva MA. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 1997; 274: 466-480.
- [32] Hervás-Aguilar A, Rodriguez JM, Tilburn J, Arst HN, Jr., Peñalva MA. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J Biol Chem* 2007; 282: 34735-34747.
- [33] Espeso EA, Tilburn J, Arst HN, Jr., Peñalva MA. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J* 1993; 12: 3947-3956.
- [34] Mingot JM, Espeso EA, Diez E, Peñalva MA. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1688-1699.
- [35] Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, de Larrinoa IF. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* 1998; 425: 323-328.
- [36] Stathopoulos AM, Cyert MS. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 1997; 11: 3432-3444.
- [37] Bodvard K, Jorhov A, Blomberg A, Molin M, Kall M. The yeast transcription factor Crz1 is activated by light in a Ca²⁺/calcineurin-dependent and PKA-independent manner. *PLoS One* 2013; 8: e53404.
- [38] Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002; 277: 31079-31088.
- [39] Hagiwara D, Kondo A, Fujioka T, Abe K. Functional analysis of C2H2 zinc finger transcription factor CrzA involved in calcium signaling in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 2008; 54: 325-338.
- [40] O'Neil J.D. Cloning of a novel gene encoding a C2H2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Mycol Res* 2002; 106: 491-498.
- [41] Clement DJ, Stanley MS, Attwell NA, Clipson NJ, Fincham DA, Hooley P. Evidence for *sltA1* as a salt-sensitive allele of the arginase gene (*agaA*) in the ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 1996; 29: 462-467.
- [42] Saloheimo A, Aro N, Ilmen M, Penttila M. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 2000; 275: 5817-5825.

- [43] Findon H, Calcagno-Pizarelli AM, Martinez JL, Spielvogel A, Markina-Inarrairaegui A, Indrakumar T, Ramos J, Peñalva MA, Espeso EA, Arst HN, Jr. Analysis of a novel calcium auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2010; 47: 647-655.
- [44] Cunningham KW, Fink GR. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J Cell Biol* 1994; 124: 351-363.
- [45] Cobeño L. Identificación de la quinasa Hala y el estudio de su papel en la regulación de la homeostasis de cationes en *Aspergillus nidulans*. Tesis Doctoral. 2010.
- [46] Bañuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 10): 2749-2758.
- [47] Shantappa S, Dhingra S, Hernandez-Ortiz P, Espeso EA, Calvo AM. Role of the zinc finger transcription factor SltA in morphogenesis and sterigmatocystin biosynthesis in the fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2013; 8: e68492.
- [48] Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Protein Function.
- [49] Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; 80: 225-236.
- [50] Benayoun BA, Veitia RA. A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 189-197.
- [51] Kafadar KA, Zhu H, Snyder M, Cyert MS. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev* 2003; 17: 2698-2708.
- [52] Kafadar KA, Cyert MS. Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by Protein kinase A. *Eukaryot Cell* 2004; 3: 1147-1153.
- [53] Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy M, Verma IM. Negative and positive regulation by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 4320-4324.
- [54] Son S, Osmani SA. Analysis of all protein phosphatase genes in *Aspergillus nidulans* identifies a new mitotic regulator, *fcp1*. *Eukaryot Cell* 2009; 8: 573-585.
- [55] Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 234-244.
- [56] Rasmussen C, Garen C, Brining S, Kincaid RL, Means RL, Means AR. The calmodulin-dependent protein phosphatase catalytic subunit (calcineurin A) is an essential gene in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 1994; 13: 3917-3924.
- [57] da Silva Ferreira ME, Heinekamp T, Hartl A, Brakhage AA, Semighini CP, Harris SD, Savoldi M, de Gouvea PF, de Souza Goldman MH, Goldman GH. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genet Biol* 2007; 44: 219-230.

- [58] Scheeff ED, Eswaran J, Bunkoczi G, Knapp S, Manning G. Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure* 2009; 17: 128-138.
- [59] Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR. Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 443-452.
- [60] Truitt L, Freywald A. Dancing with the dead: Eph receptors and their kinase-null partners. *Biochem Cell Biol* 2011; 89: 115-129.
- [61] Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277: 47954-47963.
- [62] Briscoe J, Therond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 416-429.
- [63] Poke FS, Upcher WR, Sprod OR, Young A, Brettingham-Moore KH, Holloway AF. Depletion of c-Rel from cytokine gene promoters is required for chromatin reassembly and termination of gene responses to T cell activation. *PLoS One* 2012; 7: e41734.
- [64] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89: 331-340.
- [65] Ali RG, Bellchambers HM, Arkell RM. Zinc fingers of the cerebellum (Zic): transcription factors and co-factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 2065-2068.
- [66] Merzdorf CS. Emerging roles for *zic* genes in early development. *Dev Dyn* 2007; 236: 922-940.
- [67] Ehrmann M, Clausen T. Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 709-724.
- [68] Diez E, Alvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suarez T, Tilburn J, Arst HNJ, Peñalva MA. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J* 2002; 21: 1350-1359.
- [69] Gottesman S, Maurizi MR. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* 1992; 56: 592-621.
- [70] Larsen CN, Finley D. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* 1997; 91: 431-434.
- [71] Barrett AJ. Classification of peptidases. *Methods Enzymol* 1994; 244: 1-15.
- [72] Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993; 290 (Pt 1): 205-218.
- [73] Calcagno-Pizarelli AM, Hervas-Aguilar A, Galindo A, Abenza JF, Peñalva MA, Arst HN, Jr. Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. *J Cell Sci* 2011; 124: 4064-4076.

- [74] Cove DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 1966; 113: 51-56.
- [75] Peñalva MA. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* 2005; 42: 963-975.
- [76] Clutterbuck AJ. *Aspergillus nidulans*, nuclear genes. In: O'Brien SJ, ed Genetic maps, Vol *Locus maps of complex genomes*: Cold Spring Harbor Laboratory press 1993; 371-384.
- [77] Garzia A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Ugalde U, Espeso EA. The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2010; 75: 1314-1324.
- [78] Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 1983; 26: 205-221.
- [79] Yang L, Ukil L, Osmani A, Nahm F, Davies J, De Souza CP, Dou X, Perez-Balaguer A, Osmani SA. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2004; 3: 1359-1362.
- [80] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 1989.
- [81] Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 1991-1995.
- [82] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- [83] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- [84] Rodriguez-Galan O, Galindo A, Hervas-Aguilar A, Arst HN, Jr., Peñalva MA. Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J Biol Chem* 2009; 284: 4404-4412.
- [85] Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodriguez-Navarro A. TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1994; 176: 249-252.
- [86] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-4882.
- [87] Polgar L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2161-2172.
- [88] Ljungdahl PO. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 242-247.
- [89] Almonte AG, Sweatt JD. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior. *Brain Res* 2011; 1407: 107-122.

- [90] Bernard F, Andre B. Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2001; 41: 489-502.
- [91] Forsberg H, Ljungdahl PO. Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 814-826.
- [92] Jorgensen MU, Bruun MB, Didion T, Kielland-Brandt MC. Mutations in five *loci* affecting GAP1-independent uptake of neutral amino acids in yeast. *Yeast* 1998; 14: 103-114.
- [93] Klasson H, Fink GR, Ljungdahl PO. Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5405-5416.
- [94] Abdel-Sater F, El BM, Urrestarazu A, Vissers S, Andre B. Amino acid signaling in yeast: casein kinase I and the Ssy5 endoprotease are key determinants of endoproteolytic activation of the membrane-bound Stp1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9771-9785.
- [95] Ichinomiya M, Uchida H, Koshi Y, Ohta A, Horiuchi H. A protein kinase C-encoding gene, *pkcA*, is essential to the viability of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 2787-2799.
- [96] Pires-daSilva A, Sommer RJ. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 39-49.
- [97] Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; 24: 7410-7425.
- [98] Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 192: 19-28.
- [99] Salih DA, Brunet A. FOXO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 126-136.
- [100] Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor FOXO3a. *Science* 2003; 301: 215-218.
- [101] Flachsbarth F, Caliebe A, Kleindorff R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A. Association of *FOXO3A* variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 2700-2705.
- [102] Butt A, Kaleem A, Iqbal Z, Walker-Nasir E, Saleem M, Shakoori AR, Nasir-ud-Din, . Functional Regulation of DNA Binding of FOXO1 by Post Translational Modifications: *In silico* Study. *Pakistan J Zool* 2011; 43[6], 1167-1175.