

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**TESIS DOCTORAL**

**Mecanismos moleculares y celulares que regulan la función del factor transcripcional CRzA en respuesta al estrés ambiental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Patricia Hernández Ortiz**

Director

Eduardo A. Espeso Fernández

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Microbiología III**



**Mecanismos moleculares y celulares que regulan la  
función del factor transcripcional CrzA en respuesta al  
estrés ambiental**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

**Patricia Hernández Ortiz**

Madrid, 2013

Director de Tesis:

Eduardo A. Espeso Fernández

Científico Titular

Centro de Investigaciones Biológicas

Consejo Superior de Investigaciones Científicas







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 del Programa Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas (JAE) del CSIC a la doctoranda Patricia Hernández Ortiz.



# ABREVIATURAS

3' UTR:	3' untranslated región o región 3' no transcrita
5' UTR:	5' untranslated región o región 5' no transcrita
Af:	<i>Aspergillus fumigatus</i>
CB:	Condiciones basales
CDD:	Calcineurin docking domain (dominio de unión a calcineurina)
cDNA:	Ácido dexosirribonucleico codificante
CDRE:	Calcineurin dependent response element (elemento de respuesta dependiente de calcineurina)
CDS:	Secuencia codificante
CsA:	Ciclosporina A
DAPI:	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DBD:	Dominio de unión a DNA
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilen diamino tetra-acético
FT:	Factor transcripcional
GFP:	Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde)
<i>gpdA<sup>mini</sup></i> :	Fragmento del promotor del gen codificante de la gliceraldehido 3-P deshidrogenasa
GST:	Glutación-S-transferasa
HA:	Residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana
HEPES:	Ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperazinetanosulfónico
IPTG:	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb:	Kilobases
kDa:	Kilo Dalton
MCA:	Medio completo de <i>Aspergillus</i>
mCh:	Monomeric cherry fluorescent protein (proteína rojo cerezo fluorescente monomérica)
MFA:	Medio fermentación de <i>Aspergillus</i>
MFA50:	Combinación de técnicas Miracloth/Filtration + A50 buffer
MFAL:	Combinación de técnicas Miracloth/Filtration + Alkaline Lysis
MMA:	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i>
MMR:	Medio mínimo de regeneración
MMR-TOP:	Medio mínimo de regeneración-TOP
MOPS:	Ácido 3-[N-Morfolino]-propanosulfónico
mRNA:	Ácido Ribonucléico mensajero
myc:	Residuos 408-439 de la proteína p62c-myc humana
Nc:	<i>Neurospora crassa</i>
NES:	Señal de exportación nuclear
NLS:	Señal de localización nuclear
ORF:	Open Reading Frame (Fase de lectura)
PABA:	Ácido p-aminobenzoico
PAGE:	Polyacrylamide gel electrophoresis
pb:	Par de bases
PEG:	Polietilenglicol
PCR:	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PSA:	Persulfato amónico
rpm:	Revoluciones por minuto
RNA:	Ácido Ribonucléico
RNAsa:	Ribonucleasa
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
TCA:	Ácido tricloroacético
TCPAGE	Tampón de carga empleado en análisis por PAGE
TEMED:	N, N, N, N-tetrametilendiamina
Tris:	Tris (hidroximetil)-aminometano
UTR:	Región no traducida
UV:	Ultravioleta
VFA50:	Combinación de técnicas Vacuum/Filtration + A50 buffer
VFAL:	Combinación de técnicas Vacuum /Filtration + Alkaline Lysis
WMM:	Watch minimal medium
zf	Zinc finger (dedo de zinc)

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

# ÍNDICE



<b>SUMMARY</b>	<b>1</b>
1. Introduction.....	1
2. Objectives.....	2
3. Results.....	2
4. Discussion.....	5
5. Conclusions.....	8
6. Bibliography.....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1. Respuesta al estrés ambiental por cationes y pH en <i>Aspergillus nidulans</i> .....	13
1.1. Regulación génica en respuesta al estrés ambiental mediado por PacC.....	13
1.2. Regulación génica en respuesta al estrés ambiental mediado por SitA.....	15
1.3. Regulación génica en respuesta al estrés ambiental mediado por CrzA.....	16
2. Modelo de señalización de Crz1p en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
3. Modelo de señalización de NFAT en eucariotas superiores.....	19
4. Mecanismos reguladores de la calcineurina.....	21
4.1. Cascada de señalización Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina/Calcineurina.....	21
4.2. Interacción de la calcineurina con los sustratos.....	22
4.3. Regulación e inhibición de la calcineurina.....	23
5. Sistemas Crz en otros hongos: implicaciones biológicas.....	26
<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
1. Condiciones y medios de cultivo para <i>Aspergillus nidulans</i> .....	35
1.1. Soluciones y suplementos para medios de <i>Aspergillus</i> .....	35
1.2. Medio mínimo de <i>Aspergillus</i> (MMA).....	37
1.3. Medio mínimo para microscopio (“watch minimal medium”) (WMM).....	37
1.4. Medio completo de <i>Aspergillus</i> (MCA).....	37
1.5. Medio mínimo de regeneración base (MMR) y de cobertura (MMR-TOP).....	38
1.6. Medio de fermentación (MFA).....	38
1.7. Condiciones y medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	38
2. Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados.....	39
2.1. Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	39

## Índice

---

2.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	42
2.3. Oligonucleótidos. ....	42
2.4. Plásmidos. ....	47
2.4.1. Plásmidos utilizados para la clonación de fragmentos de DNA. ....	47
2.4.2. Plásmidos utilizados para la transformación de <i>A. nidulans</i> . ....	48
2.4.3. Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en <i>E. coli</i> . ....	49
3. Generación de cepas mutantes.....	50
3.1. Transformación de <i>A. nidulans</i> .....	50
3.2. Cruces entre cepas de <i>Aspergillus</i> .....	51
3.3. Transformación de <i>E. coli</i> . ....	52
4. Manipulación de ácidos nucleicos.....	52
4.1. Construcción de casetes mediante PCR de fusión. ....	52
4.2. Mutagénesis dirigida. ....	53
4.3. Extracción de DNA genómico de <i>A. nidulans</i> . ....	53
4.4. Extracción de DNA plasmídico de <i>E.coli</i> . ....	54
4.5. Extracción de RNA total.....	54
4.6. Síntesis y aislamiento de cDNA. ....	55
4.7. Southern-blot. ....	55
4.8. Northern-blot. ....	56
5. Manipulación de proteínas. ....	57
5.1. Extracción de proteína total de <i>A. nidulans</i> . ....	57
5.2. Ensayo <i>in vitro</i> de desfosforilación. ....	58
5.3. Western-blot. ....	59
5.4. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> . ....	60
5.5. Experimentos de "pull-down". ....	60
6. Microscopía de fluorescencia.....	61
7. Herramientas bioinformáticas.....	62
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
<b>SECCIÓN I</b> .....	<b>65</b>
1. Identificación de regiones funcionales mediante el análisis de formas truncadas de CrzA. ....	65
1.1. Expresión constitutiva de construcciones mutantes de <i>crzA</i> para el estudio de regiones funcionales. ....	65
1.2. Reemplazamiento génico de construcciones mutantes de <i>crzA</i> . ....	68

---

2. Modificación postraduccional de CrzA: Metodología para su detección. ....	70
2.1. Determinación de la movilidad electroforética de CrzA. ....	71
2.2. Alteraciones en el perfil electroforético de CrzA inducidas por calcio y pH alcalino. ....	75
3. CrzA es desfosforilado por la fosfatasa Calcineurina. ....	76
3.1. Detección de formas fosforiladas de CrzA. ....	77
3.2. La calcineurina es la principal fosfatasa de CrzA. ....	78
3.3. La región amino-terminal de CrzA es desfosforilada por la calcineurina. ....	80
3.4. Identificación de dominios de unión a la calcineurina en la estructura primaria de CrzA. .	82
3.5 La eliminación de dominios de unión a la calcineurina modifica el patrón electroforético del factor transcripcional. ....	84
4. Identificación de quinasas involucradas en la fosforilación de CrzA. ....	87
4.1. La quinasa CkiA participa en la señalización de CrzA. ....	87
4.2. Papel de la quinasa GskA en la ruta de señalización de CrzA. ....	89
4.2.1. Identificación y caracterización de la quinasa GskA en <i>A. nidulans</i> . ....	90
4.2.2. GskA modifica el estado de fosforilación de CrzA. ....	94
<b>SECCIÓN II</b> .....	<b>99</b>
1. CrzA modifica su localización celular ante ciertos estímulos abióticos. ....	99
1.1. Señales que promueven cambio en la localización celular de CrzA. ....	99
1.2. La duración e intensidad de la respuesta de CrzA depende del estímulo. ....	102
2. Papel de la calcineurina en la señalización celular de CrzA. ....	105
2.1. La actividad de la calcineurina es necesaria para el transporte nuclear de CrzA. ....	105
2.2. La calcineurina interacciona <i>in vitro</i> con CrzA. ....	106
3. Análisis de los sitios CDD en la señalización celular de CrzA. ....	108
3.1. El dominio CDD2 modula la localización celular de CrzA en respuesta a estrés. ....	108
3.2. El dominio CDD2 media la interacción <i>in vitro</i> de CrzA con la calcineurina. ....	111
4. Papel de las kinasas CkiA y GskA en la localización celular de CrzA. ....	112
5. Localización de señales implicadas en el transporte nucleocitoplásmico de CrzA. ....	115
5.1. CrzA porta señales de exportación e importación nuclear. ....	115
5.2. La calcineurina regula la localización celular de CrzA a través de elementos reguladores presentes en su región N-terminal. ....	117
5.3. Identificación de una NLS en CrzA. ....	120
6. Estudio de transportadores nucleares. ....	123
7. Señalización de los elementos reguladores en <i>trans</i> de CrzA. ....	126

## Índice

---

7.1. Estudio de la calmodulina y de la calcineurina en respuesta a estrés. ....	126
7.2. Estudio de las quinasas CkiA y GskA en respuesta a estrés. ....	130
<b>SECCIÓN III</b> .....	<b>135</b>
1. Regulación génica en la respuesta al estrés alcalino. ....	135
1.1. Mutaciones supresoras de resistencia a pH alcalino. ....	135
1.2. Segunda selección de mutantes pH8R, aislamiento de un nuevo alelo mutante <i>rcoA</i> . ....	138
1.3. Caracterización del cDNA del locus AN6505. ....	141
1.4. Generación de cepas portadoras de alelos mutantes de <i>rcoA</i> . ....	143
2. Regulación de la expresión génica en respuesta a la presencia de calcio. ....	145
2.1. Identificación de transportadores de calcio en <i>A. nidulans</i> como dianas de la actividad transcripcional de CrzA.....	145
2.2. Análisis transcripcional de genes regulados por calcio y por CrzA. ....	147
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>153</b>
1. Modelo de señalización de CrzA en <i>A. nidulans</i> y en otros sistemas similares.....	153
2. Señalización de CrzA.....	157
2.1. Modificaciones postraduccionales de CrzA.....	157
2.2. Elementos en cis y en trans que median en la señalización de CrzA. ....	161
2.2.1. Elementos en cis.....	161
2.2.2. Elementos reguladores que actúan en trans .....	168
2.3. Dónde y cómo ocurre la señalización de CrzA. ....	171
2.3.1. Señales de localización celular. ....	171
2.3.2. El proceso de la transducción de la señal.....	172
3. Señales que activan la respuesta de CrzA. ....	175
3.1. Posible papel del calcio citosólico en la señalización de CrzA. ....	175
3.2. Dinámica en la señalización de CrzA. ....	176
3.3. Respuesta espacio-temporal de la señal de calcio.....	177
4. Respuesta transcripcional de CrzA. ....	178
4.1. La respuesta transcripcional al calcio.....	178
4.2. Mecanismo de regulación transcripcional en respuesta al pH alcalino.....	181
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>187</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>191</b>

## **SUMMARY**



Summary of the report entitled "*Molecular and cellular mechanisms that regulate the function of CrzA transcription factor in response to ambient stress*" for Doctorate in Science of MSc Patricia Hernández Ortiz

## **1. Introduction.**

Communication with environment is an essential function for living organisms. In the case of microorganisms they are in direct contact with ambient and are immediately influenced by alterations into it (Serrano, 1996). These organisms have developed homeostatic systems that are intra and extracellular mechanisms to attenuate changes in environment. Abiotic stresses are caused by natural elements but not produced directly by other organisms. Among them, and more interesting for this work, are free mono or divalent cations, and pH, which is a direct effect of monovalent cation hydrogen (Serrano, 1996). Microorganisms are also classified accordingly to their capacity to tolerate cations, usually considered in their saline forms. *Aspergillus nidulans*, the model genetic organism used in this thesis, is able to tolerate moderate quantities of a wide range of mono and divalent cations, ranging from one molar concentration of sodium or potassium, half a molar of magnesium or lithium, and for others, like manganese or iron, only milli-molar concentrations are tolerated (Hagiwara *et al.* 2008; Spielvogel *et al.* 2008). Interestingly, calcium, an important cation because participates as secondary messenger in many intracellular regulatory and signalling pathways, is tolerated to a one molar concentration, condition that it is outstanding ((Clapham, 1995) and this work). The ability to tolerate calcium must rely on efficient mechanisms based on selective intracellular transport and storage to prevent undesirable effects of cytoplasmic free calcium (Berridge *et al.* 2000).

An essential  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling mediator is calmodulin (CaM) (Clapham, 2007).  $\text{Ca}^{2+}$  binds and triggers structural rearrangements in CaM which allow the interaction of CaM with its effectors (Chin *et al.* 2000). A key target of CaM is the protein phosphatase calcineurin which is a heterodimer composed of a catalytic A subunit (CnA) and a regulatory B subunit (CnB) (Guerini, 1997). Among calcineurin substrates is the nuclear factor of activated T cells (NFAT) in higher eukaryotes and Crz transcription factors in fungi (Cyert, 2003; Feske *et al.* 2007). Although calcineurin is the only phosphatase involved in the dephosphorylation of these transcription factors, phosphorylation is carried out by different kinases. At least four different kinases are responsible for NFAT phosphorylation (Gsk3 $\beta$ , CK1, DYRK and PKA) while two kinases have been demonstrated to participate in Crz1p phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* (Hrr25p and PKA) (Feske *et al.* 2007; Kafadar *et al.* 2003; Kafadar *et al.* 2004; Wu *et al.* 2007). The

## Summary

---

phosphorylation state of these proteins controls their nucleocytoplasmic trafficking and this determines their transcriptional activity. Many studies have focused on pathways regulated by calcineurin in fungal models due to the role of calcineurin signalling through Crz transcription factors in virulence and pathogenicity in both plants and animals (Rispaill *et al.* 2009).

### **2. Objectives.**

A seminal work for this thesis was the discovery that in the filamentous fungus *A. nidulans* there are two regulatory systems mediating cation stress response (Spielvogel *et al.* 2008). One mediated by the zinc-finger transcription factor SltA and this is a novel pathway specific of filamentous fungi. SltA activity is required for generating a proper response to a wide range of mono and divalent cations, with the significant exception of calcium. The second pathway was predicted to be conserved among many organisms and is mediated by CrzA, a zinc-finger transcription factor. CrzA activity was associated with response to calcium and manganese but not to other cations. Tolerance to alkalinity probably requires the concerted regulatory activities of CrzA and SltA, in addition to PacC, the well-known regulator that mediates the ambient pH regulatory pathway (Penalva *et al.* 2002; Spielvogel *et al.* 2008).

The main focus of this thesis was a functional study of CrzA and an in-deep analysis of the signalling pathway behind this transcription factor. To pursue this main objective three lines of research were proposed:

1. Analyse at both cellular and molecular levels the response mediated by CrzA to different abiotic stimuli, essentially calcium and alkalinity. Post-translational modifications and cell localization changes of this transcription factor will be determined.
2. Identify and characterise *cis*- and *trans*-acting elements in the activation and deactivation processes of CrzA function.
3. Determine the regulatory mechanisms of gene expression in the adaptation to ambient stress which are related to the transcriptional activity of CrzA.

### **3. Results.**

The results section is divided into three chapters. In the first chapter diverse studies approach how signalling of CrzA is exerted at the molecular level. A deletion analysis allowed the identification of functional regions. As expected the DNA binding motif is essential for CrzA function but requires the N-terminal region for providing adequate response to calcium and

alkalinity. Interestingly, the C-terminal region absent from yeast Crz proteins, also allows functionality of a truncated CrzA version when over expressed but not if expressed from *crzA* promoter ((Spielvogel *et al.* 2008) and this work). Calcineurin is required for CrzA function and over-expression of this transcription factor (TF) does not suppress null-calcineurin derived phenotypes such as the strong defect on colony radial growth or sensitivity to certain cations and alkalinity. CrzA is a phospho-protein and calcineurin activity influences its modification stages. Absence of calcineurin allows detection of a hyperphosphorylated form that shows a strong reduced mobility in denaturing polyacrylamide-gel electrophoresis. Calcineurin acts on CrzA through the functional N-terminal region present in this TF. Two calcineurin docking domains (CDD) have been studied in CrzA. CDD1, a putative double binding site for calcineurin, was identified because of similarity to CDD described in other Crz proteins (Roy *et al.* 2007). However, CDD1 is not functional and a CDD2 showing sufficient similarity to consensus calcineurin binding sites was detected downstream of CDD1 and analysed. CDD2 is a functional site and calcineurin binds to CrzA through this motif, however a remnant activity of calcineurin is still detectable on a protein lacking CDD2.

The opposed activity of calcineurin on CrzA is likely to be exerted by several kinases. The role of two kinases on CrzA has been studied using partial or complete loss of function mutants. Mutants in casein kinase I homologue in *A. nidulans*, CkiA have been analysed for their effects on CrzA electrophoretic mobility. CkiA is required for proper modification of CrzA but its absence does not affect functionality of the transcription factor. In this thesis the homologue of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  has been identified and characterised in *A. nidulans*, and named GskA. Absence of GskA activity greatly affects colonial growth, conidia germination and polarised growth of hyphae is also altered. When analysing posttranslational modifications in CrzA, the absence of GskA increases electrophoretic mobility of CrzA under non stressing conditions. However the functionality of CrzA is not completely abolished.

In the second chapter the cellular signalling of CrzA is analysed. Nuclear entry of CrzA is a major regulatory step. Using fluorescent tagged versions of CrzA this work demonstrates that this TF is accumulated intranuclearly in response to a selected number of stresses. Divalent cations as calcium and manganese induced nuclear accumulation of CrzA but not the addition of large amounts of alkali cations such as sodium or potassium, and the divalent cation magnesium. Sensitivity of null *crzA* strains to alkalinity is a phenotype consequence of need of CrzA into nuclei when extracellular pH is alkaline, however medium acidification does not modify the cellular localisation of this TF. Calcineurin activity is responsible of this signalling and in the absence of this phosphatase CrzA remains cytoplasmic and excluded from nuclei at any ambient condition. The

## Summary

---

role of CDDs were studied by generating mutant versions lacking these sites, and, in agreement with functional analyses, CDD2 is required for nuclear migration of CrzA in response to both calcium and alkaline pH stimuli. Nuclear accumulation of CrzA is based on the activity of at least two nuclear localisation signals (NLS). Calcineurin must regulate both NLSs when N-terminal domain is present. An NLS, denoted as NLS1, has been identified by deletion analysis in the proximity of CrzA DNA binding domain between residues 487 and 492. A nuclear export sequence (NES) is also present in CrzA and responsible of nuclear exclusion in the absence of a proper stimulus as indicated above. NES locates in the N-terminal region probably in the proximity of NLS2, however the identity of both signals remains to be determined. Following the regulatory model of yeast Crz1p the role of both homologues for nuclear transport in *A. nidulans* have been studied by using the collection of strains carrying single null alleles in karyopherins (Cyert, 2003; Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011). Apparently, CrzA nuclear import and export systems are not conserved with those described for Crz1p.

Calcineurin must regulate the activity of the export sequence, most probably by inhibiting its activity because absence of calcineurin prevents nuclear entry but not export of CrzA. A strong phosphorylated state of CrzA must be responsible of maintaining NES activity. A reduction of CkiA activity does not prevent nuclear export of CrzA neither affects nuclear entry in response to stress, and this suggests that nucleocytoplasmic transport systems are not altered in CkiA mutants. Absence of GskA activity prevents nuclear accumulation of CrzA in response to alkalinity, but neither nuclear accumulation in response to calcium stress nor nuclear export in the absence of stress are affected. These results clearly state that a precise, GskA mediated, phosphorylation step is required for nuclear accumulation of CrzA at alkaline pH.

Calcium and alkalinity signalling induces a change in the cellular localisation of CrzA. To determine the effect of these stresses in other components of the CrzA signalling pathway, fluorescent tagged versions of calmodulin, calcineurin, CkiA and GskA were constructed and their localisation studied either in the absence or presence of stress. The locations of all these components remained unaltered after induction of stress. Calmodulin preferentially accumulated at the tip of the cell and calcineurin distributed homogenously through the cytoplasm sharing also localisation at the tip with calmodulin. GskA is mainly cytoplasmic and excluded from nuclei. Finally, CkiA was found accumulated in nuclei. Thus, CrzA is the only component of this regulatory pathway that significantly modifies its location in response to stress.

The final part of this thesis is dedicated to the analysis of the regulatory effect of CrzA at alkaline pH or in the presence of elevated concentrations of calcium. To approach the role of CrzA

in alkalinity, suppressors of the alkaline-pH sensitive phenotype caused by the null *crzA* allele were isolated. Spontaneous sectors arising from point inoculations on alkaline medium of null *crzA* strain were analysed. Mutants derived from those sectors displayed suppression of the alkaline-pH sensitive phenotype but also of the calcium sensitive phenotype, however for this work only the formers were studied and were denoted as pH8R mutants. Using classical genetics the pH8R-2 mutation was mapped to chromosome I and using the genome database the gene where this mutation maps was identified as the TUP1 homologue in *A. nidulans*, *rcoA* (Hicks *et al.* 2001). pH8R-2 mutation was determined and revealed a possible alternative splicing regulatory system in *rcoA*. These results indicate a major role of chromatin organisation in the transcriptional regulation of those genes required for a proper response to alkalinity, which in addition must be regulated directly or indirectly by CrzA.

To assess the role of CrzA in calcium homeostasis the transcriptional profiles of putative vacuolar calcium exchangers, VXC genes, and of vacuolar cation channels of family YVC, were analysed (Cyert *et al.* 2013). This study revealed that calcium induced the expression of only two members of the VXC family, *vcxA* and AN5821. An intermediate calcium concentration plays a positive role in the expression of both genes, and CrzA is responsible for this positive regulation. An elevated calcium concentration plays a reverse role and expression of *vcxA* and AN5821 remains as low as under non stressing conditions and absence of CrzA upregulated the expression of both genes. These results suggested the existence of a calcium-CrzA regulation acting on a selected number of putative intracellular calcium channels. A correct transcriptional regulation of both calcium transporters might play a role in calcium tolerance by *A. nidulans*.

#### **4. Discussion.**

The starting point of this work was the analysis of CrzA using reverse genetic techniques. CrzA locus was identified by *in silico* searches and a null *crzA* strain was generated and characterised. This thesis is focused in the functional analysis of CrzA and the description of its signalling pathway. Three essential topics are discussed.

*1) Conservation and divergence of calcineurin/transcription factor signalling pathways.* This work fully demonstrates that CrzA is a member of the calcineurin responsive zinc-finger family of transcription factors (Cyert, 2003). This is a fungal family but calcineurin also signals other transcription factors in higher eukaryotes such as NFATs (Feske *et al.* 2007). This study identifies similarities among signalling elements. Calcineurin is, perhaps, the main element in these pathways and this activity is always positive and targeted to the transcription factor. As a

## Summary

---

phosphatase, the TF must become dephosphorylated to become active. Opposed to calcineurin activity is the phosphorylating activity due to a number of kinases. Here, casein kinase I (CKI) and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) activities are shown to be related to CrzA signalling. Interestingly, in the model of CrzA phosphorylation CKI activity is in common with signalling of Crz1p in *S. cerevisiae* and GSK3 $\beta$  activity is with the NFAT pathway (Beals *et al.* 1997; Kafadar *et al.* 2003). Phosphatase and kinase activities modify the transcription factor and at least five different phosphorylation states are described for CrzA, which must be modulating the cellular location of this TF in response to a restricted number of stresses. Although much effort has been made to understand how phosphorylation state restricts nuclear or cytoplasmic localisations, a direct correlation has not been established between these two cellular processes. This fact is in agreement with recent studies in the other calcineurin mediated pathways. When compared CrzA and yeast Crz1p signalling pathways, nuclear import and export pathways are not conserved. CrzA, as Crz1p or NFAT, locates in the cytoplasm in the absence of stimulus and translocates in the nucleus in response to a signal (Cyert, 2003; Feske *et al.* 2007). A nuclear export signal is present in addition to, as in the other systems, alternative nuclear localisation signals. The nuclear export pathway acting on Crz1p depends on the Msn5p karyopherin, but its homologue, KapL, in *A. nidulans* seems not to be the nuclear carrier mediating nuclear export of CrzA. Similarly, the putative homologous pathway of Nmd5p, KapD in *A. nidulans*, is not responsible of nuclear transport of CrzA. It is possible that nucleocytoplasmic trafficking of CrzA might be more similar to those described for NFATs where general transport pathways are involved. Conservation between CrzA and Crz1p signalling pathways is evident, however differences found in CrzA pathway strongly support a broader study of these pathways in order to fully understand this important regulatory mechanism of transcription in other fungi.

*II) The transcription factor is a bottle neck of signalling and response.* Cellular-localisation studies of the different signalling elements of CrzA state that the transcription factor is the only element with distinctive mobility in response to calcium or alkalinity. This modification of cellular localisation is mediated by changing the post-translational state of this transcription factor. The absence of conserved regions between Crz1p and CrzA, excluding the DNA binding domain, precludes the identification of functional regions by a mere comparison of sequences (Spielvogel *et al.* 2008). Functional analyses demonstrate the importance of the N-terminal part of CrzA for signalling where the presence of a NES and two NLSs must regulate its localisation. Possibly, calcineurin docks to a sequence located among such signals in CrzA. A CDD similar to consensus low affinity sites for *S. cerevisiae* calcineurin has been identified in CrzA, suggesting that similar but alternative molecular mechanisms differentiate both fungal phosphatases (Roy *et al.* 2007).

The N-terminal region of CrzA is subjected to phosphorylation and numerous potential target residues for known kinases are found in its sequence. Particularly of interest was the fact that the greater number of potential sites for phosphorylation were for a GSK3 $\beta$  homologue. This prompted us to characterise and analyse the role GskA on CrzA signalling. The altered mobility of CrzA in the absence of GskA does not correlate with the elevated number of target sites, indicating that a restricted number of those sites are recognised by this kinase. Interestingly in NFATs, GSK3 $\beta$  activity is driven by a preceding phosphorylating activity (Okamura *et al.* 2004). Such signalling mechanism might also occur in CrzA because in the absence of GskA, CrzA is still modified. A possible candidate for this additional activity in fungi is the cAMP-dependent protein kinase A, PkaA. A single site for CKI is found in the N-terminal region of CrzA being then the predicted site for CkiA regulatory activity. The distinctive localisation of CkiA and GskA might define also different regulatory events in CrzA in nuclei and cytoplasm, respectively. Our regulatory model for CrzA includes CkiA and GskA kinase activities probably acting in a concerted manner or, alternatively, in combination with other protein kinase activities such as PkaA. Altogether, these kinases must be regulating and mediating the proper response to calcium and alkalinity.

*III) Regulatory models for alkaline pH and cation stress responses based on CrzA modulation.* Because CrzA is a zinc-finger transcription factor its final activity must be closely related to transcriptional regulation. CrzA is needed for response to alkalinity and calcium. Meanwhile a prediction of genes involved in calcium regulation is immediate, ie. calcium transporters or channels. Meanwhile, those genes mediating response to alkalinity are not of easy recognition. A role of chromatin in alkaline-pH response through CrzA has become a fact in this study. The negative effect of CrzA DNA binding domain when expressed alone suggested an unregulated function for this domain through its interference in gene expression. In our model, nuclear CrzA might bind to promoters of genes whose products are required for tolerance to alkalinity. Absence of CrzA reduces the expression of these genes and we observed that the absence of a fully functional RcoA protein, a known transcriptional repressor (Hicks *et al.* 2001), might compensate for the loss of this positive action of CrzA. However, our mutant analysis gives a broader view of RcoA activity and a new model for this chromatin remodelator is open in *A. nidulans*. Finally, identification of vacuolar calcium transporters as targets of calcium regulation has been successful. Vacuolar influx but not efflux must be transcriptionally regulated by calcium and CrzA. An interesting dual effect of calcium is observed. Low concentrations are acting in a positive manner, meanwhile high concentrations repress expression of AN5821 and *vcxA*. These results indicate the existence of alternative mechanisms sensing calcium as second messenger

## Summary

---

(low concentrations) and calcium as a source of cation stress. In the latter, CrzA seems to play a major role because CrzA is not necessary to support growth with calcium concentrations below 10mM (low concentration tested here), however a positive effect of this TF is observed. Future analysis of AN5821 and *vcxA* may clarify the mechanisms underlying calcium signalling at the transcriptional level and how concentration is sensed and signalised.

## **5. Conclusions.**

1. CrzA is modified post-translationally through, at least, phosphorylation of residues located at the N-terminal region to the DNA binding domain. Five different modified states of this TF have been detected by electrophoretic techniques in protein extracts from mycelia grown in different media conditions and of diverse mutant backgrounds.

2. CrzA is a target for the phosphatase calcineurin and CnaA is the catalytic subunit in *A. nidulans*. CnaA recognizes a motif present in the TF which is necessary for the complete dephosphorylation activity.

3. *A. nidulans* casein kinase I, CkiA, and GskA, the *A.nidulans* Gsk3 $\beta$  homologue, are involved in CrzA post translational modifications.

4. High concentrations of calcium and manganese, and alkalinization of the extracellular medium are signals that induce nuclear accumulation of CrzA. CnaA activity is required for this transcriptional factor to respond to these stresses and GskA activity is required for proper nuclear accumulation at alkaline pH stress.

5. Calmodulin, calcineurin (catalytic subunit), and kinases CkiA and GskA maintain their cellular localizations in those environmental conditions that induce nuclear accumulation of CrzA. Therefore, the transcription factor is the only element in this pathway that modifies its cellular localization in response to stress.

6. CrzA displays two opposed cellular locations, nuclear accumulation in the presence of stress and nuclear exclusion under non-stressing conditions. At least one nuclear export signal and two nuclear localization signals are present in the primary structure of CrzA and this functional organization is conserved with Crz and NFAT transcription factors from yeast and higher eukaryotes, respectively. Nevertheless, nuclear transport systems are likely not conserved between *S. cerevisiae* and *A. nidulans*.

7. CrzA is required by the fungus for tolerance to environmental alkalization. The transcriptional repressor RcoA is involved in this pH-dependent regulation of gene expression. Alternative splicing of *rcoA* mRNA processing results in two forms with different length of RcoA. One of these forms could be responsible for the regulation, perhaps negative, of the expression of genes required for tolerance to alkaline pH.

8. It has been investigated the role of calcium and CrzA in the regulation of genes coding for calcium vacuolar transporter. We have identified and analyzed the expression of four genes coding for putative homologues of low affinity transporters VCX and YVC. Only two VCX-like carriers, *vcxA* and *AN5821*, are regulated by calcium and CrzA. Low concentration of calcium induces the expression of these genes while a high concentration has a negative effect. CrzA could be mediating both opposite transcriptional effects.

## **6. Bibliography.**

**Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR.** 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* **275**, 1930-1934.

**Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1**, 11-21.

**Chin D, Means AR.** 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10**, 322-328.

**Clapham DE.** 1995. Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268.

**Clapham DE.** 2007. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-1058.

**Cyert MS.** 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **311**, 1143-1150.

**Cyert MS, Philpott CC.** 2013. Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**, 677-713.

**Feske S, Rao A, Hogan PG.** 2007. The Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signalling pathway. In: Krebs J, Michalak M, eds. *Calcium: a matter of life or death*, Elsevier.

**Guerini D.** 1997. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **235**, 271-275.

**Hagiwara D, Kondo A, Fujioka T, Abe K.** 2008. Functional analysis of C2H2 zinc finger transcription factor CrzA involved in calcium signaling in *Aspergillus nidulans*. *Curr.Genet.* **54**, 325-338.

**Hicks J, Lockington RA, Strauss J, Dieringer D, Kubicek CP, Kelly J, Keller N.** 2001. RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol.Microbiol.* **39**, 1482-1493.

## Summary

---

**Kafadar KA, Cyert MS.** 2004. Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot.Cell* **3**, 1147-1153.

**Kafadar KA, Zhu H, Snyder M, Cyert MS.** 2003. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev.* **17**, 2698-2708.

**Markina-Inarrairaegui A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Araujo-Bazan L, Fernandez-Martinez J, Flores JA, Osmani SA, Espeso EA.** 2011. Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Biol.Cell* **22**, 3874-3886.

**Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A.** 2004. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol.Cell Biol.* **24**, 4184-4195.

**Penalva MA, Arst HN, Jr.** 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**, 426-46, table.

**Rispail N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grunler A, Huguet R, Perez-Nadales E, Poli A, Sartorel E, Valiante V, Yang M, Beffa R, Brakhage AA, Gow NA, Kahmann R, Lebrun MH, Lenasi H, Perez-Martin J, Talbot NJ, Wendland J, Di PA.** 2009. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal.Genet.Biol.* **46**, 287-298.

**Roy J, Li H, Hogan PG, Cyert MS.** 2007. A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and in vivo function. *Mol.Cell* **25**, 889-901.

**Serrano R.** 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int.Rev.Cytol.* **165**, 1-52.

**Spielvogel A, Findon H, Arst HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P, Stahl U, Meyer V, Espeso EA.** 2008. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SlrA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem.J.* **414**, 419-429.

**Wu H, Peisley A, Graef IA, Crabtree GR.** 2007. NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends Cell Biol.* **17**, 251-260.

# **INTRODUCCIÓN**



## **1. Respuesta al estrés ambiental por cationes y pH en *Aspergillus nidulans*.**

*Aspergillus nidulans* es un microorganismo con una gran versatilidad metabólica y fisiológica que le permite sobrevivir en una gran variedad de condiciones ambientales. La capacidad de adaptación al medio se debe a la existencia de un eficiente mecanismo homeostático que mantiene los niveles de iones intracelulares relativamente constantes. Dos mecanismos esenciales para la supervivencia del hongo son la tolerancia al estrés salino y la adaptación a variaciones del pH ambiental.

La tolerancia al estrés salino conlleva el mantenimiento de una composición intracelular constante indispensable en cualquier sistema biológico. Esta composición intracelular 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 (Serrano, 1996). La tolerancia al estrés salino se consigue mediante complejas rutas homeostáticas que involucran el tráfico de los iones a través de las membranas biológicas (Cyert *et al.* 2013). Por otra parte, las células de *A. nidulans* son capaces de tolerar un amplio rango de valores de pH ambiental, desde pH 2.5 hasta 10.5 (Rossi *et al.* 1990). Esta adaptación viene determinada por una regulación transcripcional de genes de expresión preferente en condiciones de pH ambiental ácido o alcalino que asegura la síntesis proteica de aquellos elementos celulares necesarios para el mantenimiento de un pH intracelular constante (Caddick *et al.* 1986b).

El factor transcripcional PacC y los elementos de la ruta de transducción de señales Pal fue el primer sistema de regulación de la expresión génica por pH ambiental descrito en *A. nidulans* (Caddick *et al.* 1986b). Posteriormente se han identificado otros sistemas de respuesta génica al pH ambiental mediado por los factores de transcripción SlrA y CrzA, responsables además de la tolerancia al estrés salino (Spielvogel *et al.* 2008).

### **1.1. Regulación génica en respuesta al estrés ambiental mediado por PacC.**

El modelo de regulación génica en respuesta al pH ambiental mediado por PacC establece que PacC actúa como un represor transcripcional de los genes que se expresan preferentemente a pH ácido (genes “ácidos”) (Caddick *et al.* 1986b) y como un activador transcripcional de los genes que se expresan preferentemente a pH alcalino (“genes alcalinos”) (Caddick *et al.* 1986a; Espeso *et al.* 1993; Espeso *et al.* 1996). Para llevar a cabo este papel dual en la célula, la actividad de PacC está regulada por un proceso de activación y desactivación en el que interviene la ruta

*pal* de transducción de señal a pH ambiental, formada por los productos de los genes *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI* (Penalva *et al.* 2002). En respuesta a la alcalinización del medio, los productos codificados por los genes *pal* activan una cascada de señales que desencadenan la activación de PacC, el cual promueve la expresión de genes “alcalinos” y la represión de genes “ácidos” (Espeso *et al.* 1996). En condiciones de pH ácido, PacC se encuentra en su forma inactiva, de forma que no se induce la represión transcripcional de los genes “ácidos” ni la activación de los genes “alcalinos” (Espeso *et al.* 2000).

Este control de la expresión génica mediada por el pH asegura que las distintas permeasas, enzimas extracelulares y metabolitos secretados se sinteticen sólo cuando el pH ambiental se acerca a su pH óptimo de actividad y sea necesaria su función para la adaptación al medio extracelular (Penalva *et al.* 2002). Entre los genes “ácidos” se encuentran los que expresan la fosfatasa ácida, *pacA*, o la permeasa de GABA, *gabA*, que permite el empleo del GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) como fuente de nitrógeno a pH ácido pero no a pH alcalino (Bailey *et al.* 1979). Alguno de los genes que se expresan a pH alcalino son los que codifican para la fosfatasa alcalina, *palD*, o para las dos primeras enzimas de la ruta de biosíntesis de la penicilina, la  $\delta$ -(l- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa, *acvA*, y la isopenicilina N-sintetasa, *ipnA* (Caddick *et al.* 1986a; Espeso *et al.* 1993; Espeso *et al.* 1996).

PacC es un factor transcripcional que posee un dominio de unión a DNA formado por tres dedos de zinc de tipo  $C_2H_2$  (Tilburn *et al.* 1995). Existen tres formas fisiológicas de PacC, denominadas en función de su peso molecular, PacC<sup>72</sup> (72kDa), PacC<sup>53</sup> (53kDa) y PacC<sup>27</sup> (27kDa). Cuando el pH extracelular se alcaliniza, la ruta *pal* de transducción de señales provoca la activación proteolítica en dos pasos de PacC. En un primer suceso proteolítico PacC<sup>72</sup>, que corresponde al producto codificado por el gen *pacC*, es convertido en PacC<sup>53</sup> mediante una proteasa que responde a la señal de pH. Seguidamente PacC<sup>53</sup> es procesado a PacC<sup>27</sup> en un segundo paso independiente del pH. La forma procesada resultante, PacC<sup>27</sup>, es la forma funcional capaz de activar la expresión de los genes “alcalinos” y de prevenir la de los genes “ácidos”. En condiciones de crecimiento a pH ácido no se produce la proteólisis de PacC, predominando la forma PacC<sup>72</sup> que carece de actividad transcripcional que promueva o reprima la expresión de los genes “alcalinos” o “ácidos” respectivamente.

Además de modular su actividad transcripcional, el procesamiento proteolítico determina la localización celular de PacC (Mingot *et al.* 2001). En ausencia de señal de pH alcalino, la forma PacC<sup>72</sup> 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 localización nuclear tanto del intermediario PacC<sup>53</sup> como de la forma transcripcionalmente activa PacC<sup>27</sup>. Por lo tanto la regulación génica en respuesta al pH ambiental mediado por PacC se lleva a cabo mediante una cascada de señales que promueven cambios moleculares y celulares de este factor transcripcional.

## 1.2. Regulación génica en respuesta al estrés ambiental mediado por SltA.

Otro mecanismo implicado en la regulación de la expresión génica en respuesta a pH en *A. nidulans* es el mediado por SltA. Esta proteína no sólo ejerce un papel en la tolerancia al estrés alcalino si no que es esencial para la tolerancia al estrés salino. La pérdida de función de *sltA* produce la sensibilidad a diversos cationes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, hipersensibilidad a neomicina además de impedir el desarrollo del hongo condiciones de pH alcalino (Spielvogel *et al.* 2008). Por el contrario, *sltA* no participa en la tolerancia a elevadas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en el medio extracelular si no que la combinación de mutaciones de pérdida de función en *sltA* y *hala*, que codifica para una quinasa, da lugar al requerimiento nutricional de Ca<sup>2+</sup> o auxotrofia de calcio (Findon *et al.* 2010). Asimismo, las células nulas de *sltA* muestran una hipertrofia del sistema vacuolar que es solventado por la adición de elevadas concentraciones de Ca<sup>2+</sup>.

El gen *sltA* codifica para un factor transcripcional cuyo dominio de unión a DNA está formado por tres dedos de zinc de tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Spielvogel *et al.* 2008). La secuencia aminoacídica de SltA presenta en la región del dominio de unión a DNA un alto grado de similitud a la proteína Ace1, represor transcripcional de los genes que codifican para la celulasa y la xilanasas en *Hypocrea jecorinia* (*Trichoderma reesei*). No ha sido identificado homólogo para el gen *sltA* en levaduras.

En *A. nidulans* SltA muestra una función activadora de la expresión génica de *enaA* y una función represora de los genes *vcxA*, *pmcA* y *pmcB* (Findon *et al.* 2010; Spielvogel *et al.* 2008). Los genes *ENA1-4* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, codifican para Na<sup>+</sup>-ATPasas de tipo P que permiten la tolerancia al estrés salino controlando los niveles citoplásmicos de Na<sup>+</sup>. El homólogo de *vcxA* en *S. cerevisiae*, *Vcx1*, codifica para un transportador vacuolar de antiporte Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> de baja afinidad mientras que *PMC1*, el homólogo de *pmcA* y *pmcB*, codifica para una Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de alta afinidad y tanto *Vcx1* como *PMC1* participan en el control de las concentraciones citosólicas de Ca<sup>2+</sup> (Cunningham *et al.* 1994). La baja expresión de la Na<sup>+</sup>-ATPasa *EnaA* puede explicar parcialmente la sensibilidad a cationes de las cepas nulas de *sltA*. Asimismo, el fenotipo de auxotrofia de calcio se puede explicar por una baja disponibilidad de Ca<sup>2+</sup> citosólico a consecuencia de un exceso de su acumulación en las vacuolas ya que la pérdida de función de

*pmcA* y *pmcB* suprime el elevado requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en las cepas nulas para *sltA* y *halA*. Además, empleando métodos de genética clásica y genética reversa se identificaron mutaciones que suprimían la auxotrofia del calcio en los genes *nhaA* y *trkB*, cuyos homólogos en la levadura, *NHA1* y *TRK1*, codifican para un transportador de membrana de antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y un transportador de  $\text{K}^+$  de alta afinidad, respectivamente (Banuelos *et al.* 1998).

La ruta de señalización de SltA no está aún descrita pero estudios realizados en el laboratorio han permitido identificar un mecanismo de activación de SltA mediado por un procesamiento proteolítico de la proteína. A diferencia de PacC, el procesamiento de SltA se produce independientemente de las condiciones ambientales. Existen dos formas fisiológicas de SltA, denominadas en función de su peso molecular, SltA<sup>78</sup> (78kDa), que corresponde al producto primario de la traducción del transcrito del gen *sltA*, y SltA<sup>32</sup> (32kDa), que corresponde a la forma procesada de SltA. Además para la correcta señalización de SltA se necesita la presencia de la proteína reguladora SltB, formada por un dominio pseudoquinasa y un dominio proteasa. La pérdida de función de *sltB* produce el mismo fenotipo de sensibilidad a cationes y a estrés alcalino que la pérdida de función del factor transcripcional SltA.

### 1.3. Regulación génica en respuesta al estrés ambiental mediado por CrzA.

El tercer componente implicado en la regulación transcripcional en respuesta al estrés por pH es el mediado por CrzA. CrzA ejerce un papel en la homeostasis catiónica complementaria a la que posee SltA. Así, el gen *crzA* no es necesario para el crecimiento de *A. nidulans* en presencia de los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  o  $\text{Mg}^{2+}$  mientras que muestra un papel esencial en la tolerancia a los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  o de la alcalinización del medio (Hagiwara *et al.* 2008; Spielvogel *et al.* 2008). Al contrario que *sltA*, la pérdida de función en *crzA* no produce hipersensibilidad al antibiótico neomicina (Spielvogel *et al.* 2008).

CrzA es un factor transcripcional cuyo dominio de unión a DNA también está formado por tres dedos de zinc aunque en esta proteína, dos de ellos son del tipo  $\text{C}_2\text{H}_2$  y el tercer dedo de zinc presenta una estructura atípica CCHC (Spielvogel *et al.* 2008). La secuencia aminoacídica de CrzA se encuentra muy conservada entre los homólogos presentes en hongos filamentosos y el dominio de unión a DNA muestra elevada similitud con el factor transcripcional Crz1p presente en la levadura *S. cerevisiae* (Matheos *et al.* 1997; Spielvogel *et al.* 2008).

CrzA actúa como activador de la expresión génica tanto a niveles basales como en respuesta al estrés por calcio (Hagiwara *et al.* 2008). Entre los genes que están regulados por

CrzA se encuentran los que codifican para la quitina sintetasa de la ruta de biosíntesis de la pared celular, *chsB*, o para el transportador vacuolar de antiporte  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  de baja afinidad descrito anteriormente *vcxA* (Spielvogel *et al.* 2008). La expresión del gen codificado por el locus AN0471.3, que muestra gran similitud de secuencia con el ortólogo Vcx1p en *S. cerevisiae*, también está regulado por CrzA en respuesta a la elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Hagiwara *et al.* 2008). Otros genes que muestran regulación transcripcional mediada por CrzA codifican para homólogos descritos en *S. cerevisiae* con actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de tipo P o relacionadas con el metabolismo del calcio (Hagiwara *et al.* 2008).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han caracterizado los mecanismos que regulan la señalización de CrzA. En el estudio previo realizado en el laboratorio se demostró que, de forma análoga a la ruta de señalización de Crz1p en *S. cerevisiae*, CrzA modifica su localización celular en respuesta al estrés por  $\text{Ca}^{2+}$  (Spielvogel *et al.* 2008).

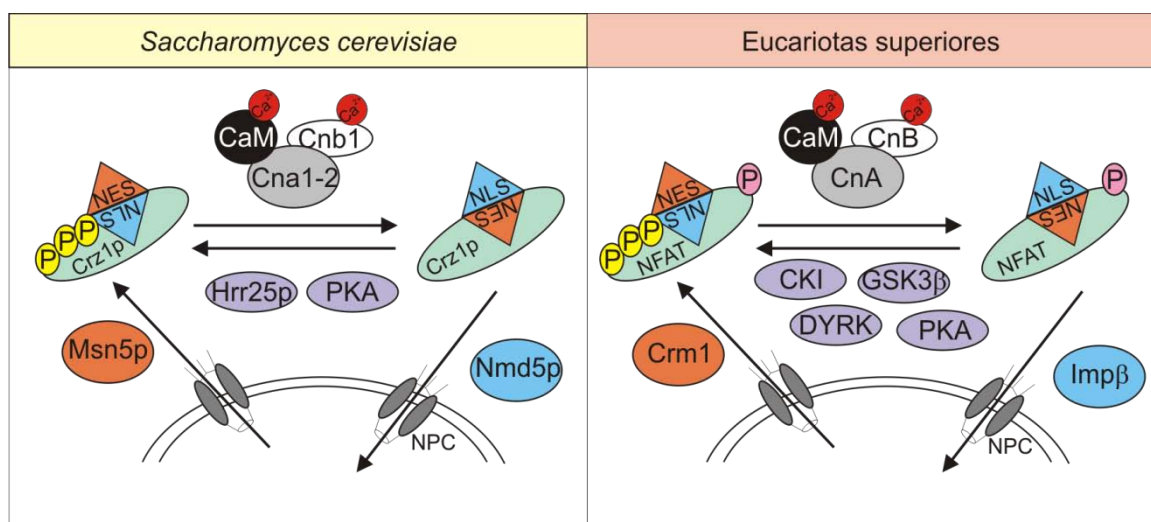
## **2. Modelo de señalización de Crz1p en *Saccharomyces cerevisiae*.**

Frente a una situación de estrés, las células de *S. cerevisiae* activan complejos mecanismos moleculares que conducen a la adaptación al medio extracelular (Serrano, 1996). Uno de estos mecanismos consiste en la regulación de la expresión génica mediada por el factor transcripcional Crz1p (Mendizabal *et al.* 1998). Esta proteína posee un papel esencial en la tolerancia a varios estímulos ambientales como el estrés catiónico por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Li}^{+}$ , la elevación del pH, la exposición prolongada a la luz o la presencia de la feromona ( $\alpha$ -factor) (Mendizabal *et al.* 1998; Stathopoulos *et al.* 1997; Bodvard *et al.* 2013). Cualquiera de estos estímulos desencadena la respuesta celular que produce la activación transcripcional de Crz1p (Yoshimoto *et al.* 2002).

El dominio de unión a DNA del factor transcripcional Crz1p está formado por tres dedos de zinc según el consenso  $\text{C}_2\text{H}_2$  en los dos primeros y un tercer dedo del tipo CCHC (Matheos *et al.* 1997). Crz1p interacciona con la región promotora de los genes diana mediante este dominio, que reconoce y se une al motivo denominado CDRE (calcineurin-dependent response element) formado por la secuencia consenso 5'-  $\text{G}^{\text{A}}/\text{TGGCTG}$ -3' (Matheos *et al.* 1997; Yoshimoto *et al.* 2002). Entre los genes que contienen esta secuencia en su región promotora se encuentran aquellos que codifican para proteínas relacionadas con la homeostasis de iones, el mantenimiento de la pared celular, el transporte vesicular o la señalización celular (Yoshimoto *et al.* 2002; Matheos *et al.* 1997).

La figura I1 muestra el modelo general de señalización de Crz1p. En condiciones de ausencia de estrés, Crz1p se localiza en el citoplasma de las células en un estado fosforilado (Stathopoulos-Gerontides *et al.* 1999). La exposición a estrés ambiental produce un aumento en los niveles citosólicos de calcio debido a una entrada de calcio extracelular a través de canales de la membrana plasmática o por la liberación del calcio acumulado en orgánulos internos (Cyert *et al.* 2013). Tras la elevación de los niveles citosólicos de calcio se produce la desfosforilación de Crz1p y la acumulación del factor transcripcional en el interior nuclear donde desencadena la respuesta transcripcional (Stathopoulos-Gerontides *et al.* 1999). Este mecanismo es reversible, ya que el restablecimiento de la forma fosforilada de Crz1p produce su redistribución por el citoplasma (Stathopoulos-Gerontides *et al.* 1999). La desfosforilación de Crz1p está mediada únicamente por la calcineurina, una fosfatasa cuya actividad depende directamente de la presencia de calcio (ver apartado 3) (Cunningham *et al.* 1994). En el proceso de fosforilación de Crz1p participan la quinasa Hrr25p, proteína homóloga de la Casein Kinase I (CKI) de mamíferos, y la cAMP-dependent protein kinase A (PKA) (Kafadar *et al.* 2003; Kafadar *et al.* 2004).

Las células eucariotas poseen un mecanismo especializado de control del transporte nucleocitoplásmico (Miao *et al.* 2009). Las moléculas mayores de 40KDa requieren un transporte activo a través del complejo del poro nuclear mediados por transportadores, exportinas e importinas, que reconocen señales específicas de transporte, NES (nuclear export signal) y NLS (nuclear localization signal) respectivamente (Miao *et al.* 2009; Pemberton *et al.* 2005). En *S. cerevisiae* el exportador que se encarga de mantener a Crz1p excluido de los núcleos es Msn5p mientras que el importador específico es Nmd5p (Boustany *et al.* 2002; Polizotto *et al.* 2001). La regulación de la localización celular de Crz1p y su estado de fosforilación están estrechamente relacionados. La desfosforilación de residuos alojados en las NLS y NES por la calcineurina produce la activación y desactivación respectivamente de estas señales modificando así su localización celular (Boustany *et al.* 2002; Polizotto *et al.* 2001). La importina Nmd5p es capaz de reconocer e interactuar con la NLS de Crz1p en su estado desfosforilado, promoviendo su importe nuclear (Polizotto *et al.* 2001). La desfosforilación de la NES por la calcineurina y la fosforilación de la NLS por PKA favorecen la disminución de la tasa de importación nuclear de Crz1p y su relocalización en el citoplasma (Boustany *et al.* 2002; Kafadar *et al.* 2004).



**Figura I1: Modelos de regulación de los factores transcripcionales Crz1p y NFAT.** La ruta de transducción de señales  $Ca^{2+}$ -CaM-calciureina desencadena la desfosforilación de los FT en el citoplasma. Este proceso promueve la exposición de señales NLS en la superficie de los FT que permiten su transporte nuclear por las importinas específicas. La acción de las diferentes quinasas sobre Crz1p y NFAT promueve la exposición de la NES que es reconocida por las exportinas para mantener a los FT excluidos del núcleo.

### 3. Modelo de señalización de NFAT en eucariotas superiores.

La familia de proteínas Crz presente entre los componentes del reino Fungi no se encuentra conservada en organismos eucariotas superiores sin embargo existe analogía al modelo descrito en la levadura en la señalización de una familia de factores transcripcionales, los NFAT (Figura I1). En eucariotas superiores la calciureina produce la desfosforilación de los miembros de la familia NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) formada por 5 proteínas (NFAT 1-5) que a su vez presentan varias isoformas (Mancini *et al.* 2009). A pesar de su nombre, en la mayoría de las células de vertebrados se expresan al menos una de las 5 clases de NFAT con funciones en metabolismo celular, secreción de proteínas o diferenciación celular (Crabtree *et al.* 2002). En invertebrados solo se ha identificado el homólogo de NFAT5, donde desempeña una función en la tolerancia al estrés salino (Keyser *et al.* 2007).

Todos los miembros de la familia NFAT comparten una elevada homología en el dominio de unión a DNA, denominado RHR (Rel homology region) por su semejanza al dominio de unión presente en la familia Rel (Chen *et al.* 1998; Mancini *et al.* 2009). Los miembros NFAT 1-4 además contienen un dominio conservado NHR (NFAT homology region) con funciones reguladoras y un dominio TAD (transactivation domain) con función transcripcional (Rao *et al.* 1997).

En ausencia de estimulación, las proteínas NFAT se encuentran en el citoplasma en un estado hiperfosforilado en múltiples residuos conservados distribuidos en motivos ricos en serina de la región NHR (Aramburu *et al.* 1998; Okamura *et al.* 2000). La activación de los NFAT se produce mediante la desfosforilación de algunas de las fosfoserinas alojadas en estos dominios (Aramburu *et al.* 1998). Esta desfosforilación parcial de los NFAT produce un cambio conformacional de la proteína que expone en la superficie una NLS y oculta una NES (Okamura *et al.* 2000). Las señales NLS y NES son reconocidas por la maquinaria de transporte nucleocitoplásmico lo que produce cambios en la distribución celular del FT. La importación de los NFAT a los núcleos está mediada por la importina Imp $\beta$ 1 mientras que es la exportina Crm1 la que realiza el transporte desde los núcleos al citoplasma (Ishiguro *et al.* 2007; Kehlenbach *et al.* 1998).

El estado de activación de los NFAT está controlado por el equilibrio de las formas hiper- e hipo-fosforiladas (Wu *et al.* 2007). La desfosforilación de los NFAT esta mediada por la calcineurina, que es activada tras el aumento de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, promoviendo los cambios conformacionales de los NFAT que inducen la translocación nuclear y la expresión génica (Crabtree *et al.* 2002).

El proceso de inactivación está mediado por varias quinasas que actúan de forma coordinada en la fosforilación de los NFAT (Okamura *et al.* 2000). Estas quinasas se pueden clasificar en aquellas que actúan en el citoplasma para mantener el estado fosforilado en ausencia de estímulos y las que actúan en el núcleo refosforilando los NFAT para promover su exportación nuclear (Feske *et al.* 2007; Wu *et al.* 2007). La exportación nuclear de los NFAT es facilitada por la fosforilación dependiente de quinasas de la familia GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) (Okamura *et al.* 2004). La actividad de GSK3 $\beta$  requiere del reconocimiento de un residuo previamente fosforilado o “prefosforilación” para poder fosforilar a los NFAT de forma eficiente. Esta actividad cebadora puede ser realizada por las quinasas de la familia DYRK (dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase) o de la familia PKA (cAMP-dependent protein kinase A) (Sheridan *et al.* 2002; Gwack *et al.* 2006). En ausencia de estimulación, el mantenimiento de la localización citoplásmica de los NFAT se ve favorecida por la fosforilación mediada por la quinasas CK1 (casein kinase 1) (Okamura *et al.* 2004).

#### **4. Mecanismos reguladores de la calcineurina.**

##### **4.1. Cascada de señalización Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina/Calcineurina.**

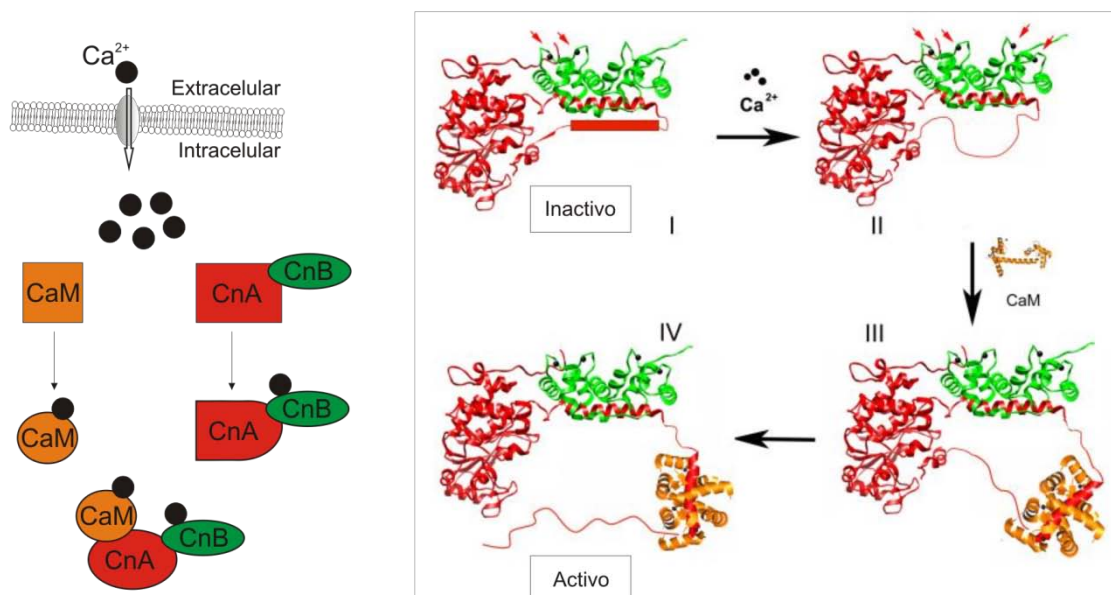
El calcio es un elemento químico que en su forma iónica Ca<sup>2+</sup> actúa como el principal segundo mensajero en la transducción de señales en las células (Clapham, 2007). El ión Ca<sup>2+</sup> tiene baja afinidad por el agua y precipita iones fosfato, el siguiente en importancia como intermediario de las cascadas de señalización, y por lo tanto los niveles de calcio intracelulares deben de estar eficazmente regulados (Clapham, 2007; Hunter, 2012). Las células han desarrollado tanto estrategias dirigidas a la disminución de los niveles de calcio citosólico que puedan resultar tóxicos como mecanismos que permitan su actividad como cofactor (Clapham, 2007; Niki *et al.* 1996). En su papel como segundo mensajero, el catión Ca<sup>2+</sup> se une con elevada afinidad a proteínas que poseen el dominio estructural mano EF (Niki *et al.* 1996). Entre esta gran familia se encuentra la proteína calmodulina, CaM (calcium modulated protein), que es expresada en todos los tipos celulares de los organismos eucariotas y su secuencia se ha conservado evolutivamente (Chin *et al.* 2000). Existen dos formas configuraciones de la calmodulina, la apocalmodulina que no está unida a calcio y la forma Ca<sup>2+</sup>-calmodulina, que está acomplejada con cuatro iones Ca<sup>2+</sup> (Chin *et al.* 2000). El cambio conformacional responde a cambios del orden nanomolar en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> que son suficientes para que la calmodulina exponga dominios funcionales capaces de desencadenar la cascada de señalización (Chin *et al.* 2000; Clapham, 2007). La amplificación de la señal es aún mayor ya que la forma Ca<sup>2+</sup>-calmodulina también es reconocida con gran afinidad por otra familia de proteínas denominadas CaM-regulated proteins que poseen un dominio de unión a la calmodulina (Chin *et al.* 2000).

Entre las proteínas que interactúan con la calmodulina se encuentra la calcineurina, una serina-treonina fosfatasa que se encuentra conservada entre los organismos eucariotas (Guerini, 1997; Niki *et al.* 1996). La calcineurina es un heterodímero formado por una subunidad catalítica A, CnA, y una subunidad reguladora B, CnB (Klee *et al.* 1979). La subunidad CnA por sí sola tiene baja actividad catalítica siendo necesaria la presencia de la subunidad CnB para desempeñar la actividad específica de la fosfatasa (Watanabe *et al.* 1996).

La subunidad CnA contiene una región N-terminal donde reside el sitio catalítico y una región C-terminal que incluye un dominio de unión a CnB, un dominio de unión a CaM y un dominio de autoinhibición (Guerini, 1997). La subunidad reguladora, CnB, posee cuatro dominios de mano EF que unen con gran afinidad iones Ca<sup>2+</sup> (Niki *et al.* 1996). El complejo formado por CnA-CnB es muy estable e independiente de la presencia de iones Ca<sup>2+</sup> (Niki *et al.* 1996; Guerini,

## Introducción

1997). En el estado inactivo de la calcineurina, la subunidad CnB no está unida a iones  $\text{Ca}^{2+}$  y el sitio catalítico de CnA está bloqueado por el dominio de autoinhibición (Perrino *et al.* 1995). La activación de la actividad fosfatasa requiere la unión de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la subunidad CnB así como la interacción con la  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que promueve cambios conformacionales que dejan libre el sitio catalítico (ver Figura I2 y (Klee *et al.* 1998; Li *et al.* 2011)).

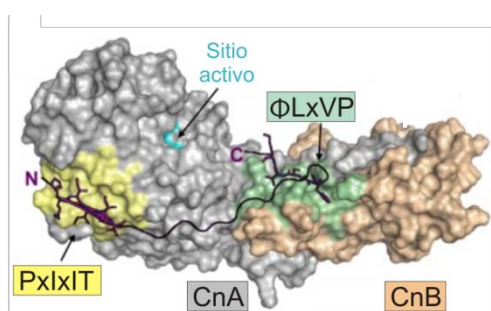


**Figura I2: Mecanismo de activación de la calcineurina. Cambios conformacionales de la CaM y la calcineurina inducidos por la unión de calcio.** La unión de cationes de calcio a la calmodulina (representada en naranja en ambos modelos) y a la subunidad B de la calcineurina (en verde) induce cambios conformacionales que favorecen la actividad fosfatasa de la subunidad A de la calcineurina (en rojo). Modificado de (Li *et al.* 2011).

### 4.2. Interacción de la calcineurina con los sustratos.

La actividad fosfatasa de la calcineurina es muy específica y sólo actúa sobre determinados sustratos (Klee *et al.* 1998). Tanto la calmodulina como la calcineurina están conservadas en organismos tan alejados evolutivamente como las levaduras o los vertebrados, manteniéndose intacta la cascada de señalización a pesar de que los efectores finales son dispares (Wu *et al.* 2007). Los sustratos de la calcineurina ejercen diferentes funciones celulares pero conservan un dominio de anclaje que es reconocido por la fosfatasa en todas los organismos (Wu *et al.* 2007). Este dominio se denomina CDD (calcineurin docking domain) constituido por residuos con similitud a las secuencias consenso PXLIT o  $\phi$ LXVP, siendo  $\phi$  un residuo aromático y x cualquier aminoácido (Aramburu *et al.* 1998; Rodríguez *et al.* 2009).

La afinidad con que interacciona la calcineurina con los sustratos depende de la naturaleza del CDD y determinan una diferente respuesta fisiológica en la señalización (Roy *et al.* 2007). Los dominios que muestran mayor afinidad por los sustratos están formados por los residuos PVIVIT mientras que la secuencia PVIADV es la que une con menor afinidad a la calcineurina (Roy *et al.* 2007). Entre estas dos secuencias existe un rango de afinidades que viene determinada por cada uno de los residuos, conservados o no, del dominio PxlIT y que determinan la dependencia de la concentración de calcio necesaria para activar su función (Aramburu *et al.* 1999; Li *et al.* 2007). La modulación de la afinidad por la fosfatasa es una estrategia que se encuentra conservada desde eucariotas inferiores a superiores (Li *et al.* 2011).



**Figura 13: Dominios de anclaje de la calcineurina a los sustratos.** Modificado de (Grigoriu *et al.* 2013).

El anclaje de los sustratos con dominio PxlIT a la fosfatasa se produce en un bolsillo hidrofóbico distante al sitio catalítico de CnA (Figura 13) de forma independiente del estado, activo o inactivo, de la calcineurina (Li *et al.* 2007). La interacción mediada por este dominio mejora la eficiencia de la desfosforilación del sustrato sin embargo no es necesaria para que la calcineurina mantenga su actividad fosfatasa (Li *et al.* 2011). Por el contrario, el dominio φLxVP interacciona únicamente con la forma activa de CnA a través de un bolsillo hidrofóbico muy próximo al sitio catalítico (Figura 13) y, aunque presenta una menor afinidad en la unión, es más eficiente en la desfosforilación de los sustratos (Grigoriu *et al.* 2013; Rodríguez *et al.* 2009).

### 4.3. Regulación e inhibición de la calcineurina.

La actividad fosfatasa de la calcineurina está sujeta a regulación por diferentes mecanismos (Figura 14). El primer sistema consiste en su propia autoregulación por el dominio de autoinhibición presente en la subunidad catalítica CnA, que mantiene un estado inactivo de la proteína en ausencia de señal por calcio (Klee *et al.* 1998). Existen además proteínas endógenas que regulan la actividad de la calcineurina, cuyo modo de acción es dependiente de una interacción física entre la calcineurina y el regulador (Liu, 2003). Inicialmente se describieron como inhibidores de la actividad fosfatasa a pesar de que algunos componentes de esta familia de

reguladores pueden actuar tanto como activadores o inhibidores o incluso pueden actuar como intermediarios en la unión a sus sustratos (Li *et al.* 2011).

Las primeras proteínas endógenas descritas en la inhibición de la actividad de la calcineurina fueron las proteínas Cabin1 y Carabin, proteínas que sólo son expresadas por eucariotas superiores (Liu, 2009). Cabin1 es una fosfoproteína que se encuentra hipofosforilada en células T inactivas, es decir, cuando no hay activación de las proteínas NFAT por la calcineurina, y tras el aumento de los niveles intracitoplásmicos de calcio se desencadena la fosforilación de Cabin 1 por la quinasa PKC (Liu, 2003). La desfosforilación está mediada por la calcineurina ya que Cabin 1 posee un sitio de unión a la calcineurina (Liu, 2003). Este sitio compite con la capacidad de unión de la fosfatasa a otros sustratos promoviendo una reducción de la actividad de la calcineurina (Liu, 2003). La proteína Carabin no contiene un sitio de unión a la calcineurina sino que interacciona directamente con el sitio catalítico de la calcineurina (Liu, 2009). Esta proteína no sólo inhibe la activación de los NFAT sino que actúa como inhibidor de la ruta de señalización Ras y proporciona un sistema de comunicación entre la transducción de señales de calcio y Ras (Pan *et al.* 2007). La expresión de Carabin está regulada por la actividad transcripcional de los NFAT y por tanto los niveles de proteína Carabin y su efecto inhibidor aumentan tras la activación de los NFAT por la calcineurina (Pan *et al.* 2007).

Las proteínas Cabin 1 y Carabin actúan como verdaderos inhibidores de la actividad fosfatasa de la calcineurina mientras que proteínas de la familia denominada RCANs (regulators of calcineurin) muestran un efecto tanto activador como inhibidor de la actividad de la fosfatasa (Kingsbury *et al.* 2000; Hilioti *et al.* 2003). El primer miembro de la familia de RCAN fue identificado de forma simultánea en dos hongos levaduriformes, *S. cerevisiae* y *Cryptococcus neoformans*, nombrado Rcn1 o Cbp1 respectivamente (Gorlach *et al.* 2000; Kingsbury *et al.* 2000). Estas proteínas se encuentran presentes en organismos eucariotas y a pesar de que el nivel de conservación de secuencia no es elevado su modo de acción sí lo es (Liu, 2009). En mamíferos se han identificado tres homólogos, RCAN1 (también descrito como calcipressin 1-CALP1-, Down syndrome candidate region 1 -DSCR1-, myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1 -MCIP1-, o Adapt78), RCAN2 (también descrito como CALP2, DSCR1L1, MCIP2 o ZAKI-4) y RCAN3 (también descrito como CALP3, DSCR1L2, o MCIP3 ) (Liu, 2009). El mecanismo por el que los miembros de la familia RCAN producen la inhibición es mediante la competición de estos reguladores con los sustratos a través del dominio de unión a la calcineurina (Rodríguez *et al.* 2009). El papel activador de los RCAN sobre la actividad fosfatasa de la calcineurina aún no está definido pero estudios recientes indican que es dependiente de la señalización de los RCAN para su degradación por el proteasoma (Kishi *et al.* 2007). Esta señalización consiste en la fosforilación de los RCAN

por quinasas de la familia GSK3 en un dominio que está conservado en todos los RCAN y que es desfosforilado por la calcineurina, produciéndose un ciclo de retroalimentación de la actividad de la calcineurina (Hilioti *et al.* 2004; Mehta *et al.* 2009).

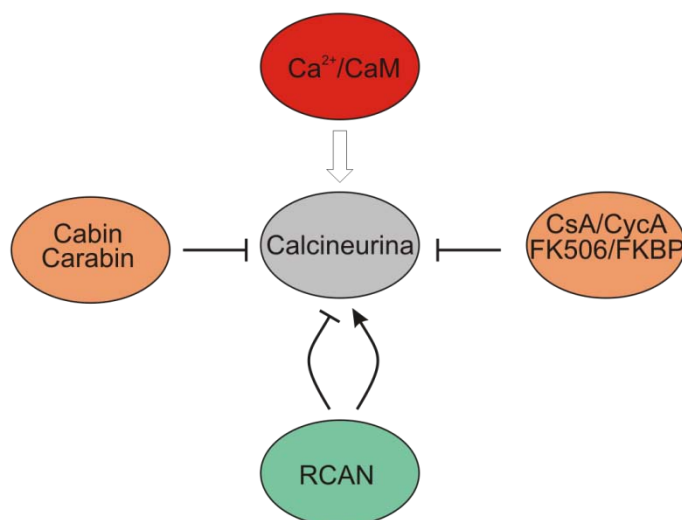


Figura 14: Diagrama que resume los principales reguladores positivos y negativos de la función de la calcineurina.

La inhibición de la calcineurina también se puede producir mediante proteínas de origen exógeno que interactúan en el interior celular con proteínas denominadas inmunofilinas. Las primeras sustancias que fueron descritas con efecto supresor de la actividad de la calcineurina fueron la ciclosporina A (CsA) y FK506 (tacrolimus) (Liu *et al.* 1991). La CsA es un undecapéptido cíclico mientras que FK506 es un macrólido, sin embargo ambas presentan el mismo efecto inmunosupresor en las células (Sieber *et al.* 2009). La CsA en el interior celular reconoce y se une a la ciclofilina A mientras que FK506 interacciona con FKBP (Sieber *et al.* 2009). Tanto la ciclofilina A como FKBP pertenecen a la familia de las ciclofilinas, conservadas en la evolución tanto en eucariotas como procariontes y que se caracterizan por su actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (PPIasa) (Wang *et al.* 2005). La unión de los compuestos inmunosupresores a las ciclofilinas inhibe su actividad PPIasa (Wang *et al.* 2005). La inhibición de la calcineurina no es producida por la unión del inmunosupresor o de la inmunofilina por separado sino que es el complejo formado entre ambos lo que impide su actividad fosfatasa (Cardenas *et al.* 1994). Al igual que ciertos sustratos, los complejos Ciclofilina A-CsA y FK506-FKBP se unen al dominio  $\phi$ LxVP, bloqueando así la interacción y la actividad catalítica de la calcineurina para actuar sobre sus sustratos (Grigoriu *et al.* 2013; Rodriguez *et al.* 2009). Originalmente identificados por su capacidad inmunosupresora, en la actualidad la CsA, FK506 y sus derivados se emplean clínicamente en la terapia de transplante de órganos así como en el tratamiento de infecciones fúngicas y han facilitado el estudio en ciencia básica de las rutas de señalización de la calcineurina (Steinbach *et al.* 2007).

**5. Sistemas Crz en otros hongos: implicaciones biológicas.**

El primer miembro de la familia de factores transcripcionales Crz (calcineurin-responsive zinc fingers) fue descrito en la levadura *S. cerevisiae*. La identificación de esta proteína se realizó de forma prácticamente simultánea por tres grupos de investigación que estudiaban diferentes aspectos de la adaptación de la levadura a las condiciones ambientales (Matheos *et al.* 1997; Mendizabal *et al.* 1998; Stathopoulos *et al.* 1997). En función de la actividad caracterizada en dichos estudios, este factor transcripcional fue nombrado con los acrónimos Crz1p (**Calcineurin-Responsive Zinc finger**), Tcn1p (**T**arget of **C**alcineurin) o Hal8p (**H**alotolerance) (Matheos *et al.* 1997; Mendizabal *et al.* 1998; Stathopoulos *et al.* 1997). En la actualidad la nomenclatura de uso más extendido es Crz1p que además ha sido empleada en la designación de la mayoría de proteínas ortólogas de origen fúngico. Las proteínas pertenecientes a la familia Crz muestran elevada conservación de la secuencia en la región correspondiente al dominio de unión a DNA, con la estructura típica de dos dedos de zinc clásicos C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y un tercer dedo de zinc atípico CCHC (Lev *et al.* 2012; Spielvogel *et al.* 2008). Fuera de la región de los dedos de zinc, la similitud del factor transcripcional de hongos levaduriformes y filamentosos es baja, produciéndose en estos últimos una conservación de la secuencia en la región C-terminal que está ausente en los hongos levaduriformes (Spielvogel *et al.* 2008). Además de la homología en la conservación del dominio de unión a DNA, estas proteínas comparten el mismo control de su localización nucleocitoplásmica en respuesta a los estímulos y muestran cierta analogía en la adaptación al estrés ambiental (ver tabla I1).

Organismo	Función
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Resistencia a estrés catiónico por Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , elevación del pH, exposición prolongada a la luz o presencia de la feromona ( $\alpha$ -factor) (Mendizabal <i>et al.</i> 1998; Stathopoulos <i>et al.</i> 1997; Bodvard <i>et al.</i> 2013)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Resistencia a estrés catiónico por Ca <sup>2+</sup> (Hirayama <i>et al.</i> 2003)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Resistencia a estrés catiónico por Ca <sup>2+</sup> y Mn <sup>2+</sup> (Hernandez-Lopez <i>et al.</i> 2006)
<i>Candida albicans</i>	Resistencia a estrés catiónico por Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , y Na <sup>+</sup> . Virulencia. (Karababa <i>et al.</i> 2006; Santos <i>et al.</i> 2005)

<i>Candida dubliniensis</i>	Resistencia a estrés catiónico por $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Mn}^{2+}$ Virulencia. (Chen <i>et al.</i> 2011)
<i>Candida glabrata</i>	Termotolerancia Respuesta a estrés en el retículo endoplásmico. Integridad de la membrana. Virulencia (Chen <i>et al.</i> 2012)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Resistencia a estrés catiónico por $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , y pH alcalino. Integridad de la membrana. (Hagiwara <i>et al.</i> 2008; Spielvogel <i>et al.</i> 2008)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Resistencia a estrés catiónico por $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Mn}^{2+}$ Virulencia. (Soriani <i>et al.</i> 2008)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Producción de aflatoxinas y esterimatocistina en presencia de $\text{Ca}^{2+}$ . (Chang, 2008)
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Resistencia a estrés catiónico por $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Mn}^{2+}$ Virulencia. (Choi <i>et al.</i> 2009)
<i>Magnaporthe grisea</i>	Resistencia a estrés catiónico por $\text{Ca}^{2+}$ Metabolismo de lípidos. Conidiación. Virulencia. (Zhang <i>et al.</i> 2009)
<i>Botrytis cinerea</i>	Resistencia a estrés catiónico por $\text{Ca}^{2+}$ , oxidativo por $\text{H}_2\text{O}_2$ y pH ambiental Crecimiento vegetativo y diferenciación (conidiación y formación de esclerótidas) Virulencia (Schumacher <i>et al.</i> 2008)
<i>Penicillium digitatum</i>	Resistencia a estrés catiónico por $\text{Ca}^{2+}$ y oxidativo por $\text{H}_2\text{O}_2$ Crecimiento vegetativo y diferenciación (conidiación y formación de esclerótidas)

## Introducción

---

	Resistencia a fungicidas DMI Virulencia (Zhang <i>et al.</i> 2013)
--	--

**Tabla1:** Resumen de las principales funciones de los factores transcripcionales de la familia Crz en hongos.

## **OBJETIVOS**



Esta tesis doctoral se ha enfocado hacia el estudio del proceso y maquinaria de la señalización y la función del factor transcripcional CrzA que en *Aspergillus nidulans* media la respuesta a estrés por calcio y la alcalinización del medio extracelular. Existe un interés creciente en el estudio de la familia fúngica de factores transcripcionales Crz, calcineurin-responsive-zinc fingers, dado su papel en procesos celulares importantes para la homeostasis del hongo así como en patogénesis animal o vegetal. Las maquinarias de índole molecular y celular de las que depende tanto la señalización de los factores Crz como su actividad transcripcional son desconocidas en hongos filamentosos. Utilizando como organismo modelo a *Aspergillus nidulans* y como objeto de estudio al factor CrzA, se ha investigado esta ruta de señalización de forma extensiva. Los objetivos que se plantearon en este trabajo de investigación fueron:

1. Analizar la respuesta a diferentes estímulos abióticos mediada por CrzA, tanto a nivel molecular como celular, determinando así la existencia de modificaciones postraduccionales y cambios en la localización celular de la proteína.
2. Identificar y caracterizar elementos en *cis* y en *trans* que actúan en la señalización, procesos de activación y desactivación de la función, de CrzA.
3. Determinar los mecanismos de regulación de la expresión génica en la adaptación al estrés ambiental relacionados con la actividad transcripcional de CrzA.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



**1. Condiciones y medios de cultivo para *Aspergillus nidulans*.**

La composición de las soluciones y los suplementos empleados en los medios para *A. nidulans* se describen a continuación siguiendo las indicaciones descritas por Cove (Cove, 1966). Los cultivos se incubaron preferentemente a una temperatura de 37°C, aunque también se incubaron a 25°C (temperatura ambiente) o 30°C según se indica en los respectivos experimentos. Para los cultivos en medio líquido se utilizaron matraces cónicos de diferentes capacidades, y se utilizaron incubadoras con una plataforma de agitación orbital (New Brunswick-Eppendorf) a una velocidad de giro de 250 rpm y la temperatura ajustada a 37°C o 30°C.

**1.1. Soluciones y suplementos para medios de *Aspergillus*.**

<b>Solución concentrada de sales (50x)</b>	
Cloruro de potasio (KCl)	26 g/l
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	26 g/l
Fosfato dihidrógeno de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	76 g/l
Solución de elementos traza sin fosfatos	50 ml/l

<b>Solución concentrada de sales sin fosfatos (50x)</b>	
Cloruro de potasio (KCl)	26 g/l
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	26 g/l
Solución de elementos traza sin fosfatos	50 ml/l

<b>Solución concentrada de elementos traza sin fosfatos (1000X)</b>	
Tetraborato de sodio (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O)	40 mg/l
Cloruro de cobre (CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	400 mg/l
Cloruro férrico (FeCl <sub>3</sub> )	800 mg/l
Cloruro de zinc (ZnCl <sub>2</sub> )	8 g/l
Cloruro de magnesio (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	800 mg/l

<b>Solución concentrada de casaminoácidos (100x)</b>	
Hidrolizado de caseína	150 g/l
Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.	

## Materiales y Métodos

<b>Solución concentrada de vitaminas (100x)</b>	
Tiamina-HCl	50 mg/l
Biotina	10 mg/l
Ácido nicotínico	100 mg/l
D-pantotenato de calcio	200 mg/l
Piridoxina-HCl	50 mg/l
Riboflavina	100 mg/l
Ácido p-aminobenzoico (PABA)	100 mg/l
Inositol	24 g/l
Esterilizado mediante filtración y guardado a 4°C protegido de la luz.	

<b>Suplementos</b>		
Soluciones acuosas concentradas 100x respecto a la concentración final en el medio de cultivo, salvo que se indique lo contrario.		
Ácido p-aminobenzoico (PABA)	200 mg/l	Autoclave: 110°C 20 minutos.
Colina-HCl	1,4 g/l	Autoclave: 110°C 20 minutos.
D-Pantolactona	200 mg/l	Esterilizado por filtración.
Arginina-HCl	63,2 g/l	Esterilizado por filtración.
Piridoxina-HCl (vitamina B6)	50 mg/l	Esterilizado por filtración.
Inositol	12 g/l	Esterilizado por filtración.
Riboflavina	250 mg/l	Esterilizado por filtración.
Biotina (1000x)	100 mg/l	Esterilizado por filtración.
Uracilo	560 mg/l	Añadido en polvo al medio.
Uridina	1,22 g/l	Añadido en polvo al medio.

<b>Sales minerales</b>		
Fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	5 M	Autoclave: 110°C 20 minutos.
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2 M	Autoclave: 110°C 20 minutos.
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	5 M	Esterilizado por filtración.
Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ )	4 M	Esterilizado por filtración.
Cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ )	1 M	Esterilizado por filtración.
Cloruro de sodio (NaCl)	58,4 g/l	Añadido en polvo al medio.
Cloruro de potasio (KCl)	74,5 g/l	Añadido en polvo al medio.

Inhibidores y otros compuestos		
Ciclosporina A	10 mM (DMSO)	Sigma-Aldrich
DAPI	60 mg/ml (Glicerol 50%)	Sigma-Aldrich
Tritón X-100	10% (H <sub>2</sub> O)	Roche

Los reactivos químicos utilizados y los suplementos de los medios de cultivo fueron de calidad analítica, generalmente de las marcas Sigma, Fluka y Merck. Las enzimas de restricción utilizadas provenían de New England Biolabs, Roche o Takara. En algunos casos el origen del compuesto se detalla específicamente.

### 1.2. Medio mínimo de *Aspergillus* (MMA).

Por litro de medio se diluyeron 20 ml de solución concentrada de sales (50x) con agua Milli-Q, se ajustó el pH a 6,5 con NaOH y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Para el medio mínimo sólido se añadió agar al 1% (p/v) (Oxoid). El medio MMA base se complementa con los suplementos necesarios para cada estirpe así como añadiendo la fuente principal de carbono, normalmente D-glucosa al 1% (p/v), y la fuente de nitrógeno, tartrato de amonio a una concentración final de 5 mM.

### 1.3. Medio mínimo para microscopio (“watch minimal medium”) (WMM).

Por litro de medio se diluyeron 20 ml de solución concentrada de sales sin fosfatos (50x) con agua Milli-Q y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. En el momento de su utilización el WMM se suplementó con D-glucosa al 0,1% (p/v), como fuente principal de carbono, 5 mM de tartrato de amonio como fuente principal de nitrógeno, la deficiencia de anión fosfato añadiendo NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (cf, 25 mM) y los suplementos específicos para cada cepa.

### 1.4. Medio completo de *Aspergillus* (MCA).

Por cada litro de MCA se añaden 20 ml de solución concentrada 50x de sales, 10 ml de solución 100x de casaminoácidos, 10 g de D-glucosa, 2 g de bactopectona y 1 g de extracto de levadura. Se completó con agua Milli-Q hasta un volumen de un litro y se ajustó el pH a valor 6,5 utilizando hidróxido sódico (NaOH 10 M). Para el medio sólido se añadió 1% (p/v) de agar (Oxoid). El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Antes de su utilización se añadió la fuente principal de nitrógeno, generalmente tartrato de amonio a una concentración final de 5

mM, y 10 ml/l de solución de vitaminas, al que también se añadieron los requerimientos específicos de cada estirpe en el caso de que no estuvieran ya incluidos en la solución de vitaminas.

### **1.5. Medio mínimo de regeneración base (MMR) y de cobertura (MMR-TOP).**

Para cada litro de medio MMR se diluyeron 20 ml de solución 50x de sales y 342 g sacarosa (cf 1 M). Se completó el volumen con agua Milli-Q y se ajustó el valor de pH a valor de 7. Antes de esterilizar el medio en el autoclave se añadió 1% (p/v) de agar (Oxoid). En el momento de ser utilizado se añadieron las fuentes principales de carbono y nitrógeno, 1% (p/v) de D-glucosa y 5 mM tartrato de amonio respectivamente, y los suplementos nutricionales necesarios para el crecimiento de las diferentes cepas.

El procedimiento para la preparación del MMR-TOP es el mismo, únicamente cambia la concentración de agar que en este caso es del 0,4%.

### **1.6. Medio de fermentación (MFA).**

Este medio incluye como principal componente 25 g por cada litro a preparar de CSL (Corn Steep Liquor). Tras mezclar bien las fases sólida y acuosa del CSL se pesaron 25 g, se añadieron 20 ml/l de solución de sales y se completó con agua Milli-Q hasta el volumen de 1 l. Después de que el medio fuera agitado durante 20 minutos y filtrado al vacío se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. El medio se esterilizó en 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 de amonio, respectivamente.

### **1.7. Condiciones y medios de cultivo para *E. coli*.**

Como medio de cultivo para *E. coli* se utilizó LB (Sambrook *et al.* 1989) 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% (p/v) de agar. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Para la propagación de plásmidos y la selección de cepas transformadas se utilizó el antibiótico betalactámico ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

## 2. Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados.

### 2.1. Cepas de *Aspergillus nidulans*.

Los genotipos de las cepas utilizadas en esta tesis doctoral quedan descritos en la Tabla M-1. Los diferentes loci y marcadores genéticos se describen en (Clutterbuck, 1993). Todas las cepas portan el alelo mutante *veA1* de pérdida de función en *VeA* que promueve la conidiación profusa en ausencia de luz.

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD1425	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB</i>	TNO2A3, Berl Oakley
MAD1427	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; riboB2</i>	TNO2A25 (Nayak <i>et al.</i> 2006)
MAD1739	<i>pyrG89; pyroA4, ΔnkuA::BAR</i>	H.N. Arst
MAD2160	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔkapL::pyrG<sup>Af</sup></i>	(Markina-Inarrairaegui <i>et al.</i> 2011)
MAD2166	<i>pyrG89; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(M1-K730)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD2168	<i>pyrG89; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(M1-R448)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD2169	<i>pyrG89; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(MD+P445- K730)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD2170	<i>pyrG89; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(ME+Q608- K730)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD2171	<i>pyrG89?, yA2; argB2[argB*::afp::lacZ]; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(M1-K730)], ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD2172	<i>pyrG89?, yA2; argB2[argB*::afp::lacZ]; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(M1-R448)], ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD2324	<i>pyrG89, ΔkapD::pyrG<sup>Af</sup>; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB</i>	(Markina-Inarrairaegui <i>et al.</i> 2011)
MAD2446	<i>pyrG89; wA4; inoB2, pyroA4, ΔnkuA::BAR; hhoA::mCh::pyroA<sup>Af</sup>, myc<sub>3x</sub>::pacC(PacC900)</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> 2009)
MAD2448	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup></i>	Este trabajo
MAD2449	<i>pyrG89?, yA2; argB2[argB*::afp::lacZ]; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD2457	<i>pyrG89, wA3; ΔcnaA::pyroA<sup>Af</sup>; pyroA4</i>	CNA1 (Soriani <i>et al.</i> 2008)
MAD2516	<i>pyrG89; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(M1-K730)], ΔnkuA::argB; ΔkapL::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo

## Materiales y Métodos

MAD2517	<i>pyrG89; argB2; pyroA+::[pyroA*::gfp::crzA(M1-R448)], ΔnkuA::argB; ΔkapL::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD2604	<i>pyrG89, ΔkapD::pyrG<sup>Af</sup>; argB2; pyroA+::[pyroA*::gfp::crzA(M1-K730)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD2605	<i>pyrG89, ΔkapD::pyrG<sup>Af</sup>; argB2; pyroA+::[pyroA*::gfp::crzA(M1-R448)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD2842	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD2918	<i>pyrG89, pabaA1, yA2; ckiA102</i>	CS1901 (Apostolaki et al. 2012)
MAD2921	<i>pabaA1, yA2; ckiA1919; pantoB100</i>	VIE180 (Apostolaki et al. 2012)
MAD2922	<i>yA2, ckiA2; pyroA4</i>	VIE174 (Apostolaki et al. 2012)
MAD2946	<i>pyrG89, pabaA1, yA2; ckiA102; pyroA4; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD3020	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD3021	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD3044	<i>pyrG89; ckiA2, argB2?; pyroA4, ΔnkuA::argB2?; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD3045	<i>pyrG89, pabaA1, yA2; ckiA1919, argB2?; pyroA4, ΔnkuA::argB2?; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD3098	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; DnkuA::argB; myc<sub>3x</sub>::crzA::ha<sub>3x</sub>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD3222	<i>pyrG89, pabaA1; ΔcnaA::pyroA<sup>Af</sup>, pyroA4?, crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD3386	<i>pyrG89?, yA2; argB2[argB*::afp::lacZ]; pyroA+::[pyroA*::gfp::crzA(MD+P445-K730)], ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD3388	<i>pyrG89?, yA2; argB2[argB*::afp::lacZ]; pyroA+::[pyroA*::gfp::crzA(ME+Q608-K730)], ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD3493	<i>pyrG89; argB2; pyroA+::[pyroA*::gfp::crzA(M1-L612)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD3494	<i>pyrG89?, yA2; argB2[argB*::afp::lacZ]; pyroA+::[pyroA*::gfp::crzA(M1-L612)], ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD3524	<i>pyrG89; wA3; ckiA2, argB2?, ΔcnaA::pyroA; pyroA4, ΔnkuA::argB2?; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD3527	<i>pyrG89; wA3; argB2 [argB*::afp::lacZ], argB2?, ΔcnaA::pyroA; pyroA4+ [pyroA*::gfp::crzA(MD+P445-K730)], pyroA4?, ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>nc</sup>; pantoB102</i>	Este trabajo
MAD3555	<i>pyrG89; wA3; argB2 [argB*::afp::lacZ], argB2?, ΔcnaA::pyroA; pyroA4+ [pyroA*::gfp::crzA(M1-K730)], pyroA4?, ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo

MAD3559	<i>pyrG89; wA3; argB2 [argB*::afp::lacZ], argB2?, ΔcnaA::pyroA; pyroA4+ [pyroA*::gfp::crzA(M1-L612)], pyroA4?, ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB101</i>	Este trabajo
MAD3648	<i>pyrG89; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(MD+P445-L612)], ΔnkuA::argB</i>	Este trabajo
MAD3649	<i>pyrG89?, yA2; argB2[argB*::afp::lacZ]; pyroA<sup>+</sup>::[pyroA*::gfp::crzA(MD+P445-L612)], ΔnkuA::argB; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD3709	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; ΔcrzA::riboB<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD3806	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; crzA<sup>Q294-H316del</sup>::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD3842	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; crzA(M1-L612)::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD3843	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; crzA(MD+P445-K730)::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD3844	<i>pyrG89, Δgska::riboB<sup>Af</sup>, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD3991	<i>biA1, pabaA1, pH8R-2 (rcoA1); ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup></i>	H. Arst. A477
MAD3992	<i>pabaA1, pH8R-2 (rcoA1); ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup></i>	H. Arst. A547
MAD4088	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; crzA(M1-L612)::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD4089	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; crzA(MD+P445-K730)::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD4129	<i>pabaA1, yA2; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	H. Arst. A249
MAD4234	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; crzA<sup>M356-A372del</sup>::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD4239	<i>pyrG89?, yA2; argB2 [argB*::afp::lacZ]; pyroA+ ::[pyroA*::gfp::crzA(MD+P445-K730<sup>K487-H492del</sup>)]<sub>2x</sub>, ΔnkuA::argB ; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD4240	<i>pyrG89?, yA2; argB2 [argB*::afp::lacZ]; pyroA+ ::[pyroA*::gfp::crzA(MD+P445-K730<sup>K487-H492del</sup>)]<sub>1x</sub>, ΔnkuA::argB ; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD4241	<i>pyrG89?, yA2; argB2 [argB*::afp::lacZ]; pyroA+ ::[pyroA*::gfp::crzA(MD+P445-K730<sup>K487-H492del</sup>)]<sub>nx</sub>, ΔnkuA::argB ; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD4310	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; CaM::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD4366	<i>pyrG89; cnaA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; pyroA4, ΔnkuA::BAR</i>	Este trabajo
MAD4390	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; crzA<sup>Q294-H316;M356-A372del</sup>::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD4522	<i>pyrG89; cnaA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; pyroA4, ΔnkuA::BAR; crzA::mCh::pyroA</i>	Este trabajo
MAD4633	<i>pyrG89, pabaB22; ckiA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; riboB2</i>	VIE172 (Apostolaki et al. 2012)

## Materiales y Métodos

MAD4634	<i>pabaA1, yA2, pH8R-M1; ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD4635	<i>pabaA1, yA2, pH8R-M2 (rcoA2); ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD4636	<i>pabaA1, yA2, pH8R-M3 (rcoA2); ΔcrzA::pyr4<sup>Nc</sup>; pantoB100</i>	Este trabajo
MAD4637	<i>pyrG89, ΔrcoA::pyrG<sup>Af</sup>; pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; ΔcrzA::riboB<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD4639	<i>pyrG89, ΔrcoA::pyrG<sup>Af</sup>; pyroA4, ΔnkuA::BAR</i>	Este trabajo
MAD4641	<i>pyrG89; wA4; inoB2, pyroA4, ΔnkuA::BAR; crzA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; hhoA::mCh::pyroA<sup>Af</sup>, myc<sub>3x</sub>::pacC(PacC900)</i>	Este trabajo
MAD4643	<i>pyrG89, gskA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>; wA4; inoB2, pyroA4, ΔnkuA::BAR; hhoA::mCh::pyroA, myc<sub>3x</sub>::pacC(PacC900)</i>	Este trabajo
MAD4656	<i>pyrG89, rcoA3::pyrG<sup>Af</sup>; pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; ΔcrzA::riboB<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo
MAD4657	<i>pyrG89, rcoA4::pyrG<sup>Af</sup>; pabaA1; argB2; ΔnkuA::argB; ΔcrzA::riboB<sup>Af</sup>; riboB2</i>	Este trabajo

Tabla M-1: Listado de cepas de *A. nidulans* empleadas en esta tesis doctoral.

### 2.2. Cepas de *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo como herramientas para el clonaje de ácidos nucleicos o expresión de proteínas recombinantes se detallan en la Tabla M-2.

Cepa	Genotipo	Fuente
DH1	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 glnV44 relA1 hsdR17 (rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>) λ-</i>	(Meselson <i>et al.</i> 1968)
DH5α	<i>F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169 hsdR17 (rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>) λ-</i>	(Meselson <i>et al.</i> 1968).

Tabla M-2: Listado de cepas de *E. coli* empleadas en esta tesis doctoral.

### 2.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo como cebadores en la amplificación de casetes de DNA para la generación de alelos mutantes o sondas de hibridación y en la secuenciación de ácidos nucleicos se detallan en la Tabla M-3.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
CrzA(1)	GCTCTGGTGATAGCGACC	Generación de alelos nulos y etiquetados de <i>crzA</i> .
CrzA(2)	GGCAAAGAGCTATGCAGAC	Generación de alelos nulos y etiquetados de <i>crzA</i>
CrzA(2')	GTCTGCATAGCTCTTTGCCACCGGTCGCCTC AAACAATGCTC	Generación del alelo nulo de <i>crzA</i> .
CrzA(3)	CTTTGCTACCTATTTCTCTGTTAGTAGGG	Generación de alelos nulos y etiquetados de <i>crzA</i> .
CrzA(3')	CCCTACTGAACAGAGAAATAGGTAGCAAAG CTGTCTGAGAGGAGGCACTGATG	Generación de alelos etiquetados de <i>crzA</i> .
CrzA(4)	CAACCCGCACCCCTACACTTCTCTACATCG	Generación de alelos nulos y etiquetados de <i>crzA</i>
CrzA(5)	GACTCCTCCAACAGAAGGCTATCCGAATGG	Generación de alelos etiquetados de <i>crzA</i>
CrzA(6)	TTTCCCCAGTTCGGATTGCGTAGCCAGC	Generación de alelos etiquetados de <i>crzA</i>
CrzA(6')	GCTGGCTACGCAAATCCGAACTGGGGGAAA GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Generación de alelos etiquetados de <i>crzA</i> .
CrzA-ol 1	ATTCTTCCATTCCCTCC	Generación de formas truncadas de CrzA
CrzA NcoI-2	ATCCATGGATCCTAGTTCAGGGAGCC	Generación de formas truncadas de CrzA
CrzA NcoI-3	TACCATGGAGCAACAGCAGCATCTGCAGC	Generación de formas truncadas de CrzA
CrzA EcoRI-1	CGGAATTCGGATGCAAAGGGATGC	Generación de formas truncadas de CrzA
CrzA EcoRI-2	GCGAATTCACAGATGCTGCTGTTGCTGG	Generación de formas truncadas de CrzA
CrzA EcoRI-3	CGGAATTCACCTGGAAGTAGGAACTG	Generación de formas truncadas de CrzA
CrzA(1-612) rv	CAGATGCTGCTGTTGCTGG	Generación de la forma truncada CrzA(1-612)-GFP
CrzA(1-612) fw	CCAGCAACAGCAGCATCTGGGAGCTGGTGC AGGCGCTGGAGCC	Generación de la forma truncada CrzA(1-612)-GFP
CrzA(445-730) fw	GTCTGCATAGCTCTTTGCCATGGATCCTAGT TCCAGGGAGCC	Generación de la forma truncada CrzA(445-730)-GFP
Myc-CrzA(1)	GGATCTTGTCTGCATAGCTCTTTGCCATGGA GCAAAAGCTCATTCTGAAGAGG	Generación de Myc <sub>3x</sub> -CrzA-HA <sub>3x</sub>
Myc-CrzA(2)	CCAGGTCCTGCAGCGTATCTTGAGGATCATT AAGATCCTCCTCGGATATTAACCTTCTGC	Generación de Myc <sub>3x</sub> -CrzA-HA <sub>3x</sub>
Myc-CrzA(2')	GCAGAAGTTAATATCCGAGGAGGATCTTAA TGATCCTCAAGATACGCTGCAGGACCTGG	Generación de Myc <sub>3x</sub> -CrzA-HA <sub>3x</sub>
CrzA-HA(1)	GCTGGCTACGCAAATCCGAACTGGGGGAAA GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Generación de Myc <sub>3x</sub> -CrzA-HA <sub>3x</sub>
CrzA-HA(2)	CCCTACTGAACAGAGAAATAGGTAGCAAAG TCACTGAGCAGCGTAATCTGGAACGTCATAT GG	Generación de Myc <sub>3x</sub> -CrzA-HA <sub>3x</sub>
CrzA-HA(2')	CCCTACTGAACAGAGAAATAGGTAGCAAAG TCACTGAGCAGCGTAATCTGGAACGTCATAT GG	Generación de Myc <sub>3x</sub> -CrzA-HA <sub>3x</sub>

## Materiales y Métodos

$\Delta$ CDD1-fw	GAGTCATTCCTCTGTCTGAGCATCATCCGA CAGACATAATCCCTGG	Generación de formas de CrzA carentes del sitio CDD1
$\Delta$ CDD1-rv	AGGGATTATGTCTGTCTGCGGATGATGCTCAGA CAGAGTGAATGACTCG	Generación de formas de CrzA carentes del sitio CDD1
$\Delta$ CDD2-fw	GGTGACATCGGGCAAGCGTCACAGATGGCT CAAGTCTTCCACCTGAAAAGTCCG	Generación de formas de CrzA carentes del sitio CDD2
$\Delta$ CDD2-rv	CGACTTTTCAGGTGGGAAGACTTGAGCCAT CTGTGACGCTTGCCCGATGTCACC	Generación de formas de CrzA carentes del sitio CDD2
$\Delta$ NLS-fw	GGATCCAATAATACCGATTCTCCCGCGACCT TTCAATGTA CTCTTTGCC	Generación de formas de CrzA carentes de NLS
$\Delta$ NLS-rv	GAGTACATTGAAAGGTGCGGGAGAATCG GTATTATTGGATCCAGGCCG	Generación de formas de CrzA carentes de NLS
gpdA pro sec	TCAGTTCGAGCTTTCCC	Secuenciación de insertos en plasmidos pgpdA-pyroA*
gpdA ter sec	TTTACAAGGAGCTCCTGG	Secuenciación de insertos en plasmidos pgpdA-pyroA*
RiboB <sup>AN0670</sup> up	GGTTGTATATCGCTCTAGAAT	Amplificación del gen <i>riboB</i> de <i>A. nidulans</i>
RiboB <sup>AN0670</sup> down	GTCAGAGTCAGCTCAGTCTTC	Amplificación del gen <i>riboB</i> de <i>A. nidulans</i>
PyrG <sup>AN6157</sup> up	CCGAGAACGTCAGCTATATAAG	Amplificación del gen <i>pyrG</i> de <i>A. nidulans</i>
PyrG <sup>AN6157</sup> down	GAGGTGACCACTAGAGGGC	Amplificación del gen <i>pyrG</i> de <i>A. nidulans</i>
CnaA(3)	GTGCCTCCTCTCAGACAGAACATATGACGA AAATTGGATATTAACCCCG	Generación del alelo etiquetado de <i>cnaA</i>
CnaA(3')	GTTAATATCCAATTTTCGTCATATGTTCTGTC TGAGAGGAGGCACTGATG	Generación del alelo etiquetado de <i>cnaA</i>
CnaA(4)	CGACACTTCTCCGTATCTGCG	Generación del alelo etiquetado de <i>cnaA</i>
CnaA(5)	AGTGTGTCCTGTACCTATGGGC	Generación del alelo etiquetado de <i>cnaA</i>
CnaA(6)	GTCCCGACTACCGTCTCGTTGTCG	Generación del alelo etiquetado de <i>cnaA</i>
CnaA(6')	CGACAACGAGACGGTAGTCGGGACGGAGC TGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Generación del alelo etiquetado de <i>cnaA</i>
GskA(1)	GGGCTCGTGACCGGAATACC	Generación del alelo nulo de <i>gskA</i>
GskA(2)	CACGGTGTGTCTTGAAGGCG	Generación del alelo nulo de <i>gskA</i>
GskA(2')	CGCCTTCCAAGACACACCGTGACCGGTCCG CTCAAACAATG	Generación del alelo nulo de <i>gskA</i>
GskA(3)	GTCAACGTCATAGTGCTG	Generación de alelos nulo y etiquetado de <i>gskA</i>
GskA(3')	CAGCACTATGACGTTGACCTGTCTGAGAGG AGGCACTGATG	Generación de alelos nulo y etiquetado de <i>gskA</i>
GskA(4)	CGGTGATTGAGTGAAGTGTC	Generación de alelos nulo y etiquetado de <i>gskA</i>
GskA(5)	GACTCCTTCCCCGATCTTC	Generación del alelo etiquetado de <i>gskA</i>
GskA(6)	GTCAAGGTGTGCCATCATTTTC	Generación del alelo

		etiquetado de <i>gskA</i>
GskA(6')	GAAATGATGGCACACCTTGACGGAGCTGGT GCAGGGCGCTGGAGCCGGTGC	Generación del alelo etiquetado de <i>gskA</i>
GskA-sec1	GGCATGGCATCAAATCTTCG	Secuenciación del gen <i>gskA</i>
GskA-sec2	CTACCAGCTATTCCGTTCCG	Secuenciación del gen <i>gskA</i>
HapE-sec1	GCAAGTCCCCACATCACG	Secuenciación del gen <i>hapE</i>
HapE-sec2	CATAGCTGGTGCAGTCGC	Secuenciación del gen <i>hapE</i>
CkiA-sec1	CAGGTCATTGGGTTTCAGG	Secuenciación del gen <i>ckiA</i>
CkiA-sec2	GCATTACAACCTCAGACCC	Secuenciación del gen <i>ckiA</i>
RcoA-sec1	GTCGCCCTCCCCTCAATCG	Secuenciación del gen <i>rcoA</i>
RcoA-sec2	CCCGTTGCTTCTCATGTAGC	Secuenciación del gen <i>rcoA</i>
RcoA-sec3	CGTGGAGCTTGTTTCATCACC	Secuenciación del gen <i>rcoA</i>
RcoA-sec4	CCATAAGCCATTTGCGCCG	Secuenciación del gen <i>rcoA</i>
rcoA-cDNA sec1	TGTCGTCGCCAGTTTCC	Secuenciación del cDNA de <i>rcoA</i>
rcoA-cDNA sec2	GGAGAATGCAGTAGATCG	Secuenciación del cDNA de <i>rcoA</i>
rcoA-cDNA sec3	GAGGCAATGTACCGACCG	Secuenciación del cDNA de <i>rcoA</i>
RcoA(1)	GTGGTGAGGCTTGTGTAGAG	Generación del alelo nulo y de <i>rcoA</i>
RcoA(2)	TCAGCGCACCCCTAGGAAAC	Generación del alelo nulo de <i>rcoA</i>
RcoA(2')	GTTTCCTAGGGGTGCGCTGAACCGGTCGCC TCAAACAATGCTC	Generación del alelo nulo de <i>rcoA</i>
RcoA(3)	TCATTGAATTTGGGAAAGCTTCGGC	Generación del alelo nulo de <i>rcoA</i>
RcoA(3')	GCCGAAGCTTTCCCAAATTCAATGACTGTCT GAGAGGAGGCACTGATG	Generación del alelo nulo de <i>rcoA</i>
RcoA(4)	GGGCACGGGAAACTGAACCT	Generación del alelo nulo de <i>rcoA</i>
RcoA(7)	TGAACCGGTCGCCTCAAACAATGCTCTTC	Generación de los alelos <i>rcoA3</i> y <i>rcoA4</i>
rcoA3	AGCATTGTTTGAGGCGACCGGTTTCAGGGTG GGGGAGGGGCAAGACCAGGG	Generación del alelo <i>rcoA3</i>
rcoA4	GCATTGTTTGAGGCGACCGGTTTCACAGCAG CGCCAGGCTGATATCCTCC	Generación del alelo <i>rcoA4</i>
AN1168-1	CTGGGATATGTATGCCTTGCT	Generación de la sonda complementaria al locus AN1168
AN1168-2	TGTCTCGTCCCTTGGTCGTTCC	Generación de la sonda complementaria al locus AN1168
AN8842-1	GGGTGAGCTTCAGCAATGG	Generación de la sonda complementaria al locus AN8842
AN8842-2	AAACACCATCACAATTGTAAAATAAA	Generación de la sonda complementaria al locus AN8842

## Materiales y Métodos

AN3155-1	TGAGCGAGCAGTTGACCTCCATGC	Generación de la sonda complementaria al locus AN3155
AN3155-2	CTCAGCAGCTCTAAGGCTAGAACTCG	Generación de la sonda complementaria al locus AN3155
AN0566-1	ATGAGGATTGTGCAGAATGCCAACC	Generación de la sonda complementaria al locus AN0566
AN0566-2	TTCGTA CT CATT CAT ATCCGAACCG	Generación de la sonda complementaria al locus AN0566
AN5743-1	TTGGTAGGTACTGGAAGTAACCG	Generación de la sonda complementaria al locus AN5743
AN5743-2	TGCCTTCTTCGGCTTTAATATGGC	Generación de la sonda complementaria al locus AN5743
AN0471-1	CTAGCGAACAAGATGCATTGCTCGG	Generación de la sonda complementaria al locus AN0471
AN0471-2	TTTCAAGGCGTGGAAAAGCGCATCC	Generación de la sonda complementaria al locus AN0471
AN5821-1	TTCTTCAAGGTCTGCTTCAGGAGC	Generación de la sonda complementaria al locus AN5821
AN5821-2	AATTACCATAGTGGCATTGCTGCT	Generación de la sonda complementaria al locus AN5821
AN7510-1	GACGACGGTGGATT CAGTAGCACG	Generación de la sonda complementaria al locus AN7510
AN7510-2	TCCATAGAACCTGCACAATAACG	Generación de la sonda complementaria al locus AN7510
AN7173-1	TCGGATGTTGCTATGGACAAGACC	Generación de la sonda complementaria al locus AN7173
AN7173-2	GCTCGCGGAACCTGCCTGCCCAAGTGC	Generación de la sonda complementaria al locus AN7173
AN6986-1	AACGCTTCAACGTCAAGTCTGCG	Generación de la sonda complementaria al locus AN6986
AN6986-2	GTGAACACGCTGATAGGCAACTCC	Generación de la sonda complementaria al locus AN6986

**Tabla M-3: Listado de oligonucleótidos empleados en esta tesis doctoral.**

## 2.4. Plásmidos.

A continuación se detallan los plásmidos utilizados en esta tesis. Los oligonucleótidos empleados para su construcción se detallan en la sección anterior (ver Tabla M-3).

### 2.4.1. Plásmidos utilizados para la clonación de fragmentos de DNA.

**pGEM-T-Easy:** plásmido comercial de Promega. Facilita el clonaje y propagación en *E. coli*, cepa DH5 $\alpha$ , de fragmentos obtenidos por PCR.

**pGEM-T-Easy-CrzA-GFP:** este plásmido se generó introduciendo el fragmento obtenido mediante una PCR de fusión en el que se obtenía el casete *crzA-gfp-pyrG<sup>Af</sup>* flanqueado por los primeros 1500 pares de bases de las regiones 5'UTR y 3'UTR de *crzA* (ver apartado 4.1 de Materiales y métodos). La recuperación del inserto para su uso en la transformación de *A. nidulans* se consiguió mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos CrzA(1) y CrzA(4).

**pGEM-T-Easy-CrzA <sup>$\Delta$ CDD1</sup>-GFP:** plásmido obtenido mediante mutagénesis dirigida (ver apartado 4.2 de Materiales y métodos) utilizando a pGEM-T-Easy-CrzA-GFP para generar una delección interna desde el codón codificante de la glutamina 294 hasta el de la histidina 316. En este proceso de mutagénesis se utilizaron los oligonucleótidos  $\Delta$ CDD1-fw y  $\Delta$ CDD1-rv. La región codificante *crzA-gfp* del plásmido resultante fue secuenciada para verificar la ausencia de cambios adicionales en la secuencia de nucleótidos. La recuperación del inserto para su uso en la transformación de *A. nidulans* se consiguió mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos CrzA(1) y CrzA(4).

**pGEM-T-Easy-CrzA <sup>$\Delta$ CDD2</sup>-GFP:** este plásmido se construyó a partir de pGEM-T-Easy-CrzA-GFP utilizando los oligonucleótidos  $\Delta$ CDD2-fw y  $\Delta$ CDD2-rv para generar una delección interna desde el codón codificante de la metionina 356 hasta el de la alanina 372 mediante la técnica de mutagénesis dirigida (ver apartado 4.2 de Materiales y métodos). La región codificante *crzA-gfp* del plásmido resultante fue secuenciada para verificar la ausencia de cambios adicionales en la secuencia de nucleótidos. La recuperación del inserto para su uso en la transformación de *A. nidulans* se consiguió mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos CrzA(1) y CrzA(4).

**pGEM-T-Easy-CrzA <sup>$\Delta$ CDD1+2</sup>-GFP:** este plásmido combina ambas delecciones internas generadas en los dos anteriores plásmidos: desde el codón de la glutamina 294 hasta el de la histidina 316 y desde el codón codificante de la metionina 356 hasta el de la alanina 372. Para la construcción de este plásmido se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida (ver apartado 4.2 de Materiales y métodos) tomando como molde el plásmido pGEM-T-Easy-CrzA <sup>$\Delta$ CDD1</sup>-GFP y para su

amplificación mediante PCR los oligonucleótidos  $\Delta$ CDD2-fw y  $\Delta$ CDD2-rv. La región codificante *crzA-gfp* del plásmido resultante fue secuenciada para verificar la ausencia de cambios adicionales en la secuencia de nucleótidos. La recuperación del inserto para su uso en la transformación de *A. nidulans* se consiguió mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos CrzA(1) y CrzA(4).

### 2.4.2. Plásmidos utilizados para la transformación de *A. nidulans*.

**pgpdA-pyroA\***: plásmido basado en pBS-SK+ utilizado como vector de las diferentes formas truncadas de *crzA*, clonado y propagado en la cepa DH1 de *E. coli*. Este plásmido permite expresar de forma constitutiva y a niveles moderado quimeras utilizando un fragmento de 360pb del promotor del gen codificante de la gliceraldehido 3-P deshidrogenasa, *gpdA*. A este promotor reducido funcionalmente se le denomina *gpdA<sup>mini</sup>*. Este plásmido también incorpora un fragmento de 1,5 kb del gen *pyroA* (*pyroA\**) que se encuentra truncado a 807 pb de su secuencia codificante y que sirve para dirigir su integración al locus mutante *pyroA4*. Se encuentra disponible en la colección del laboratorio con el número p1660 (Pantazopoulou *et al.* 2009).

**Plásmidos pgpdA-GFP-CrzA(xx-yy)-pyroA\***: para la construcción de la colección de plásmidos portadores de los distintos truncamientos de CrzA se utilizaron los casetes obtenidos por PCR del cDNA de *crzA* a partir de oligonucleótidos que introdujeron en la región codificante correspondiente al extremo N-terminal de la proteína una diana *NcoI* y en la correspondiente al extremo C-terminal una diana *EcoRI*. Así los diferentes casetes de DNA de la región codificante de *crzA* se digirieron con las enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI* y fueron introducidos en el plásmido pgpdA-pyroA\* digerido con las enzimas anteriores. Los plásmidos recombinantes obtenidos, una vez verificados en la correcta inserción del casete *crzA*, fueron digeridos con la enzima *BamHI* (un solo corte en el plásmido) y se introdujo un fragmento *BamHI-BamHI* que codifica para la proteína fluorescente verde y que procedía de la digestión del plásmido p1155 (*palcAp::GFP::PacC(5-250)*), (Mingot *et al.* 2001). Tras comprobar la correcta orientación del inserto se verificó la ausencia de cambios en la CDS de *crzA* tras su manipulación mediante secuenciación. La diana *NcoI* contiene el triplete que codifica para la metionina iniciadora de la quimera y cuya expresión será ahora dirigida por el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*. Los plásmidos generados por este método y los oligonucleótidos empleados para la obtención de los casetes fueron los siguientes:

- pgpdA-GFP-CrzA(1-730)-pyroA\*: oligonucleótidos CrzA ol 1 y CrzA *EcoRI*-1
- pgpdA-GFP-CrzA(1-612)-pyroA\*: oligonucleótidos CrzA ol 1 y CrzA *EcoRI*-2
- pgpdA-GFP-CrzA(1-448)-pyroA\*: oligonucleótidos CrzA ol 1 y CrzA *EcoRI*-3
- pgpdA-GFP-CrzA(445-730)-pyroA\*: oligonucleótidos CrzA *NcoI*-2 y CrzA *EcoRI*-1

- pgpdA-GFP-CrzA(445-612)-pyroA\*: oligonucleótidos CrzA NcoI-2 y CrzA EcoRI-2
- pgpdA-GFP-CrzA(608-730)-pyroA\*: oligonucleótidos CrzA NcoI-3 y CrzA EcoRI-1

**pgpdA-GFP-(CrzA445-730<sup>ΔK487-H492</sup>)-pyroA\***: este plásmido se construyó a partir del pgpdA-GFP-CrzA(445-730)-pyroA\* utilizando los oligonucleótidos ΔNLS-fw y ΔNLS-rv para generar una deleción interna desde el codón codificante de la lisina 487 hasta el de la histidina 492, incluyendo ambos, mediante la técnica de mutagénesis dirigida (ver apartado 4.2 de Materiales y métodos). La región codificante *crzA-gfp* del plásmido resultante fue secuenciada para verificar la ausencia de cambios adicionales en la secuencia de nucleótidos.

#### 2.4.3. Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en *E. coli*.

**pGEX-2T**: plásmido comercial de Pharmacia. Permite expresar en *E. coli*, cepa DH1, la proteína glutation S-transferasa (GST) fusionada al extremo amino terminal de la proteína objeto de estudio. Este plásmido se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST y la fusión cuya construcción a continuación se detalla.

**pGEX-CrzA**: para generar este plásmido se partió del plásmido pGEX-PacC(5-678), disponible en la colección del laboratorio, reemplazando la CDS de PacC por la de CrzA como a continuación se detalla. La digestión del plásmido receptor con las enzimas *NcoI* y *EcoRI* permitió la liberación del casete PacC(5-678) y la recuperación del plásmido pGEX-2T linearizado y flanqueado por las dianas *NcoI* y *EcoRI*. El cDNA de *crzA* se obtuvo a partir del plásmido pgpdA-GFP-CrzA(1-730)-pyroA mediante una doble digestión con las enzimas *NcoI* y *EcoRI*. El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se verificó por secuenciación. Este plásmido permite expresar la fusión GST-CrzA(1-730) de forma dependiente del inductor IPTG.

**pGEX-CrzA<sup>ΔCDD2</sup>**: este plásmido se construyó a partir del pGEX-CrzA utilizando los oligonucleótidos ΔCDD2-fw y Δ CDD2-rv para generar una deleción interna desde el codón codificante de la metionina 356 hasta el de la alanina 372 mediante la técnica de mutagénesis dirigida (ver apartado 4.2 de Materiales y métodos). La CDS de *crzA* en el plásmido resultante fue secuenciada para verificar la ausencia de cambios adicionales en la secuencia de nucleótidos. Este plásmido se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup>.

### 3. Generación de cepas mutantes.

#### **3.1. Transformación de *A. nidulans*.**

La transformación de *Aspergillus* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Tilburn et al. (Tilburn *et al.* 1983). Se inocularon  $2 \times 10^6$  conidiosporas de la cepa a analizar en 400 ml de medio mínimo líquido conteniendo las fuentes de carbono y nitrógeno habituales, D-glucosa y tartrato amónico, y los suplementos necesarios para su correcto crecimiento. El micelio del hongo se cultivó durante 14h a 30°C en agitación y se recolectó por filtración. Tras resuspender 1 g de micelio húmedo en 20 ml de Solución 2 (1,2 M  $MgSO_4$ , 10 mM  $NaH_2PO_4$ , pH=5,8) 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 horas con agitación suave. La formación de protoplastos se comprobó mediante la observación de una muestra de la mezcla de digestión utilizando un microscopio con óptica de contraste de fase. Una vez determinada la presencia de protoplastos de calidad suficiente en la preparación se procedió a su aislamiento y lavado. Así, 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 Solución 5 (0,6 M D-sorbitol, 0,1M Tris-HCl pH=7.5) con mucha precaución, sin que las dos fases se mezclasen. Tras centrifugar la solución bifásica en una centrífuga Eppendorf 5810-R utilizando el rotor basculante A-4-44, refrigerado a 4°C durante 10 minutos a 4400 rpm, el concentrado de protoplastos generado entre las dos fases fue recogido con una pipeta Pasteur estéril y diluido añadiendo 2 volúmenes de Solución 6 (1 M D-sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH=7,5). La suspensión de protoplastos se centrifugó de nuevo a 2800 rpm a 4°C durante 10 minutos en la misma centrífuga, se separaron los protoplastos sedimentados y se resuspendieron en 1 ml de Solución 6 para limpiarlos de impurezas. Los protoplastos fueron concentrados mediante centrifugación y resuspensión en Solución 7 (200  $\mu$ l/transformación) (1 M D-sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH=7,5, 10 mM  $CaCl_2$ ).

Una vez obtenidos los protoplastos comenzó el proceso de transformación. Para ello, se mezcló una suspensión de protoplastos en Solución 7 con el DNA (vector o casete de transformación, generalmente 1-3  $\mu$ g de DNA llevados a un volumen final de 50  $\mu$ l) y 50  $\mu$ l de Solución 8 (PEG-6000 60% (p/v), 10 mM Tris-HCl pH=7,5, 10 mM  $CaCl_2$ ). Tras incubar la suspensión en hielo durante 20 minutos se añadió 1 ml de Solución 8 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 5ml de Solución 7 y 15 ml de medio de regeneración top agar fundido. Finalmente, 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. Los transformantes fueron purificados hasta la homocariosis y analizados por la técnica de Southern-Blot, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.7 de esta sección.

El DNA empleado para transformar las distintas estirpes de *A. nidulans* puede estar dirigido al reemplazamiento génico en el mismo locus o a una integración del transgen en el locus *pyroA*.

#### **Reemplazamiento génico.**

El DNA utilizado para este tipo de transformación fue DNA en forma lineal obtenido mediante PCR de fusión o recuperación del inserto de los plásmidos descritos en el apartado 2.4.1 mediante PCR estándar. La transformación con estos fragmentos perseguía la sustitución del gen original por la secuencia del transgen mediante un doble sobrecruzamiento en la zona del promotor y del terminador de manera que el gen quedara integrado en su propio locus.

#### **Integración en el locus *pyroA*.**

Los plásmidos empleados en este caso fueron los derivados del *pgpdA-GFP-CrzA(xx-yy)-pyroA\** (ver sección 2.4.2). Para la transformación se utilizó la forma circular covalentemente cerrada de los plásmidos candidatos, por lo que se precisa de un único suceso recombinatorio para integrar el transgen deseado en el locus *pyroA* y restaurar así la prototrofia para piridoxina.

### **3.2. Cruces entre cepas de *Aspergillus*.**

Un número determinado de cepas utilizadas en este trabajo se obtuvieron en la progenie de cruces. Para inducir el ciclo reproductivo sexual entre dos cepas de este hongo se inocularon ambas cepas parentales muy próximas entre sí sobre MCA suplementado con los requerimientos necesarios. Tras 2 días de incubación a 37°C se recortaron pequeñas porciones de la zona de contacto entre las colonias de las cepas parentales y se traspasaron a placas de Petri conteniendo MMA selectivo dado que no permite el crecimiento de las cepas parentales pero si el de los heterocariotes originados por fusión de hifas. A partir de la aparición de colonias heterocarióticas se sellaron las placas con el fin de someter al hongo a condiciones de anaerobiosis que inducen la formación de cigotos y estos a la formación de hifas ascogénicas dentro de unas estructuras especializadas denominadas cleistotecios. Estos cuerpos fructíferos, cleistotecios, se formaron y maduraron tras 15 días de incubación a 37°C. Éstos se recogieron de la placa con una aguja estéril, se depositaron en una placa con MMA y agar al 1,5% (p/v) y se rodaron sobre este medio hasta que se desprendieron las células de Hülle y los cleistotecios quedaron limpios. Posteriormente cada cleistotecio se introdujo en un tubo de 1,5 ml con 100 µl de agua estéril y se rompió contra las paredes del tubo para liberar las ascosporas. Se inocularon 5 µl de esta solución en una placa de MMA selectivo y se cultivaron 2 días a 37°C para comprobar

si el cleistotecio era híbrido dado que existirían descendientes capaces de crecer en un medio en el que no crecen los parentales. El genotipo de los descendientes se analizó en placas de MMA selectivas para cada uno de los marcadores de las estirpes parentales.

### **3.3. Transformación de *E. coli*.**

Se utilizó la técnica del choque térmico para la transformación de células competentes de las cepas DH1 o DH5 $\alpha$  de *E. coli* (ver tabla M-2). En un tubo se mezclaron 100  $\mu$ l de células competentes con la cantidad adecuada de DNA. La mezcla se mantuvo en hielo durante 20 min, se incubó a 37°C durante 2 minutos y se volvió a dejar en hielo durante 1min. Tras añadir 1 ml de medio LB, se incubó la mezcla a 37°C y 250 rpm, durante 1 hora. Volúmenes variables de la mezcla de transformación fueron inoculados sobre medio LB sólido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/ml.

## **4. Manipulación de ácidos nucleicos.**

### **4.1. Construcción de casetes mediante PCR de fusión.**

Para la obtención de los casetes de reemplazamiento génico se siguió la técnica denominada PCR de fusión (Yang *et al.* 2004). La enzima utilizada para las reacciones de PCR fue la polimerasa, con actividad correctora 3'-5'/5'-3', Prime Star® HS DNA polimerase (Takara). Las condiciones de PCR utilizadas fueron las indicadas en el protocolo del fabricante.

Para la generación de alelos nulos se fusionaron las regiones flanqueantes 5' y 3' (aproximadamente 1,5 kb) al CDS del gen cuyo nulo se quería realizar, y entre ambos fragmentos, el marcador de auxotrofia.

Para la construcción de proteínas etiquetadas en el extremo C-terminal se fusionó al CDS del fragmento que se quiere etiquetar el casete que codifica para los epítomos GFP o mCherry, que a su vez portan el marcador de auxotrofia. Para la construcción del casete completo se fusionó el fragmento anterior a la región 3' UTR (alrededor de 1,5 kb) del gen. El codón stop fue eliminado de las regiones codificantes para mantener la fase de lectura en la proteína quimera.

En el caso del doble etiquetado Myc<sup>3</sup>-CrzA-HA<sup>3</sup>, el casete de transformación se obtuvo mediante PCR de fusión etiquetando el CDS de *crzA* con ambos epítomos y fusionándolo a las regiones flanqueantes 5' y 3' UTR de *crzA*. Este casete no portaba ningún marcador de auxotrofia y la obtención de las cepas mutantes se consiguió mediante la selección de transformantes

resistentes a una concentración 50 mM  $\text{CaCl}_2$  en presencia de 1 mM  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ . El sulfato de cobre se utilizó para reducir el fondo de crecimiento de la cepa nula *crzA* en MMR.

#### 4.2. Mutagénesis dirigida.

Esta técnica se utilizó para generar deleciones internas en la secuencia de *crzA*. En primer lugar, se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos. Ambos oligonucleótidos deben contener la mutación y su secuencia debe ser igual a la del plásmido y entre ellas, pero en dirección opuesta. Los oligonucleótidos deben tener una longitud de entre 25 y 45 bases, conteniendo la mutación en la mitad y al menos 10-15 bases de la secuencia original a cada lado. La TM de los oligonucleótidos debe ser elevada y se recomienda al menos 78°C. Siguiendo la norma habitual, es aconsejable que el porcentaje de guaninas y citosinas supere el 40% y que el extremo 3' sea rico en contenido G+C. Utilizando la pareja de oligonucleótidos mutagénicos se realizó una PCR de 15 ciclos en los que el factor limitante es el paso de extensión que debe ser suficientemente extenso para que la polimerasa replique el plásmido completo. 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 *E. coli* y de entre las cepas transformantes se seleccionaron aquellas que contenían el plásmido modificado tras verificación de la inserción de la mutación que fue preferentemente mediante secuenciación.

#### 4.3. Extracción de DNA genómico de *A. nidulans*.

Para proceder a la extracción del gDNA se recolectaron 300mg de micelio mediante filtración del cultivo a través de Miracloth, se congelaron en nieve carbónica y posteriormente se liofilizaron durante 10 horas 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 añadieron 100  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% y se incubó durante 15 minutos a 65°C. Al extracto fúngico se le añadió 1 ml de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:48:2) y se agitó 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 13000 rpm. La fase acuosa fue recogida y sometida nuevamente al mismo proceso de lavado. El gDNA se precipitó

añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M, pH=6,0 y 0,6 volúmenes de isopropanol respecto a lo recogido de DNA. A continuación, se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13000 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  $\mu$ l de agua Milli-Q autoclavada. Para eliminar posibles restos de RNA se incubó cada muestra con 5 mg/ml de RNasa-A (Roche) 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% y una vez seco el gDNA se resuspendió en 100-200  $\mu$ l de agua Milli-Q almacenándolo a -20°C hasta su utilización.

#### 4.4. Extracción de DNA plasmídico de *E.coli*.

La colonia bacteriana con DNA plasmídico a extraer fue inoculada en 10 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/ml. La bacteria se creció a 37°C y 250 rpm, durante 15 horas, para posteriormente extraer el DNA de plásmido mediante el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). La correcta extracción fue verificada mediante electroforesis de agarosa (0,8% p/v) en TAE 1x.

#### 4.5. Extracción de RNA total.

Las muestras cultivadas en el medio mínimo descrito en el apartado 1.2 fueron filtradas y congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente. Éstas fueron molidas en mortero de porcelana con ayuda del nitrógeno líquido, evitando en todo momento que las muestras se descongelaran. El triturado de micelio obtenido 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 12000g 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 y centrifugando después a 12000 g durante 10 minutos a 4°C precipitando así el RNA. A continuación, se eliminó el sobrenadante por vacío y se añadió 1 ml de una solución de etanol/agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma) al 75% (v/v).

Tras mezclar y disolver el RNA, se centrifugaron las muestras a 7500g 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 nm.

#### 4.6. Síntesis y aislamiento de cDNA.

La síntesis de DNA codificante se realizó con el kit AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit de Invitrogen. La primera hebra se obtuvo usando como molde para la reacción 0,5 µg de una extracción de RNA total de una cepa silvestre y el oligonucleótido Oligo-(dT) del kit en las condiciones indicadas por el fabricante. La amplificación del cDNA específico para cada gen se realizó mediante PCR con oligonucleótidos adecuados (Tabla M-3), utilizando como molde 2 µl de la reacción de síntesis de cDNA y la polimerasa Prime Star® HS DNA polimerase (Takara). Las condiciones de PCR fueron las indicadas por el fabricante de la polimerasa, con ligeras variaciones en función de los oligonucleótidos empleados y el tamaño del cDNA a amplificar.

#### 4.7. 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 (Sambrook *et al.* 1989). 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 320nm de longitud de onda durante 15 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 (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 (Sambrook *et al.* 1989). El DNA fragmentado se fijó a la membrana exponiendo ésta durante 5 minutos a luz UV, utilizando para ello un transiluminador (Biorad GelDoc System).

La membrana fue incubada en solución de hibridación de Church (para 200 ml: 2 g BSA, 400 µl EDTA, 70 ml SDS 20x, 60ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y completando con agua Milli-Q hasta el volumen final, el pH de la solución ha de ser próximo a valor 7) (Church *et al.* 1984) durante 2

## **Materiales y Métodos**

---

horas, antes de proceder a la hibridación con una sonda específica de DNA marcada radiactivamente con  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-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 50ml cada uno utilizando una solución 2x SSC/0,1% SDS a temperatura ambiente y posteriormente dos lavados con 50ml 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 radioactividad 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 radioactividad utilizando un Phosphorimager Fujifilm FLA-3000. Las imágenes se procesaron y analizaron con el programa informático Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

### **4.8. 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 corrieron un total de 10  $\mu$ g de RNA total de cada muestra/condición en un gel desnaturalizante de agarosa/formaldehído. Para preparar un gel de 100 ml se fundió 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. 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  $\mu$ l de formamida, 4  $\mu$ l de formaldehído (33%), 2,5  $\mu$ l de MOPS 10x y el volumen adecuado de cada muestra de RNA en un total de 10  $\mu$ l con agua Milli-Q tratada con DEPC.

Tras incubar las muestras preparadas durante 15 minutos a 65°C, se añadió la solución de carga, y se corrió en el gel a 30-40V 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 4.7 de Materiales y métodos). Como paso previo a la transferencia por capilaridad el gel fue lavado con agua para eliminar el formaldehído 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.

## **5. Manipulación de proteínas.**

### **5.1. Extracción de proteína total de *A. nidulans*.**

El micelio del hongo se cultivó en el medio de fermentación, descrito en el apartado 1.5 de esta misma sección, adecuadamente suplementado durante 18 horas a 37°C. Para los experimentos de inducción de estrés tras este periodo de incubación, el medio de cultivo se suplementó a partir de las soluciones salinas descritas en el apartado 1.1 y se prolongó la incubación a 37°C durante diferentes tiempos de inducción de estrés según se indique en el texto. La masa de micelio fue recolectada mediante las dos técnicas diferentes que se detallan a continuación:

#### **Método de recolección 1:**

La masa de micelio se filtró a través de Miracloth (muselina con un poro de 22-25  $\mu\text{m}$  Calbiochem 475855), se escurrió manualmente hasta deshidratarla y se congeló utilizando nieve carbónica.

#### **Método de recolección 2:**

Para reducir el tiempo de filtrado y manipulación de la muestra se filtró el cultivo a través de membranas de nitrocelulosa de un tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  (Scharlau) empleando una bomba de vacío (BioRad) y posteriormente se congelaron las muestras de micelio utilizando nieve carbónica.

En ambos casos el micelio congelado se liofilizó durante 10 horas en un liofilizador Cryodos (Telstar) y se trituró en el 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). Los extractos proteicos totales de las distintas cepas de *A. nidulans* se obtuvieron siguiendo dos protocolos diferentes, dependiendo de la necesidad de manipulación de los extractos en posteriores experimentos (método 1) o su uso exclusivo en la detección por "Western-blot" (método 2).

#### **Método 1 de extracción de proteínas totales:**

Entre 200 y 250 mg de micelio pulverizado fueron resuspendidos en 1 ml de tampón de extracción A50 (Orejas *et al.* 1995) (25 mM Hepes pH 7,5, 0,1 M EDTA, 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glicerol, 0,5 mM DTT) suplementado con la mezcla estandarizada de inhibidores de proteasas (1  $\mu\text{M}$  pepstatina, 0,6  $\mu\text{M}$  leupeptina y 1 mM Pefablock). Tras la completa suspensión del micelio en el tampón A50 apropiadamente suplementado, se centrifugó durante 30 minutos a 14000 g y 4°C, recogiendo posteriormente el sobrenadante. La concentración de proteína en los extractos

se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el compuesto comercial Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad). Los extractos proteicos se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. En todos los casos las muestras de proteínas que han de ser analizadas por PAGE se prepararon precipitando un total de  $100\ \mu\text{g}$  del extracto total de proteínas añadiendo 1/10 del volumen final de TCA preparado al 100% y manteniendo la mezcla en hielo durante 5 minutos. Las proteínas así precipitadas se sedimentaron centrifugando 5 minutos a  $14000\ \text{rpm}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavaron con mezclas de Etanol/Eter 1:1 y 1:3, consecutivamente, centrifugando y retirando el sobrenadante cada vez. Finalmente, el sedimento de proteínas se secó por evaporación del remanente de solución de lavado y se resuspendió en  $40\ \mu\text{l}$  de tampón de carga PAGE (TCPAGE) ( $62,5\ \text{mM}$  Tris-HCl  $\text{pH}=6,8$ , 2% SDS (p/v), 5%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v), 6 M urea, 0,05% azul de bromofenol (p/v)). Las muestras se calentaron a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, como paso previo a su análisis por PAGE.

### **Método 2 de extracción de proteínas totales:**

Aproximadamente 6-7 mg de micelio pulverizado fueron resuspendidos en 1 ml de tampón de lisis (solución acuosa con 0,2 M NaOH, 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol). Se precipitaron las proteínas añadiendo TCA al porcentaje final de 7,5% (v/v) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Seguidamente, se centrifugaron a  $14000\ \text{rpm}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Esta operación se repitió dos veces. El sedimento se solubilizó en  $100\ \mu\text{l}$  de Tris Base 1 M. Finalmente se añadieron  $200\ \mu\text{l}$  de TCPAGE, se mezcló la suspensión en el vórtex y se calentaron las muestras durante 2 minutos a  $90^{\circ}\text{C}$ , centrifugando a continuación para recuperar el líquido condensado en las paredes del tubo. Se repitieron los pasos de calentamiento a  $90^{\circ}\text{C}$  y centrifugación de las muestras antes de cargarlas en un gel de poliacrilamida-SDS.

### **5.2. Ensayo *in vitro* de desfosforilación.**

Partiendo de  $100\ \mu\text{g}$  de proteína de extractos totales obtenidos mediante el Método 1 se añadieron 400 U de proteína fosfatasa del fago lambda ( $\text{PP}\lambda$ ) (BioLabs. Ref. 1-800-632-7799),  $10\ \mu\text{l}$  de tampón (10x) de digestión  $\text{PP}\lambda$  y  $10\ \mu\text{l}$  de solución  $\text{MnCl}_2$  (10x, 10 mM), ambas soluciones proporcionadas por el fabricante de la enzima. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de  $100\ \mu\text{l}$  con agua Milli-Q y la mezcla se incubó 20 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ . El análisis de cada extracto proteico se complementa con tres ensayos adicionales: una reacción control sin la enzima  $\text{PP}\lambda$ , una reacción sin  $\text{PP}\lambda$  y añadiendo ortovanadato sódico 10 mM (cf.), un inhibidor específico de la fosfatasa, y una tercera reacción a la que se añadió tanto  $\text{PP}\lambda$  como su inhibidor. Las reacciones se pararon aumentando el volumen final de las mezclas hasta los  $300\ \mu\text{l}$  con agua Milli-Q así como

precipitando las proteínas añadiendo TCA 10% (v/v). A partir de este punto las muestras se prepararon como se indica anteriormente para su análisis por PAGE.

**5.3. 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 precipitadas, resuspendidas en TCPAGE y calentadas a 90-95°C como se explica en el apartado anterior. Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes del 10% SDS-poliacrilamida utilizando el sistema MiniProtean® 3 de BioRad (Laemmli, 1970) o en geles en gradiente de SDS-poliacrilamida 4–15% MiniProtean® TGXTM *precast polyacrylamide gels* de BioRad.

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 antígeno con los anticuerpos primarios detallados en la tabla M-4. 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.

<b>Anticuerpos</b>		<b>Dilución</b>	<b>Fuente</b>	<b>Referencia</b>
<b>Primarios</b>	$\alpha$ -GFP	1:5000	Ratón	Roche
	$\alpha$ -cMyc	1:10000	Ratón	Sigma
	$\alpha$ -HA	1:1000	Rata	Roche
	$\alpha$ -actina	1:50000	Ratón	ICN Biomedicals Inc
<b>Secundarios</b>	$\alpha$ -mouse IgG	1:4000	Cabra	Jackson Immunoresearch Laboratories
	$\alpha$ -rat IgM + G	1:4000	Cabra	Southern Biotech

**Tabla M-4: Listado de anticuerpos empleados en esta tesis doctoral.**

### 5.4. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

La expresión de proteínas recombinantes se llevó a cabo en la cepa DH1 de *E. coli* (ver Tabla M-2) utilizando el plásmido de expresión pGEX-2T o plásmidos derivados de éste (ver apartado 2.4.3 de Materiales y Métodos). Se cultivó la bacteria en 10 ml de medio LB con antibiótico a 37°C durante 16 horas. Se diluyeron 2 ml del cultivo en un volumen final de 100 ml de LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y se incubó con agitación orbital a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una OD<sub>600</sub>= 0,5-0,8. El crecimiento se detuvo incubando los cultivos a 4°C durante 1 hora. En ese momento se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM y se incubó nuevamente a 15°C durante 24 horas. Seguidamente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 15 ml de PBS (150 mM NaCl, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) al que se había añadido los siguientes inhibidores de proteasas: 1 mM Pefabloc, 1 µM Pepstatina y 0,6 µM Leupeptina. Las células fueron lisadas utilizando una French Press, realizando 3 pasos a una presión de 1200 psi. El lisado fue clarificado de restos celulares mediante un paso de centrifugación a 14000 rpm durante 25 minutos a 4°C, recogiendo a continuación el sobrenadante que fue guardado a -80°C hasta su utilización.

### 5.5. Experimentos de "pull-down".

Los experimentos de interacción proteína-proteína ("pull-down") se realizaron utilizando como cebos proteínas de fusión a la glutatión-S-transferasa, GST, expresadas en la cepa DH1 de *E. coli* y como presas las proteínas etiquetadas contenidas en extractos proteicos totales de *A. nidulans*.

En un primer paso de preparación de la resina, se centrifugó 40 µl de glutatión-S-sefarosa (Amersham) durante 2 minutos a 5000 rpm para eliminar el etanol 20% presente en la resina. Posteriormente se lavó la resina con 5 volúmenes de PBS (150 mM NaCl, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) al que se le habían añadido 0,5 mM de DTT así como inhibidores de proteasas (1 mM Pefabloc, 1 µM Pepstatina, 0,6 µM Leupeptina). Se realizó un segundo lavado siguiendo el mismo procedimiento alternando centrifugaciones en cada ocasión de 5000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente se incubó el extracto proteico de una cepa de *E. coli* con esta resina durante 1 hora a 4°C utilizando una plataforma giratoria vertical. Seguidamente, se realizaron 3 ciclos de lavado de la resina con la proteína de fusión a GST unida con 5 volúmenes de PBS + DTT + inhibidores de proteasas y suplementadas con 0,5% Tritón X-100 (Roche, ver apartado 1.1.) para retirar las proteínas de *E. coli* que pudieran haberse quedado inespecíficamente atrapadas en la

resina. A continuación se incubó durante 1 hora con 2 mg del extracto proteico de la cepa de *A. nidulans* que expresa la proteína de interés etiquetada. Una vez transcurrido ese tiempo, la resina que contenía los posibles complejos de interacción fue lavada 5 veces con 5 volúmenes de PBS + DTT + inhibidores de proteasas + 0,5% Tritón X-100, para finalmente resuspenderla en TCPAGE como paso previo a su análisis mediante SDS-PAGE con tinción Coomassie, y "Western-blot" (ver apartado 5.3 de Materiales y Métodos) para determinar la interacción proteína-proteína en estudio.

## **6. Microscopía de fluorescencia.**

Para la observación *in vivo* de las distintas muestras se utilizó un microscopio invertido Leica DMI6000B (Leica) equipado con un incubador Tempcontrol 37-2 digital, (PeCon), una lámpara externa EL6000 para la excitación de epifluorescencia y un objetivo HCX 63x 1,4N.A. La fluorescencia procedente de cada proteína fluorescente se detectó mediante los filtros TX2 (Leica), para la detección de mCherryRed, y GFP-3035B (Semrock Brighthline) para la detección de GFP. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital ORCA-ER II (Hamamatsu Photonics) y el programa de obtención y tratamiento de imagen fue Metamorph (Molecular Devices). Los kimgogramas y ajustes de contraste fueron hechos con Metamorph (Molecular Devices). Las fusiones de colores fueron hechas con el programa de tratamiento de imágenes Wasabi (Hamamatsu Photonics). Las secuencias de imágenes adquiridas en el tiempo se convirtieron al formato QuickTime utilizando el paquete informático libre ImageJ 1.37 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

En cada observación se inoculó la solución de conidiosporas en placas de multipocillo con fondo de plástico y superficie hidrofóbica (uncoated  $\mu$ -Slide 8 well, Ibidi GmbH, Germany) conteniendo el medio específico para microscopio WMM (apartado 1.3 de Materiales y métodos). Estos minicultivos se incubaron a 25°C durante 16-18 horas a excepción de la cepa MAD3844 (*ΔgskA*) que se incubó a 37°C durante 20 horas.

En todas las muestras se tomaron imágenes a las células en las condiciones basales de cultivo como paso previo a los tratamientos realizados. Para cada ensayo el medio de crecimiento fue reemplazado por medio de cultivo fresco suplementado con los distintos compuestos que se detallan a continuación:

El estrés catiónico se indujo mediante la suplementación del medio de cultivo de reemplazamiento con 10 mM de  $MnCl_2$ , 100 mM de  $MgCl_2$ , 1 M de NaCl o 1 M de KCl. La concentración empleada de forma rutinaria en los experimentos con calcio fue de 50 mM de  $CaCl_2$ , excepto cuando se indique lo contrario. Para la alcalinización del pH (pH8) del medio de

## **Materiales y Métodos**

---

cultivo se añadió una solución concentrada de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hasta una concentración final de 100 mM, mientras que la acidificación del medio (pH5,8) se consiguió mediante la adición de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a la concentración final de 100 mM. La respuesta a los diferentes estímulos fue observada a diferentes intervalos desde el inicio del tratamiento hasta transcurridos 30 minutos.

Los núcleos del sincitio se visualizaron *in vivo*, cuando no se utilizó como marcador nuclear la histona H1 etiquetada con mCherry, mediante tinción con DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole, (ver preparación de la solución concentrada sección 1.1 Materiales y Métodos). Para ello se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco suplementado con 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DAPI y 0,01% de Tritón X-100.

### **7. Herramientas bioinformáticas.**

Para la búsqueda de secuencias se utilizaron las bases de datos del Broad Institute y del NCBI. El diseño y el análisis de las diferentes construcciones se llevaron a cabo gracias al programa Vector NTI (Invitrogen). Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa Clustal X o W (Thompson *et al.* 1997) y el programa GeneDoc facilitado por el Sistema de Recursos de Supercomputación de Pittsburgh. La predicción de sitios fosforilables en las proteínas se realizó usando el programa informático NetPhosK (Blom *et al.* 2004).

Las imágenes de los “Western-blot” se obtuvieron mediante un Analizador de Imágenes de Quimioluminiscencia, 06-LAS3000Q (TDT) de FUJI y se analizaron 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 "revelaron" mediante un lector Phosphorimager Fujifilm FLA-3000. Las imágenes se procesaron y analizaron con el programa informático Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

# **RESULTADOS: SECCIÓN I**

## **Señalización molecular de CrzA**



## **1. Identificación de regiones funcionales mediante el análisis de formas truncadas de CrzA.**

En estudios anteriores a este trabajo se ha mostrado la función del factor transcripcional (FT) CrzA en *Aspergillus nidulans* en respuesta a ciertos estreses ambientales, dado que cepas mutantes  $\Delta crzA$  no pueden crecer en medio tamponado a pH alcalino o conteniendo elevadas concentraciones de ciertos cationes divalentes como el calcio o el manganeso (Hagiwara *et al.* 2008; Spielvogel *et al.* 2008). CrzA es un factor transcripcional cuyo dominio de unión a DNA está formado por tres dedos de zinc, dos del tipo clásico  $C_2H_2$  y un tercero del tipo CCHC. Sin embargo, fuera de la región que contiene los dedos de zinc este alto grado de conservación en su estructura primaria se ve notablemente reducido entre los homólogos Crz procedentes de hongos filamentosos, de aquí en adelante denominados CrzAs, y drásticamente entre los de hongos levaduriformes, denominados Crz1s. Puesto que los principales estudios funcionales han sido realizados con la proteína Crz1p de *Saccharomyces cerevisiae* y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se procedió a realizar un análisis de las regiones funcionales en CrzA y el posible mecanismo regulador que pudiese actuar sobre las mismas.

### **1.1. Expresión constitutiva de construcciones mutantes de *crzA* para el estudio de regiones funcionales.**

Para determinar las posibles regiones funcionales en CrzA se generaron una colección de cepas que expresaban formas truncadas de este FT. Estratégicamente la proteína se dividió en tres regiones tomando como referencia el DBD y la conservación de secuencias entre factores Crz de hongos levaduriformes y los filamentosos. Así, se determinó una amplia región amino terminal (N-terminal), desde la metionina iniciadora hasta el DBD que está presente en todos los factores Crz y la región carboxilo terminal (C-terminal) de menor tamaño y presente sólo en los CrzAs de hongos filamentosos (Ver diagrama en la figura R1-A).

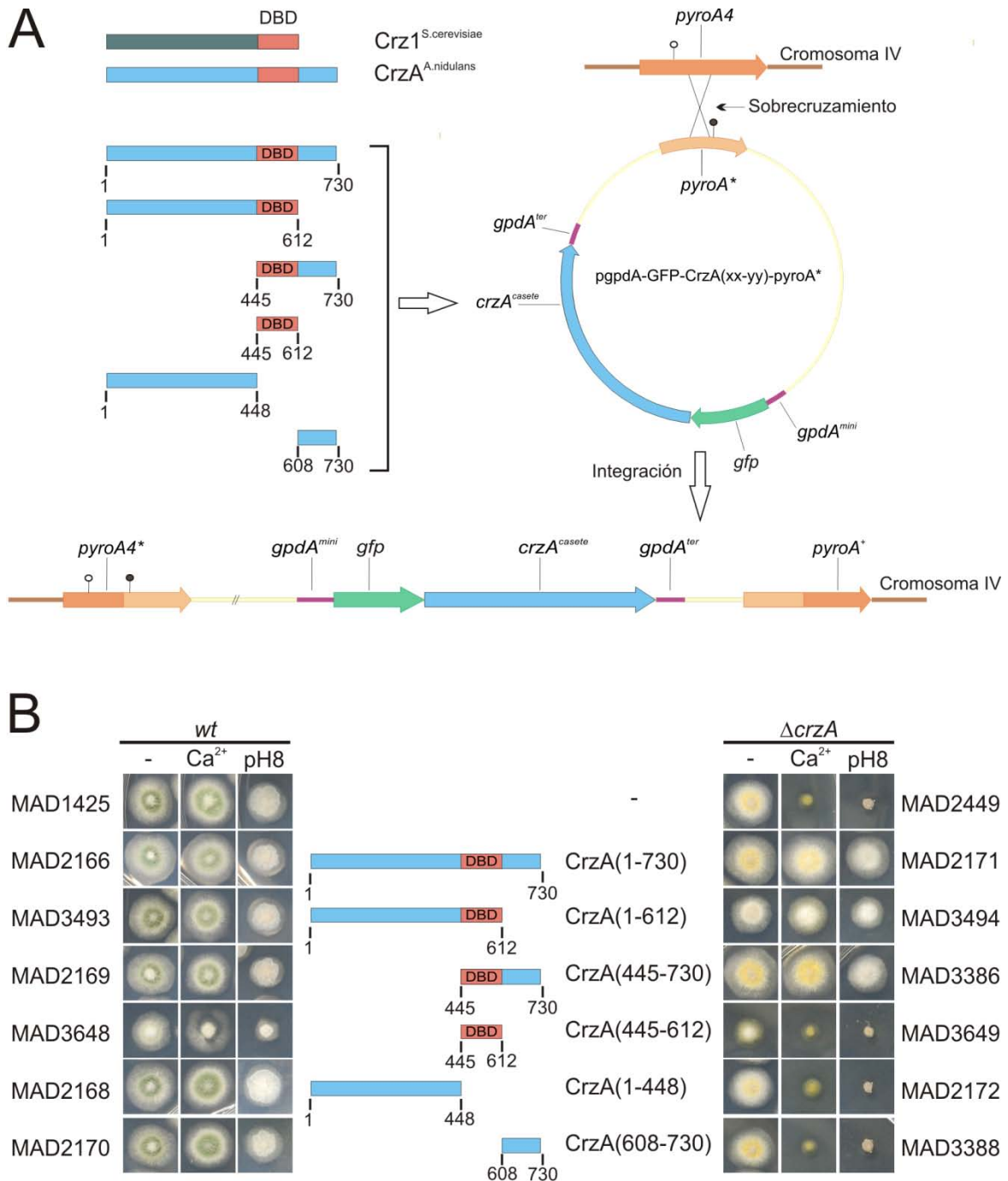
Metodológicamente, se generaron seis casetes que contenían toda o parte de la región CDS de CrzA como se muestra en el esquema de la figura R1-A. A continuación se introdujeron en un plásmido que permitió su expresión en *Aspergillus* de forma constitutiva a niveles poco elevados haciendo uso del promotor *gpdA<sup>mini</sup>* (Materiales y métodos, apartado 2.4.2). Además estas formas truncadas estaban fusionadas en su extremo N-terminal con la proteína fluorescente verde (GFP), lo que permitió su visualización por microscopía e inmunodetección en ensayos de "Western-blot" (WB) (apartados 5 y 6 de Materiales y métodos).

La colección de plásmidos generados fueron introducidos de forma secuencial en *A. nidulans* por transformación tanto en una cepa silvestre (MAD1425) como en una cepa nula  $\Delta crzA$  (MAD2449). Estos plásmidos son integrativos y se dirigieron al locus *pyroA* situado en el cromosoma IV. Los transformantes seleccionados en cada cepa receptora fueron analizados por "Southern-blot" y sólo aquellos que portaban una copia del plásmido fueron seleccionados para posteriores experimentos. Así se eligieron las seis cepas en fondo *crzA* silvestre, indicadas en la figura R1-B, izquierda, y las seis cepas en fondo nulo *crzA*, indicadas en la figura R1-B, derecha.

La presencia de una copia extra del gen *crzA* expresado de forma constitutiva no alteró el crecimiento colonial de la cepa (comparar cepas MAD1425 y MAD2166) (Figura R1-B). Más importante era el resultado que mostraba que la forma GFP-CrzA(1-730) revertía el fenotipo de sensibilidad frente al calcio y al pH alcalino que muestra la cepa nula  $\Delta crzA$  (comparar cepas MAD2449 y MAD2171, figura R1-B). Por lo tanto la versión etiquetada GFP-CrzA(1-730) es funcional y no interfiere con la proteína CrzA endógena, mostrando así que se había generado una herramienta adecuada para el estudio sistemático y funcional de las formas truncadas de CrzA.

Las cepas MAD3493 y MAD3494 expresan una forma truncada que elimina la región C-terminal adyacente a los dedos de zinc que aparece exclusivamente en los hongos filamentosos. La forma CrzA(1-612) mimetiza el tamaño de los homólogos Crz presentes en levaduras (Figuras R1-A). Ambas cepas crecen en todos los medios ensayados, con o sin estrés ambiental, por lo que la fusión GFP-CrzA(1-612) es también funcional. Sorprendentemente, cuando se analizó el fenotipo de las cepas MAD2169 y MAD3386 que expresan la forma truncada CrzA(445-730) en el fondo genético *crzA* silvestre o nulo, respectivamente, se observó nuevamente la supresión de la sensibilidad a elevadas concentraciones de calcio o a la alcalinización del medio. Este resultado sugería que tanto la región N- como C-terminal eran dispensables por separado para remediar la sensibilidad a estas condiciones ambientales de estrés.

Ambas regiones analizadas contienen el DBD que debe ser funcionalmente muy importante para CrzA. Así se procedió a estudiar las cepas que expresaban solamente el DBD y las que expresaban la forma N-terminal o la C-terminal de este FT. El estudio de la forma CrzA(445-612) podría establecer si esta región, común a las dos anteriormente analizadas, sería suficiente para proveer de la función CrzA necesaria. Sin embargo, la expresión desregulada del DBD no sólo no revirtió la sensibilidad a calcio y pH alcalino de la cepa nula  $\Delta crzA$ , MAD3649, sino que además originó alteraciones en el crecimiento colonial, incluso en ausencia de estrés, de las cepas con fondo genético *crzA* silvestre, MAD3648, o nulo, MAD3649 (Figura R1-B).



**Figura R1: Identificación de regiones funcionales en CrzA. A)** Diagrama que representa la estrategia empleada en la generación de cepas *crzA* mutantes. A la izquierda se muestra esquemáticamente la diferencia en la estructura primaria entre Crz1p de *S. cerevisiae* y CrzA de *A. nidulans* y debajo el diseño de las diferentes versiones de CrzA estudiadas. El rectángulo naranja representa el dominio de unión a DNA, DBD, formado por tres dedos de zinc. Los números indican las coordenadas de los aminoácidos inicial y final, tanto de la forma completa como de las formas truncadas de CrzA. A la derecha se muestra el plásmido base utilizado en la construcción de alelos mutantes de *crzA* y el proceso de integración en el genoma de *A. nidulans*. Las coordenadas "(xx-yy)" hacen referencia a los límites de los aminoácidos inicial y final codificados por el casete de DNA, "*crzA*<sup>casete</sup>", insertado en el plásmido. **B)** Análisis fenotípico de las cepas que expresan las diferentes formas de CrzA en un fondo genético silvestre (izquierda) o  $\Delta crzA$  (derecha). Los códigos que identifican a cada una de las cepas en la colección se indican en los laterales. El test de crecimiento en placa se realizó mediante inóculo puntual de conidias sobre MMA (-), suplementado con 50 mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o tamponado a pH alcalino con 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH8). Las imágenes de las colonias fueron tomadas tras su incubación a 37°C durante 48 horas.

Finalmente se analizó la funcionalidad de los extremos terminales de la proteína en ausencia del DBD, formas CrzA(1-448) y CrzA(608-730). Ninguna de estas construcciones expresadas en una estirpe silvestre (cepas MAD2168 y MAD2170) provocaron alteraciones morfológicas en el crecimiento colonial sobre medio sólido y su presencia no alteró la tolerancia al estrés abiótico (Figura R1-B). Sin embargo, como podría esperarse de formas del FT que carecen del DBD, las estirpes  $\Delta crzA$  (MAD2172 y MAD3388) que expresan la proteína truncada CrzA(1-448) o CrzA(608-730) mostraron un fenotipo de sensibilidad a calcio y pH alcalino.

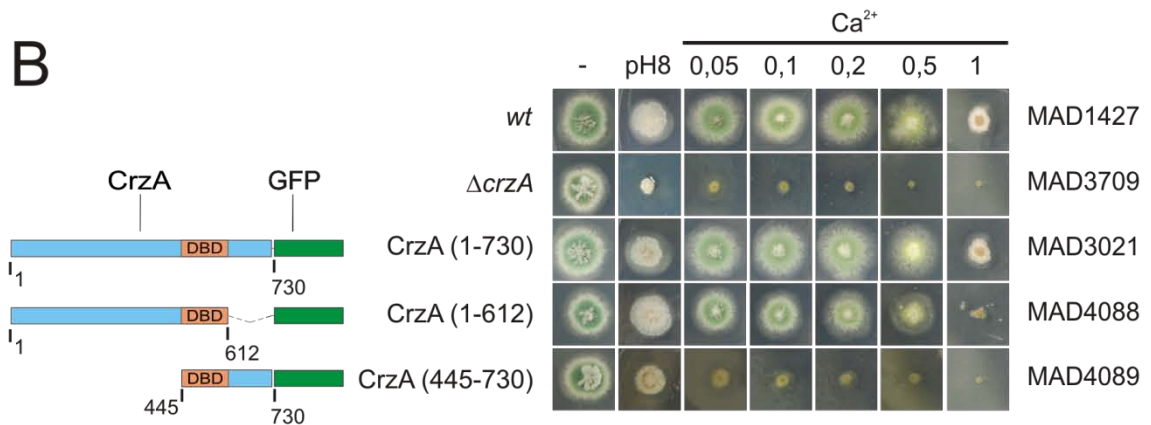
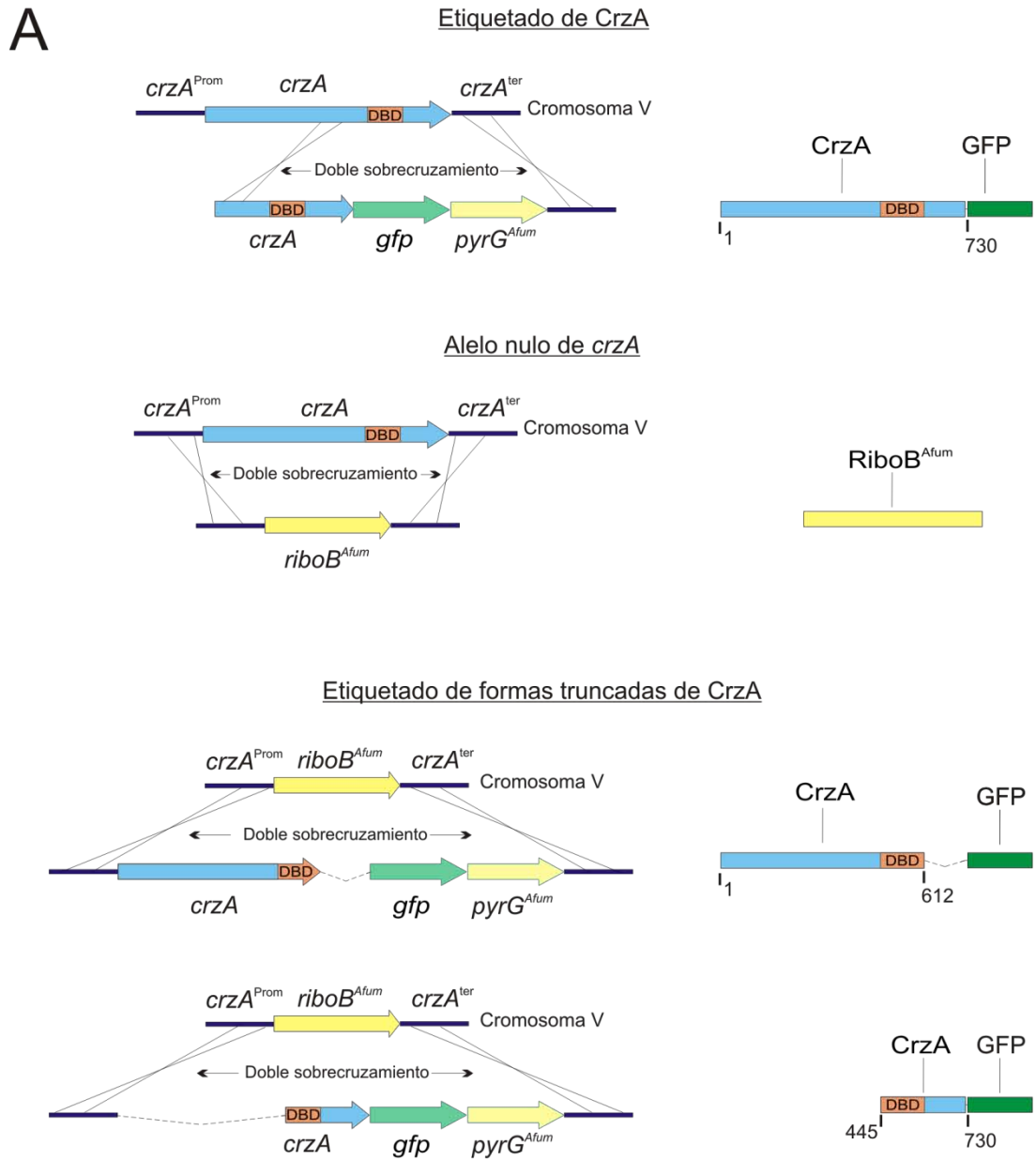
El conjunto de los resultados muestran que la región de los dedos de zinc es esencial para la función de CrzA y sugiere que la expresión de esta región debe originar alteraciones en el patrón de expresión génica dado que incluso interfiere con la actividad del CrzA endógeno. Las regiones flanqueantes al DBD deben modular esta actividad transcripcional y quizás proporcionen de motivos funcionales adicionales.

### **1.2. Reemplazamiento génico de construcciones mutantes de *crzA*.**

Dado que ambos extremos de la proteína acompañados del DBD parecen complementar la ausencia de CrzA bajo un sistema de expresión autónomo, es posible que los fenotipos descritos en la sección anterior fuesen debidos a los altos niveles de proteína generados. Por ello se analizó la funcionalidad de las proteínas truncadas CrzA(1-612) y CrzA(445-730) siendo expresadas bajo el control del propio promotor *crzA* y estando etiquetadas en el extremo C-terminal con el epítipo GFP (Materiales y métodos, apartado 4.1).

Dada la inestabilidad que mostraba la cepa MAD2055 que expresaba la proteína CrzA(1-730)-GFP y que sirvió para el estudio inicial de la localización celular de CrzA en el laboratorio (Spielvogel *et al.* 2008), fue necesario construir una nueva cepa portadora del transgen que codifica para la proteína quimérica CrzA(1-730)-GFP, obteniéndose la cepa MAD3021 (Figura R2-A y descrito en apartado 4.1 de Materiales y métodos). Esta nueva cepa, MAD3021, mostró el mismo fenotipo de resistencia a calcio y pH alcalino que una cepa silvestre (MAD1427) (Figura R2- B) y, como se verá más adelante, además de solventar los problemas de inestabilidad en el crecimiento de la cepa MAD2055, se verificaba la localización celular de CrzA en ausencia o presencia de estímulo.

**Figura R2: Generación de diferentes alelos mutantes de *crzA*.** **A)** Representación esquemática del reemplazamiento del gen silvestre situado en el cromosoma V por los casetes de DNA que permiten el etiquetado de las diferentes versiones mutantes de CrzA o la generación del alelo nulo. **B)** Análisis fenotípico de las cepas portadoras de los alelos mutantes de *crzA*. Las esporas de cada cepa fueron inoculadas sobre MMA (-), MMA alcalino (pH8; 100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y MMA conteniendo las concentraciones molares crecientes de  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que se muestran en la parte superior del panel. 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.



Tras reconstruir la cepa control de este experimento que expresaba la forma completa fusionada a GFP, CrzA(1-730)-GFP, se generó por un procedimiento similar una cepa *crzA* nula que permitía la integración de los nuevos alelos mutantes de *crzA*, MAD3709 (Figura R2-A y descrito en apartado 4.1 de Materiales y métodos). Así mediante la transformación de la cepa MAD3709 con los casetes de reemplazamiento se obtuvieron dos cepas que expresaban como única fuente de CrzA la quimera CrzA(1-612)-GFP, MAD4088, o CrzA(445-730)-GFP, MAD4089 (Figura R2-A).

La cepa control etiquetada toleró, como la cepa de referencia con CrzA sin etiquetar (MAD1427), elevadas concentraciones de calcio extracelular, superando la concentración de 0,5 M CaCl<sub>2</sub> en el medio (Figura R2-B). La cepa que expresaba la forma CrzA(1-612)-GFP creció en presencia de ambos estímulos, calcio y pH básico, no obstante se observó sensibilidad a elevadas concentraciones de calcio (0,5 M y 1 M) (Figura R2-B). Por otro lado, la cepa que expresa CrzA (445-730)-GFP mostró un fenotipo de pérdida parcial de función ya que no se observó tolerancia a concentraciones menores de calcio (0,05 M) aunque sí un moderado crecimiento de la cepa en medio alcalino que era distinguible del que muestra la cepa nula *crzA*, MAD3709 (Figura R2-B).

Todos estos resultados parecen indicar que gran parte de la regulación de la funcionalidad del factor transcripcional debe de residir en la región N-terminal de la proteína aunque se precisa de ambos extremos para la tolerancia a estrés por calcio y pH alcalino.

## **2. Modificación postraduccional de CrzA: Metodología para su detección.**

Como corresponde a un FT, la actividad de Crz1p está relacionada con su localización celular. En *S. cerevisiae* la modificación del patrón de fosforilación de Crz1p determina su distribución en la célula. De este modo, la transducción de señales iniciada por una elevación del calcio extracelular promueve la desfosforilación de Crz1p y su consiguiente transporte al interior del núcleo (ver apartado 2 de Introducción). Al igual que en *S. cerevisiae*, los niveles elevados de calcio en el medio causan la acumulación de CrzA en los núcleos de las células de *A. nidulans* (Spielvogel *et al.* 2008). Con el fin de establecer si los mecanismos reguladores que están actuando sobre CrzA son similares a los descritos en Crz1p se propuso determinar si CrzA es susceptible de ser modificada postraduccionalmente y si la elevación del contenido en calcio y/o la alcalinización del medio altera dicho estado de modificación.

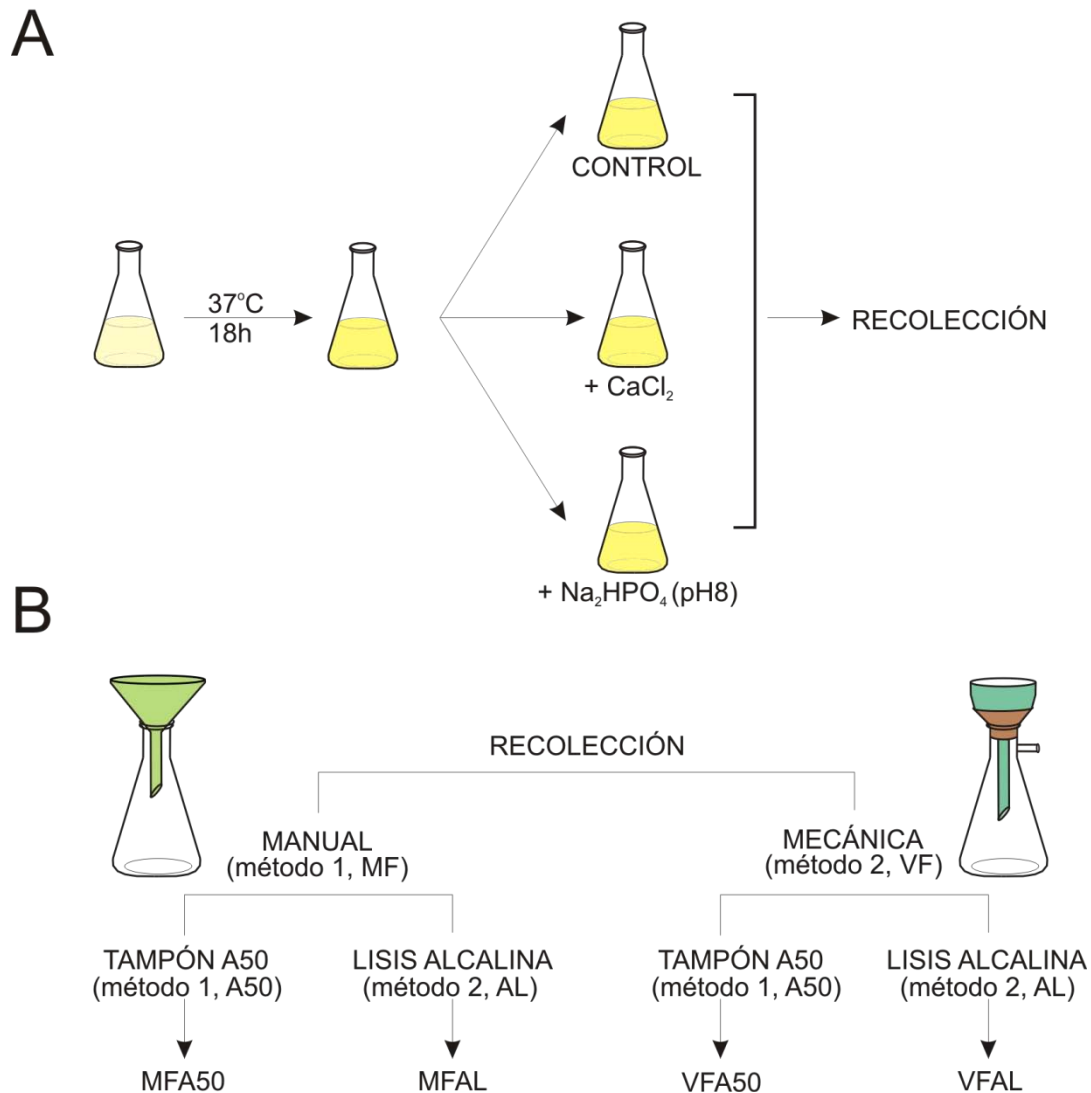
## 2.1. Determinación de la movilidad electroforética de CrzA.

El efecto de elevados niveles de calcio o la alcalinización del medio a nivel molecular sobre CrzA se analizó observando el patrón electroforético de la quimera CrzA(1-730)-GFP, que es expresada por la cepa MAD3021. Para ello se procedió al método estandarizado en el laboratorio para la obtención de extractos proteicos de calidad utilizando micelio cultivado en medio de fermentación. Así se diseñó un experimento en el que el micelio de la cepa MAD3021 crecido durante 18 horas a 37°C fue sometido a tratamiento con calcio o a la alcalinización del medio. Por cada ensayo se prepararon tres cultivos con igualdad de inóculo y tras el primer periodo de incubación a uno se le añadió una solución acuosa de CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 100 mM, al segundo se alcalinizó el pH del medio hasta un valor de 8 (pH8) añadiendo una solución concentrada de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hasta una concentración final de 100 mM y el tercero se mantuvo como control de ausencia de estimulación, denominado a partir de ahora condiciones basales (Figura R3-A).

El estímulo se mantuvo incubando los cultivos a 37°C durante 5 minutos adicionales y la masa de micelio fue recolectada siguiendo el método de recolección 1 y empleando el tampón de extracción A50, siguiendo el método 1 de extracción de proteínas totales (apartado 5.1 de Materiales y métodos, Figura R3-B). De aquí en adelante la combinación de estas dos técnicas será denominada como MFA50 por la abreviatura de los términos en inglés Mira cloth/Filtration + A50 buffer.

A continuación se procedió a detectar a la proteína de fusión CrzA(1-730)-GFP utilizando un anticuerpo comercial contra el epítipo GFP (anticuerpo  $\alpha$ -GFP). El análisis de WB, empleando geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida al 10% (apartado 5.3 de Materiales y métodos), permitió detectar un patrón de bandas común para las tres condiciones analizadas (Figura R4-A). La banda de menor movilidad electroforética detectada fue estimada con un peso molecular de 150 kDa, siendo éste superior a los teóricos 107 kDa de la quimera CrzA(1-730)-GFP (Figura R4-A). También se detectaron varias bandas de mayor movilidad electroforética que corresponderían a formas truncadas de la proteína (Figura R4-A, indicadas con asterisco.)

Dado que dicho patrón de bandas aparecía de forma recurrente en los ensayos realizados y de forma independiente a la presencia de estrés, se procedió a determinar si dichas bandas podrían estar evidenciando la existencia de un procesamiento del FT como un elemento de señalización necesario para su función. Para contestar a esta pregunta se realizaron dos tipos de abordajes experimentales.



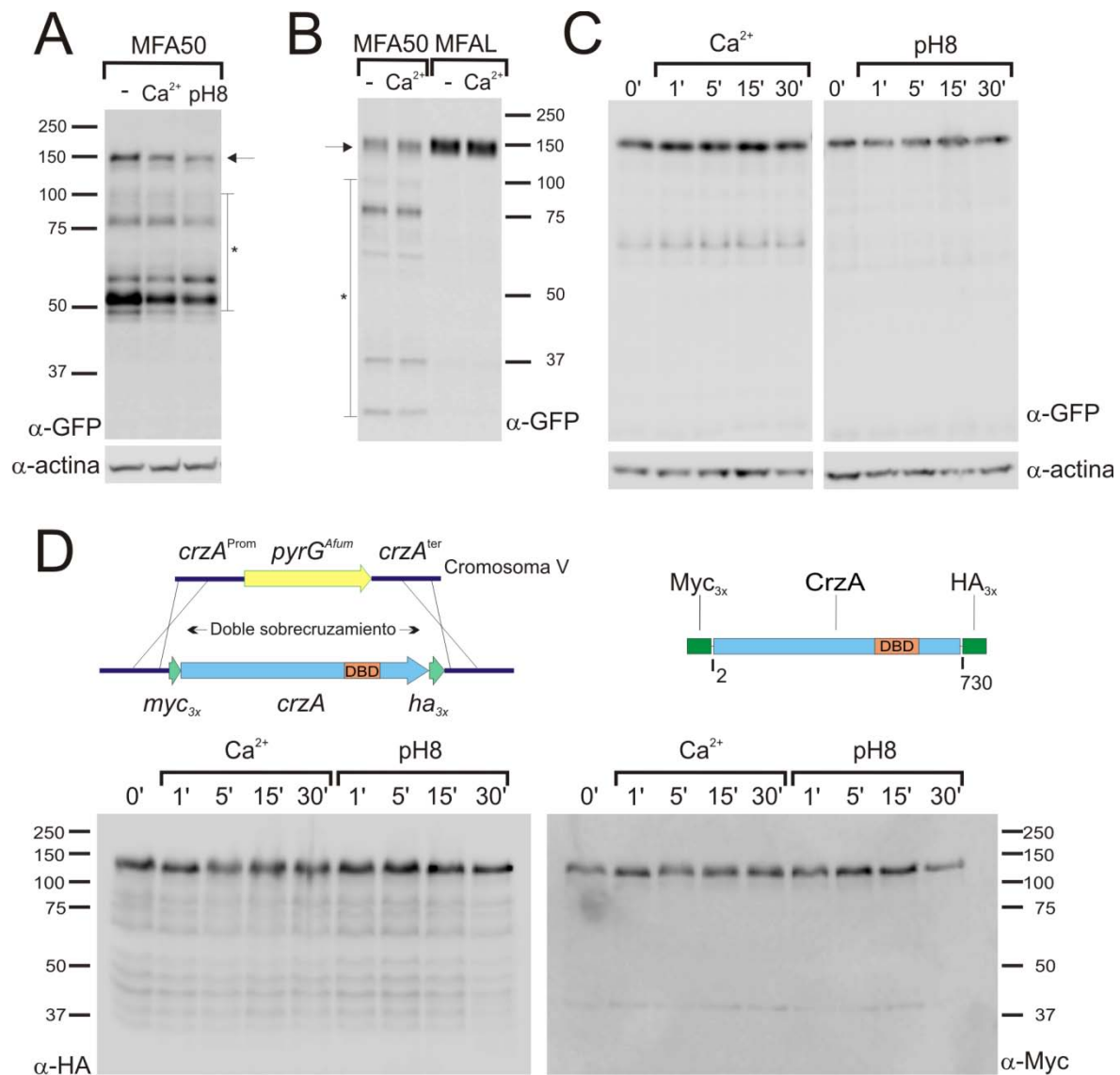
**Figura R3: Resumen de la metodología empleada durante la manipulación del micelio para la extracción de proteínas.** A) Representación del proceso empleado en el tratamiento de los cultivos a estrés. B) Esquema de los diferentes procedimientos empleados durante la recolección del micelio y la obtención de extractos de proteínas totales de *A. nidulans*. La definición de las siglas y su descripción se detalla en el texto.

El primero fue la modificación en el procedimiento de extracción de proteínas empleado anteriormente (Tampón A50). Se siguió el mismo protocolo de inducción de estrés únicamente con el calcio, añadiendo  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 100 mM y tras 5 minutos se recolectó el micelio y se extrajeron las proteínas de éste así como de micelio cultivado en condiciones basales mediante el protocolo de lisis alcalina, es decir el método 2 de extracción de proteínas descrito en el apartado 5.1 de Materiales y métodos. La nomenclatura para la combinación de estos dos métodos será MFAL (Mira cloth/Filtration + Alkaline Lysis) (Figura R3-B). Como se observa en el ensayo de inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ -GFP mostrado en la Figura R4-B, la modificación del protocolo permitió la visualización de una única banda con una movilidad

electroforética similar a la banda descrita anteriormente de 150 kDa, frente a los 107 kDa teóricos. Puesto que estas condiciones de aislamiento de proteínas de micelio permitieron una óptima visualización de la quimera CrzA(1-730)-GFP, se analizó el efecto a corto y medio plazo de los agentes inductores de estrés, calcio y pH alcalino, sobre la movilidad electroforética del FT. Para ello se incubó el micelio de la cepa MAD3021 con ambos estímulos como se indica anteriormente y se procedió a la recolección de la masa de micelio a distintos tiempos. Las distintas muestras fueron procesadas siguiendo el método MFAL y analizadas por WB con anticuerpo  $\alpha$ -GFP. Como se observa en la figura R4-C, el tratamiento con ambos estímulos a diferentes tiempos en el intervalo entre 1 a 30 minutos tras la adición del compuesto al cultivo, no promovió cambios evidentes en el patrón electroforético de la quimera CrzA(1-730)-GFP.

El segundo abordaje fue generar una cepa que expresaba una nueva forma quimérica de CrzA etiquetada en ambos extremos. La cepa MAD3098 expresa la proteína CrzA doblemente etiquetada, con tres copias del epítipo Myc (Myc<sub>3x</sub>) en el extremo N-terminal y tres copias del epítipo HA (HA<sub>3x</sub>) en el extremo C-terminal. Como se detalla en la figura R4-D esta cepa se obtuvo reemplazando el marcador de selección que ocupaba la CDS del locus *crzA* en la cepa  $\Delta$ *crzA* MAD2842. La cepa obtenida (MAD3098) se sometió a estrés por calcio y pH alcalino durante intervalos entre 1 a 30 minutos y posterior extracción de proteínas según el método MFAL. En el análisis mediante WB de estos extractos no se observaron diferencias en el patrón de bandas al revelar con los distintos anticuerpos específicos  $\alpha$ -Myc y  $\alpha$ -HA, detectándose una única banda coincidente en movilidad y que demostró que se estaba visualizando a la quimera completa. No obstante, al igual que en el caso de la quimera CrzA(1-730)-GFP, la movilidad de Myc<sub>3x</sub>-CrzA-HA<sub>3x</sub> observada en ambos casos ( $\approx$  120 kDa) no se correspondía con la movilidad esperada para su peso molecular teórico ( $\approx$  89 kDa) (Figura R4-D).

El conjunto de resultados indicaban que las bandas de mayor movilidad electroforética detectadas en los extractos del micelio de la cepa MAD3021 obtenidos con el tampón A50 eran debidos a una degradación de la quimera CrzA(1-730)-GFP durante el procesamiento de la muestra que pudo ser solventado con el empleo del método de lisis alcalina. Además el análisis de la movilidad electroforética de la quimera Myc<sub>3x</sub>-CrzA-HA<sub>3x</sub> ha permitido descartar que, a diferencia con lo observado con los FT PacC y SltA (ver apartados 1.1 y 1.2 de Introducción), sobre CrzA actúe un proceso proteolítico como mecanismo señalizador de las condiciones ambientales que se estudian en esta tesis doctoral.



**Figura R4: Análisis de la expresión de CrzA y el efecto del estrés por calcio y pH alcalino.** **A)** Detección de CrzA-GFP en extractos proteicos obtenidos por el método MFA50 del micelio de la cepa MAD3021 en condiciones basales de crecimiento (-) o en condiciones de estrés por calcio (Ca<sup>2+</sup>) o pH alcalino (pH8). **B)** Comparación de los métodos de extracción de proteínas MFA50 y MFAL del micelio de la cepa MAD3021 tratado o no con calcio. Mediante ambos procedimientos la banda de mayor peso molecular de CrzA-GFP muestra la misma movilidad electroforética. En **A** y **B** la flecha señala la banda correspondiente a la quimera completa CrzA-GFP y el asterisco las bandas de degradación de CrzA debidas al método de extracción MFA50. **C)** Movilidad electroforética de CrzA-GFP en extractos proteicos MFAL del micelio de la cepa MAD3021 incubado con calcio (Ca<sup>2+</sup>) o a pH8 durante el tiempo indicado en la parte superior. **D)** Análisis de la quimera Myc<sub>3x</sub>-CrzA-HA<sub>3x</sub>. Parte superior: estrategia empleada durante el reemplazamiento génico del alelo mutante (izquierda) que codifica para la proteína etiquetada a ambos extremos de CrzA (derecha). Parte inferior: análisis por WB de los extractos MFAL del micelio de la cepa MAD3098 en condiciones basales o de estrés por calcio (Ca<sup>2+</sup>) y alcalino (pH8) a diferentes tiempos de incubación. La inmunodetección de CrzA se realizó mediante el empleo de los anticuerpos α-HA (izquierda) y α-Myc (derecha). En todos los análisis por WB se emplearon geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10%. En **A**, **B** y **D** se indica el marcador de peso molecular en kDa. En **A** y **C** se utilizaron los niveles de actina (α-actina) como control de movilidad electroforética. En la inmunodetección de CrzA-GFP se empleó el anticuerpo α-GFP (**A**, **B** y **C**).

## 2.2. Alteraciones en el perfil electroforético de CrzA inducidas por calcio y pH alcalino.

Los diferentes ensayos de inmunodetección realizados con las formas CrzA(1-730)-GFP y MyC<sub>3x</sub>-CrzA-HA<sub>3x</sub> no permitieron visualizar cambios electroforéticos obvios. Persiguiendo el modelo de señalización por fosforilación/desfosforilación de Crz1p se procedió a modificar nuevamente el protocolo de aislamiento de proteínas esta vez cambiando el procedimiento de manipulación del micelio. El modo de recolección del micelio al ser filtrado manualmente podría ser un estímulo que desencadenase la activación de distintas rutas de respuesta a estrés. Para minimizar la manipulación del micelio se sustituyó el método de recolección por filtración empleando miracloth por un sistema de filtración mecánica que recolectaba el micelio sobre membranas de nitrocelulosa (ver Materiales y métodos, apartado 5.1 y Figura R3-B).

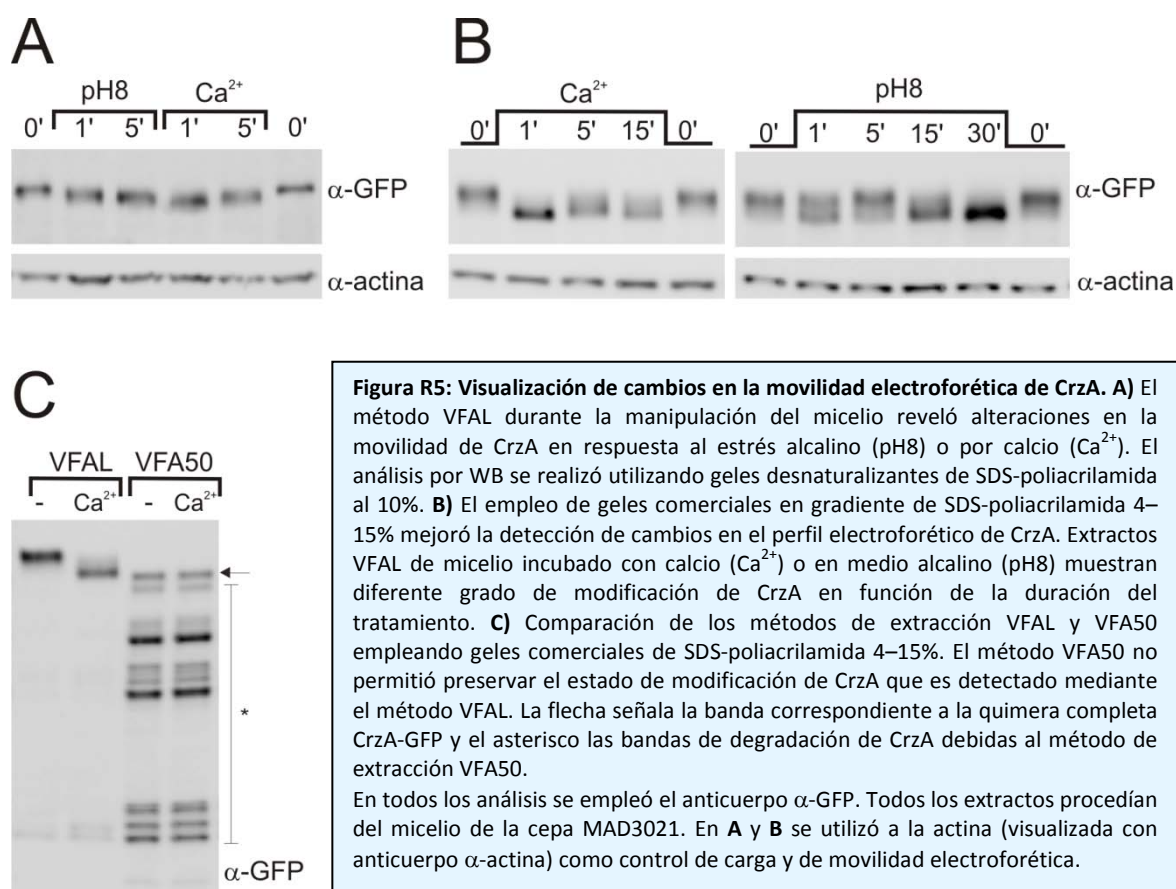
La modificación del método de recolección junto con el empleo del protocolo de lisis alcalina, en conjunto denominados VFAL (Vacuumm/Filtration + Alkaline Lysis), permitió la visualización de cambios de movilidad electroforética de CrzA inducidos por calcio y pH alcalino. En el análisis de WB mostrado en la figura R5-A se observa un aumento de la movilidad electroforética de la quimera CrzA(1-730)-GFP en los extractos proteicos de la cepa MAD3021 tras la incubación del micelio con calcio o la elevación del pH del medio de cultivo.

Para conseguir una mayor resolución de los cambios de movilidad detectados, se sustituyeron los geles desnaturalizantes del 10% SDS-poliacrilamida empleados hasta el momento por geles comerciales en gradiente de SDS-poliacrilamida 4–15% (Materiales y métodos 5.3). El ensayo de inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ -GFP, mostrado en la figura R5-B, indicó una señalización distinta del FT en los extractos del micelio de la cepa MAD3021 en función del tipo y la duración del estrés generado. Mientras que la incubación con calcio promovió un aumento de la movilidad electroforética de forma inmediata que se fue perdiendo progresivamente con el tiempo, con la alcalinización del medio se consiguió observar una banda de mayor movilidad electroforética a tiempos tardíos (Figura R5-B).

Finalmente, se comparó la movilidad electroforética de CrzA en los geles en gradiente de SDS-poliacrilamida 4–15% de extractos proteicos procesados con los métodos VFAL y VFA50 (Vacuumm/Filtration + A50 buffer). En esta ocasión, el micelio de la cepa MAD3021 fue incubado mediante el procedimiento establecido anteriormente durante 1 minuto con calcio y posteriormente recolectado mecánicamente (VF). Las muestras liofilizadas fueron divididas en dos tubos y se siguieron los protocolos de A50 y AL de extracción de proteínas. A pesar de las mejoras introducidas durante la manipulación del micelio no fue posible prevenir la degradación de los extractos obtenidos mediante A50 (Figura R5-C). Además la gran resolución de los geles en

gradiente solo permitió la detección de cambios en la movilidad de la quimera CrzA(1-730)-GFP de los extractos VFAL pero no en los VFA50 (Figura R5-C).

El conjunto de resultados muestran que la manipulación del micelio durante su recolección afecta tanto a la estabilidad de CrzA como a su movilidad electroforética y sugieren una alteración de su señalización. A este respecto se detectan cambios en el patrón electroforético de la quimera CrzA(1-730)-GFP en micelios expuestos a estrés por calcio o la alcalinización del pH del medio, lo que confirma la existencia de mecanismos que modifican postraduccionalmente a CrzA.



**Figura R5: Visualización de cambios en la movilidad electroforética de CrzA.** **A)** El método VFAL durante la manipulación del micelio reveló alteraciones en la movilidad de CrzA en respuesta al estrés alcalino (pH8) o por calcio (Ca<sup>2+</sup>). El análisis por WB se realizó utilizando geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10%. **B)** El empleo de geles comerciales en gradiente de SDS-poliacrilamida 4–15% mejoró la detección de cambios en el perfil electroforético de CrzA. Extractos VFAL de micelio incubado con calcio (Ca<sup>2+</sup>) o en medio alcalino (pH8) muestran diferente grado de modificación de CrzA en función de la duración del tratamiento. **C)** Comparación de los métodos de extracción VFAL y VFA50 empleando geles comerciales de SDS-poliacrilamida 4–15%. El método VFA50 no permitió preservar el estado de modificación de CrzA que es detectado mediante el método VFAL. La flecha señala la banda correspondiente a la quimera completa CrzA-GFP y el asterisco las bandas de degradación de CrzA debidas al método de extracción VFA50.

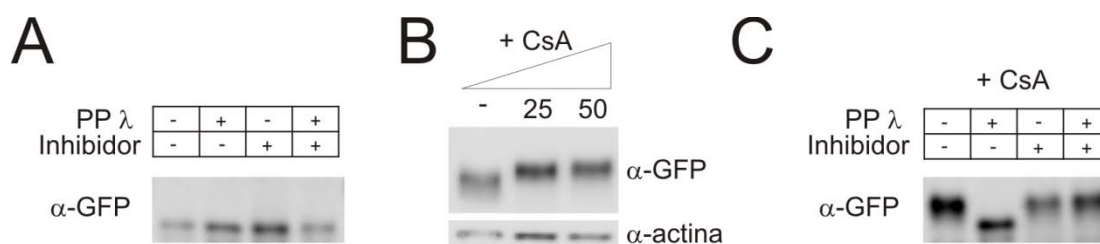
En todos los análisis se empleó el anticuerpo α-GFP. Todos los extractos procedían del micelio de la cepa MAD3021. En **A** y **B** se utilizó a la actina (visualizada con anticuerpo α-actina) como control de carga y de movilidad electroforética.

### 3. CrzA es desfosforilado por la fosfatasa Calcineurina.

Los cambios de movilidad de la quimera CrzA(1-730)-GFP detectados en los extractos del micelio de la cepa MAD3021 han puesto de manifiesto un sistema de modificación del FT en la respuesta a estrés ambiental. Para analizar la naturaleza de esta modificación en CrzA se realizaron diferentes abordajes experimentales tomando como modelo el sistema de señalización de Crz1p en *S. cerevisiae*, donde el principal mecanismo regulador de la actividad del FT es su estado de fosforilación (ver apartado 2 de Introducción).

### 3.1. Detección de formas fosforiladas de CrzA.

Para determinar si los cambios de movilidad observados en CrzA se deben a la presencia de grupos fosfatos, 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, necesariamente obtenidos mediante el protocolo de A50. Metodológicamente, 100 μg de proteína de extractos totales (VFA50) de micelio de la cepa MAD3021 fueron incubados con 400 U de PPλ según se describe en el apartado 5.2 de Materiales y métodos. Simultáneamente se realizaron controles internos del ensayo empleando el vanadato de sodio, inhibidor específico de la PPλ (apartado 5.2 de Materiales y métodos). Seguidamente se procedió a la inmunodetección de la quimera CrzA(1-730)-GFP con el anticuerpo α-GFP. Como se observa en la figura R6-A, el tratamiento con PPλ no produjo modificaciones en el patrón electroforético de CrzA. Este resultado nos permite concluir que la forma de CrzA detectada en los extractos obtenidos con A50 no se encuentra fosforilada.



**Figura R6: El tratamiento con CsA permite la detección de formas fosforiladas de CrzA. A)** CrzA está desfosforilado en extractos VFA50. El ensayo de desfosforilación *in vitro* de extractos VFA50 con PPλ no modifica la movilidad electroforética de CrzA. **B)** La incubación del micelio con CsA disminuye la movilidad electroforética de CrzA en extractos VFAL. En la parte superior se muestra la concentración utilizada de CsA en μM. Los niveles de actina (α-actina) se utilizaron como control de carga y de la movilidad electroforética. **C)** CrzA está fosforilado en extractos VFA50 de micelio incubado con CsA. La combinación de la incubación del micelio con CsA y el tratamiento de la muestra con PPλ reveló una disminución de la movilidad electroforética de CrzA. En todos los análisis se empleó la cepa MAD3021, geles comerciales de SDS-poliacrilamida 4–15% y el anticuerpo α-GFP. En los ensayos de desfosforilación *in vitro* mostrados en **A** y **C** se indica en la parte superior de la imagen el tratamiento de las muestras con la fosfatasa PPλ y/o el inhibidor (orto-vanadato sódico) específico de la reacción de desfosforilación.

Dada la limitación que supone la manipulación de los extractos obtenidos mediante A50, la alternativa para detectar formas fosforiladas de CrzA consistió en interrumpir el proceso de desfosforilación endógeno. La ciclosporina A (CsA) es un inhibidor capaz de bloquear la actividad catalítica de la calcineurina impidiendo la desfosforilación de sus sustratos (ver apartado 4.3 de Introducción). Si en *A. nidulans* CrzA fuese sustrato de la calcineurina se podrían detectar formas fosforiladas del FT en ausencia de la actividad catalítica de dicha fosfatasa. La metodología para

inhibir a la calcineurina fue la misma que la utilizada para generar estrés por calcio o pH alcalino. Así, tras un periodo inicial de crecimiento, el micelio de la cepa MAD3021 fue incubado con concentraciones crecientes de una solución concentrada de CsA durante 30 minutos a 37°C. A continuación se siguió el método VFAL de extracción de proteínas totales y se analizó el efecto de la CsA sobre la movilidad electroforética de CrzA(1-730)-GFP mediante WB. El tratamiento del micelio con el inhibidor permitió observar una disminución de la movilidad de la quimera (Figura R6-B). Cabe señalar que ambas concentraciones de CsA ensayadas (25 y 50  $\mu$ M) dieron lugar a un mismo patrón electroforético y de aquí en adelante los experimentos con este compuesto se realizarán empleando una concentración final de 50  $\mu$ M.

Con el fin de estudiar si la disminución de la movilidad observada se debía a la presencia de grupos fosfatos en CrzA, se combinó la técnica de inhibición con CsA con el ensayo de desfosforilación *in vitro* con PP $\lambda$ . Para ello, se procedió a la extracción de proteínas del micelio de la cepa MAD3021 incubado con CsA mediante el método VFA50, y 100  $\mu$ g de proteína de estos extractos fueron incubados con 400 U de PP $\lambda$ . En esta ocasión la incubación del micelio con CsA permitió detectar por WB una banda de menor movilidad electroforética de la quimera CrzA(1-730)-GFP que recuperaba su movilidad inicial tras el tratamiento con PP $\lambda$  (Figura R6-C).

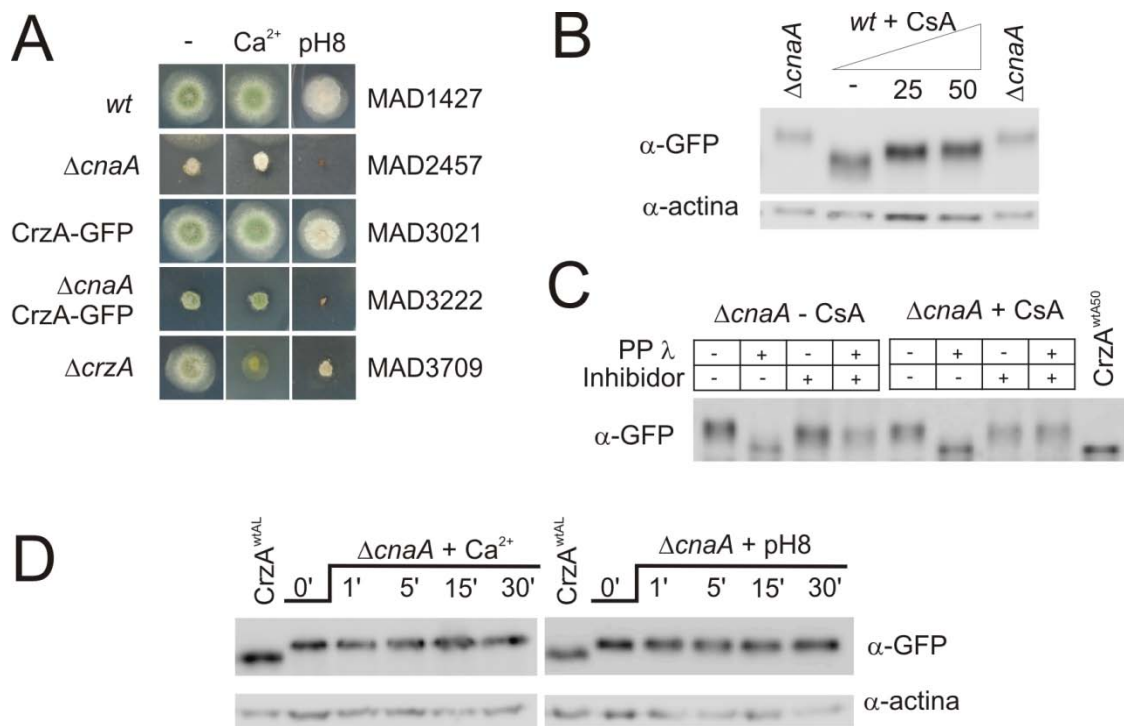
Estos resultados han puesto de manifiesto que CrzA es modificado postraduccionalmente mediante fosforilación. Además, la presencia de CsA, inhibidor de la actividad de la calcineurina, preserva este estado modificado y sugiere que, al igual que Crz1p, CrzA en *A. nidulans* es sustrato de dicha fosfatasa.

### **3.2. La calcineurina es la principal fosfatasa de CrzA.**

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición con CsA y demostrar que la calcineurina es la responsable de la desfosforilación de CrzA, se generó una cepa doble mutante que expresaba la quimera CrzA(1-730)-GFP en ausencia de actividad de la calcineurina. Para obtener esta nueva cepa, MAD3222, se realizó el cruce de la estirpe MAD3020 frente a la estirpe MAD2457 (apartado 3.2 de Materiales y métodos). El gen *cnaA*, que codifica para la subunidad catalítica de la calcineurina, no es esencial en *A. nidulans* pero su delección provoca severos defectos en el crecimiento, la ramificación de las hifas y la arquitectura conidial (Soriani *et al.* 2008). Además de estas características, el test en placa puso de manifiesto la esencialidad del gen para el crecimiento de la cepa MAD2457 en presencia de calcio o en un medio alcalino (Figura R7-A). El descendiente del cruce (CrzA(1-730)-GFP;  $\Delta$ *cnaA*) seleccionado

para este trabajo, MAD3222, mostró el mismo fenotipo de sensibilidad al calcio y al pH alcalino que la cepa mutante MAD2457,  $\Delta cnaA$  (Figura R7-A).

Dado que en el ensayo de inmunodetección de las muestras pretratadas con CsA se detectaron formas de CrzA(1-730)-GFP de menor movilidad electroforética, cabía esperar que en ausencia de CnaA el FT mostrase una disminución de la movilidad electroforética similar. Para probar esta hipótesis, se procedió a la extracción de proteínas del micelio de la cepa MAD3222 en condiciones basales de crecimiento siguiendo el método VFAL. Los extractos así obtenidos se analizaron mediante WB junto con diferentes extractos proteicos de micelio de la cepa MAD3021. Como se observa en la figura R7-B, la movilidad de CrzA(1-730)-GFP en el fondo  $\Delta cnaA$  es menor que la movilidad de esta quimera en un fondo *wt* para la fosfatasa. De hecho, en este caso se



**Figura R7: La calcineurina desfosforila a CrzA.** **A)** Fenotipo de sensibilidad a estrés de las cepas  $\Delta crzA$  y  $\Delta cnaA$ . Conidiosporas de las cepas portadoras de alelos silvestres o mutantes de *crzA* y *cnaA* fueron inoculadas sobre MMA (-) y MMA conteniendo 50 mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH8) e incubadas a 37°C durante 48 horas. **B)** Disminución de la movilidad electroforética de CrzA en un fondo  $\Delta cnaA$  en extractos VFAL. La ausencia de calcineurina permite la detección de una banda de menor movilidad electroforética de CrzA respecto a las bandas detectadas tras la inhibición de la calcineurina con CsA en el fondo genético *cnaA* silvestre. **C)** Detección de formas fosforiladas de CrzA en la cepa  $\Delta cnaA$ . El ensayo de desfosforilación *in vitro* de extractos VFA50 de micelio previamente tratado con CsA reveló una disminución de la movilidad electroforética de CrzA. En la parte superior se indica el tratamiento de las muestras con la fosfatasa PP $\lambda$  y/o el inhibidor específico de la reacción. CrzA<sup>WFA50</sup> es el control de la alta movilidad de CrzA en fondo *cnaA* silvestre. **D)** La inducción de estrés por calcio (Ca<sup>2+</sup>) o pH alcalino (pH8) no altera el perfil electroforético de CrzA en ausencia de calcineurina en extractos VFAL. CrzA<sup>WTAL</sup> es el control de la movilidad de CrzA en fondo *cnaA* silvestre en extractos proteicos aislados por el mismo método. En todos los análisis se emplearon geles comerciales de SDS-poliacrilamida con gradiente 4–15% y el anticuerpo  $\alpha$ -GFP. Los niveles de actina ( $\alpha$ -actina) se utilizaron como control de la movilidad electroforética. Los extractos proteicos procedían de las cepas MAD3021 y MAD3222.

produce un mayor retraso en la movilidad del FT respecto al extracto obtenido tras la incubación del micelio de la cepa MAD3021 con CsA.

Para probar que este retraso en la movilidad electroforética de CrzA se debía de nuevo a un estado fosforilado del FT, se realizó un ensayo *in vitro* de desfosforilación. En esta ocasión se trató de complementar el estudio realizando el experimento sobre muestras obtenidas a partir de cultivos en condiciones basales de crecimiento así como suplementados con CsA. Para ello, tras un periodo inicial de crecimiento y siguiendo el procedimiento habitual, el micelio de la cepa MAD3222 fue incubado con CsA. Tanto este cultivo como el control incubado en condiciones basales fueron procesados según el método VFA50 y seguidamente los extractos proteicos fueron tratados con PPλ. La inmunodetección con el anticuerpo α-GFP reveló un estado fosforilado de CrzA(1-730)-GFP en los extractos de la cepa  $\Delta cnaA$  tanto si se había incubado o no el micelio con CsA (Figura R7-C). El tratamiento con PPλ permitió recuperar la banda de mayor movilidad electroforética detectada en CrzA(1-730)-GFP, es decir, la que muestra el FT en un fondo silvestre para *cnaA* y obtenido mediante VFA50. Dado que la CsA bloquea específicamente la actividad de la calcineurina y estos extractos carecen de esta enzima, la presencia del inhibidor no alteró el resultado obtenido en el WB.

Finalmente se analizó el efecto de elevados niveles de calcio o la alcalinización del medio sobre la señalización de CrzA en ausencia de la fosfatasa. Se siguió el método estandarizado de inducción de estrés con ambos estímulos sobre cultivos de micelio de la cepa MAD3222. Seguidamente las muestras fueron recolectadas y procesadas siguiendo el método VFAL. Al analizar el perfil electroforético de CrzA(1-730)-GFP en la cepa *cnaA* nula, no se encontraron cambios en el patrón de bandas de los extractos proteicos tras la incubación del micelio con calcio o en un medio alcalino (Figura R7-D). Por lo tanto, se demuestra que la calcineurina es la responsable de la desfosforilación de CrzA y que en su ausencia el FT no se puede señalar frente al estrés abiótico.

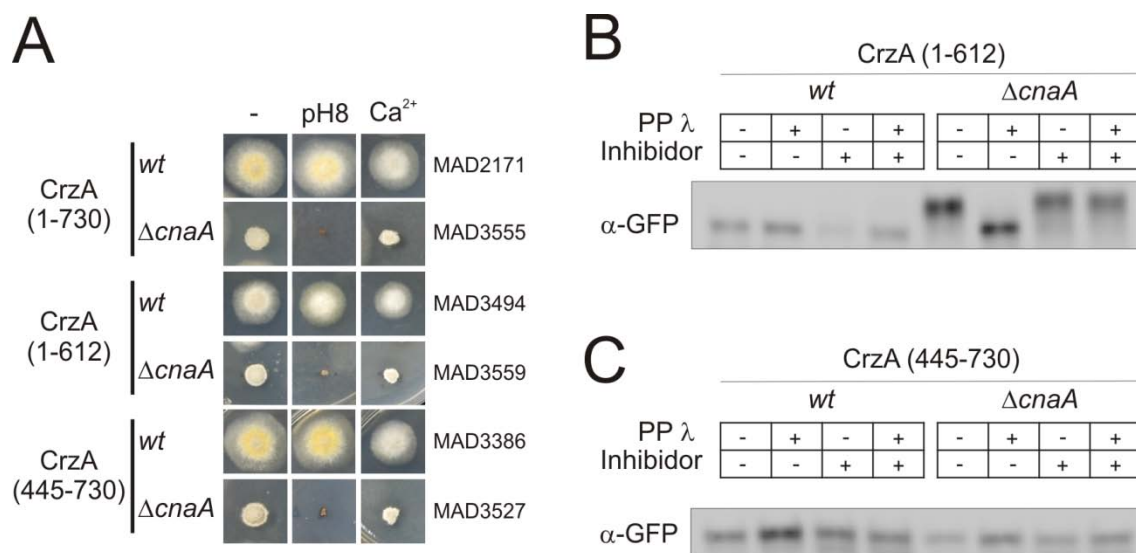
### **3.3. La región amino-terminal de CrzA es desfosforilada por la calcineurina.**

Con el objetivo de delimitar la región de CrzA que es señalizada por la calcineurina, se generaron cepas dobles mutantes que combinaban la expresión de formas truncadas de CrzA y la ausencia de la actividad fosfatasa.

Como se describe en el apartado 1.1 de resultados, las construcciones CrzA(1-730), CrzA(1-612) y CrzA(445-730) expresadas bajo el control del promotor *gpdA<sup>mini</sup>* en el fondo genético  $\Delta crzA$ ,

cepas MAD2171, MAD3494 y MAD3386, respectivamente, mostraban suprimido el fenotipo de sensibilidad al estrés ambiental causado por el alelo nulo *crzA*. Mediante el cruce de estas cepas con la cepa MAD2457 ( $\Delta cnaA$ ) se obtuvieron las cepas triples mutantes ( $\Delta crzA$ ;  $\Delta cnaA$ ; *gpdA<sup>mini</sup>-gfp-crzA(xx-yy)*) MAD3555, MAD3559 y MAD3527 (ver genotipos completos en la tabla M-1). Tanto la cepa que expresaba la forma completa CrzA(1-730), MAD3555, como las que expresaban formas truncadas, MAD3559 y MAD3527, mostraron el mismo fenotipo de sensibilidad al calcio y al pH alcalino que las cepas  $\Delta cnaA$  previamente estudiadas, MAD2457 y MAD3222 (Figuras R7 y R8-A).

Para determinar el estado de fosforilación de las formas truncadas CrzA(1-612) y CrzA(445-730), se analizó el patrón electroforético de ambas regiones expresadas en el fondo genético *cnaA* silvestre y nulo. En primer lugar se incubó el micelio de las cepas portadoras de la construcción CrzA(1-612), MAD3494 y MAD3559, y el micelio de las cepas portadoras de la construcción CrzA(445-730), MAD3386 y MAD3527, en condiciones basales de crecimiento. A continuación se procedió a la extracción de proteínas de estos cultivos siguiendo el método VFA50. Finalmente se realizó un ensayo *in vitro* de desfosforilación y se procedió a la inmunodetección con el anticuerpo  $\alpha$ -GFP. Al igual que en ocasiones anteriores con extractos obtenidos mediante VFA50, el tratamiento con PP $\lambda$  no produjo modificaciones en el patrón



**Figura R8: Estudio de regiones fosforilables en CrzA. A)** Análisis fenotípico de las cepas portadoras de construcciones mutantes de CrzA en un fondo *cnaA* silvestre y nulo. Esporas de cada cepa analizada se inocularon puntualmente sobre MMA (-), MMA suplementado con 50mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o tamponado a pH alcalino con 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH8). Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y se fotografió la colonia formada en cada condición. **B)** Ensayo de desfosforilación *in vitro* de extractos VFA50 de las cepas MAD3494 y MAD3559. **C)** Ensayo de desfosforilación *in vitro* de extractos VFA50 de las cepas MAD3386 y MAD3527. En la parte superior de **B** y **C** se indica el tratamiento de las muestras con la fosfatasa PP $\lambda$  y/o el inhibidor específico de la reacción. En los análisis por WB se emplearon geles comerciales de SDS-poliacrilamida con gradiente 4–15% y el anticuerpo  $\alpha$ -GFP

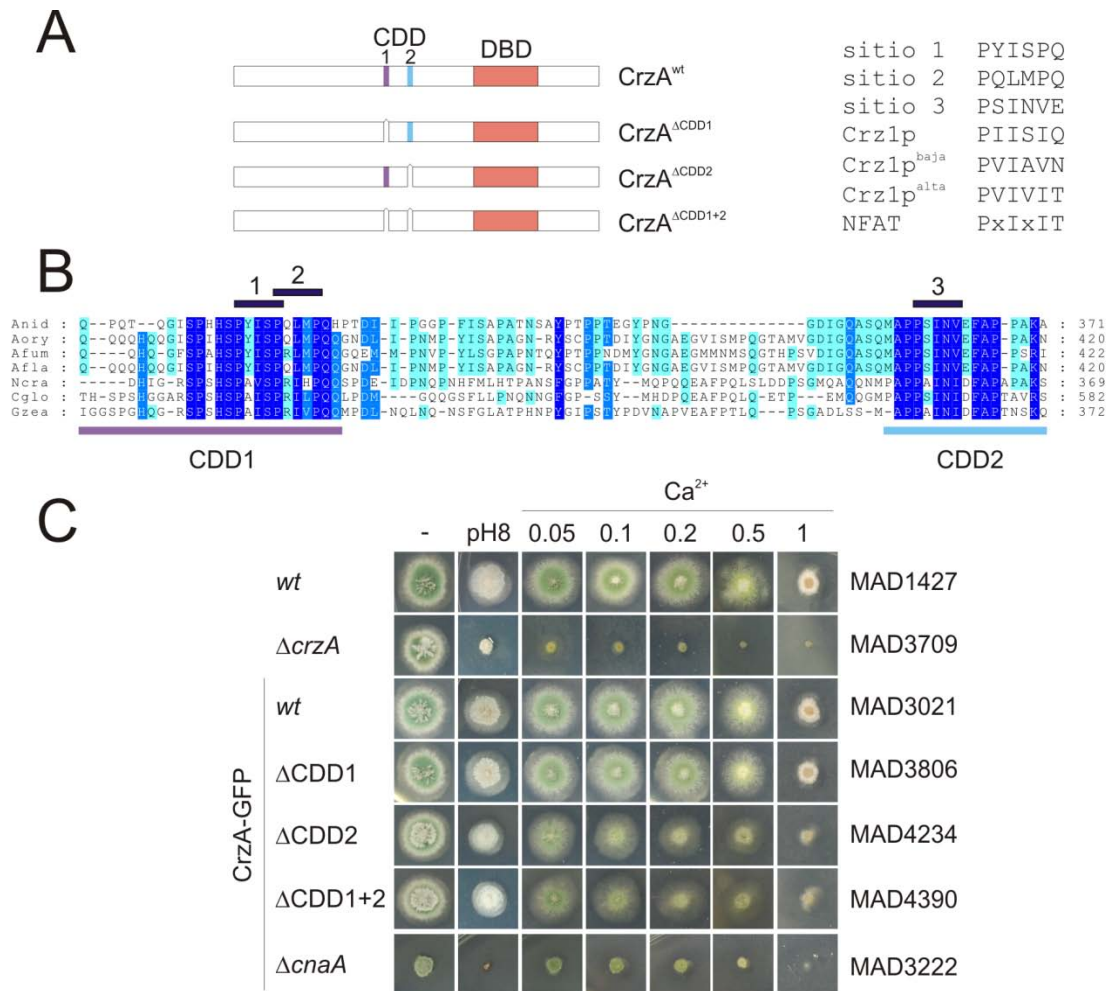
electroforético de CrzA(1-612) en los extractos del micelio de la cepa *cnaA* silvestre (Figura R8-B). Sin embargo, se detectó una reducción en la movilidad de CrzA(1-612) en los extractos del micelio de la cepa *cnaA* nula. La desfosforilación *in vitro* de estos extractos con PPλ permitió recuperar la banda de mayor movilidad electroforética detectada de CrzA(1-612). Por el contrario, la movilidad electroforética de CrzA(445-730) en el fondo  $\Delta cnaA$  fue idéntica a la movilidad de esta forma truncada en un fondo *wt* para la fosfatasa (Figura R8-C). Cabe destacar que en ningún caso el tratamiento con PPλ alteró el patrón electroforético.

Estos resultados ponen de manifiesto el papel pleiotrópico de la calcineurina ya que, a pesar de la sobreexpresión de CrzA en cualquiera de sus formas funcionales, se mantiene el fenotipo de sensibilidad a estrés ambiental. También indican que al menos en la región N-terminal de CrzA se localizan los residuos fosforilados diana de la calcineurina.

### **3.4. Identificación de dominios de unión a la calcineurina en la estructura primaria de CrzA.**

La calcineurina reconoce en sus sustratos un dominio de unión denominado “Calcineurin Docking Domain” o CDD constituido generalmente por las secuencias consenso PxlIT o  $\phi$ LxVP (ver apartado 4. 2 de Introducción y Figura R9-A). En el trabajo previo realizado en el laboratorio se describió la presencia de residuos en la región N-terminal de CrzA que pudieran formar parte de dos secuencias solapantes del tipo PxlIT (Spielvogel *et al.* 2008). Estos residuos, localizados entre la glutamina 294 y la histidina 316, designados conjuntamente como sitio CDD1 se encuentran conservados entre los homólogos de CrzA de distintas especies fúngicas (Figura R9-B). Para analizar el papel de esta región en la señalización por calcineurina de CrzA, se generó un alelo mutante de *crzA* que codificaba para una forma carente del sitio CDD1, CrzA<sup>ΔCDD1</sup>. Empleando oligonucleótidos específicos y mediante mutagénesis dirigida, se obtuvo un plásmido que portaba este alelo fusionado a la CDS del epítipo GFP (apartado 2.4.1 de Materiales y métodos). El casete de DNA que contenía el nuevo alelo de *crzA* se empleó para reemplazar el alelo nulo presente en la cepa MAD3709. MAD3806 es un transformante seleccionado, tras su verificación por “Southern blot”, que expresa la proteína modificada CrzA<sup>ΔCDD1</sup>-GFP. Esta cepa mostró tolerancia al pH alcalino del medio y a la presencia de elevadas concentraciones de calcio extracelular, superando la concentración de 0,5 M de CaCl<sub>2</sub> (Figura R9-C). Este resultado mostraba que la región CDD1 no es crítica para la señalización de CrzA mediada por CnaA.

Dada la falta de función de la región CDD1 se realizó una nueva búsqueda de dominios CDD. El alineamiento múltiple de secuencia con homólogos CrzAs procedentes de hongos filamentosos, permitió la detección de una diana alternativa para la calcineurina (Figura R9-B). De este modo se



**Figura R9: Análisis funcional de sitios CDD en CrzA. A)** Representación esquemática de las construcciones de CrzA carentes de los sitios CDD (izquierda). Los rectángulos violeta y azul claro indican la localización de CDD1 (sitios 1 y 2) y CDD2 (sitio 3) respectivamente. El rectángulo naranja representa el dominio de unión a DNA, DBD. Derecha: Comparación de la secuencia de aminoácidos de los sitios 1, 2 y 3 localizados en CrzA respecto a las secuencia consenso, de baja y de alta afinidad de unión a la calcineurina descritas en *S. cerevisiae* y la secuencia consenso descrita en los NFAT de mamíferos. **B)** Alineamiento múltiple de secuencia de homólogos fúngicos de CrzA de la región donde se localizan los sitios CDD. Los rectángulos azul oscuro indican la posición de los aminoácidos de los sitios 1, 2 y 3 en CrzA. Los rectángulos violeta y azul claro indican los residuos eliminados en la generación de formas de CrzA carentes de CDD1 (sitios 1 y 2) y CDD2 (sitio 3). En el alineamiento múltiple se muestran fragmentos (las coordenadas se indican en la parte derecha del alineamiento) de la estructura primaria de los posibles homólogos de CrzA en *A. nidulans* (Anid) BAE94327, *Aspergillus oryzae* (Aory) BAE57003, *Aspergillus fumigatus* (Afum) EAL88401, *Aspergillus flavus* (Afla) B8NNI1, *Neurospora crassa* (Ncra) EAA32849, *Chaetomium globosum* (Cglo) EAQ88414 y *Gibberella zeae* (Gzea) XP\_381517. **C)** Análisis fenotípico de cepas que expresan formas de CrzA carentes de los sitios CDD. Se determinó la capacidad de formar colonias por las diferentes cepas sobre MMA (-), MMA alcalino (pH8; 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) o en MMA conteniendo las concentraciones molares crecientes de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) indicadas en la parte superior. Las imágenes fueron tomadas de cultivos celulares incubados a 37°C durante 48 horas.

localizó una secuencia que cumplía requisitos para ser el sitio de anclaje de la calcineurina. Por un lado mostraba similitud con la secuencia consenso PxIxIT y por otro lado estaba ubicada en la región N-terminal de CrzA, zona que es desfosforilada por la calcineurina. Este motivo, designado como CDD2, está comprendido entre la metionina 356 y la alanina 372.

La funcionalidad del sitio CDD2 se analizó generando la proteína mutante CrzA<sup>ΔCDD2</sup>-GFP. Utilizando la misma estrategia que para el estudio del sitio CDD1, se obtuvo el casete de DNA para la transformación de la cepa  $\Delta crzA$  MAD3709 (apartado 2.4.1 de Materiales y métodos). Tras el análisis por “Southern blot” de los transformantes, se continuó el estudio con la cepa MAD4234. Esta cepa mostró un fenotipo débil (“leaky”) de sensibilidad a estrés, que se hizo más evidente cuando se incrementó la concentración de calcio extracelular por encima de la concentración estándar de 0,05 M de CaCl<sub>2</sub> (Figura R9-C).

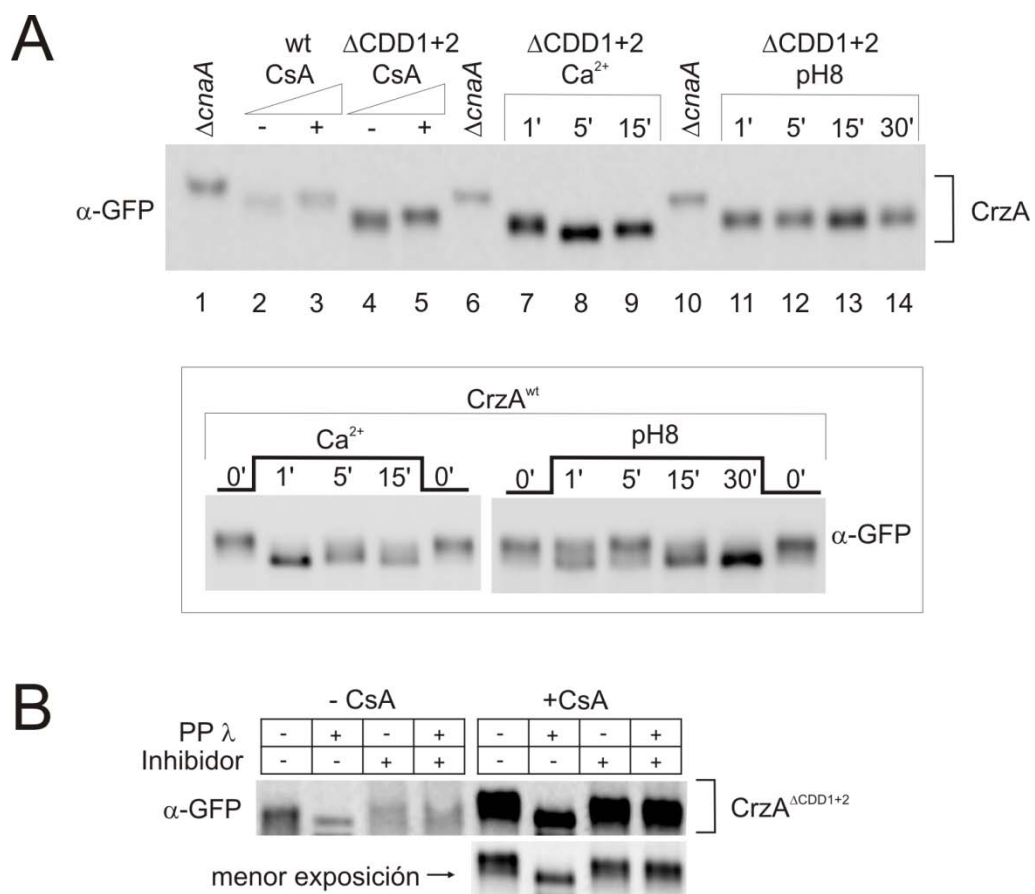
El fenotipo mostrado por la cepa MAD4234 sugirió una participación parcial del sitio CDD2 en la funcionalidad de CrzA. Una de las posibilidades consideradas fue que el sitio CDD1 actuase como una diana alternativa que estuviese enmascarando la señalización de CrzA y permitiese la tolerancia al estrés. Para probar esta hipótesis, se estudió el papel conjunto de los sitios CDD mediante la generación de una proteína doble mutante CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>-GFP. La cepa portadora de dicha construcción, MAD4390, se obtuvo combinando plásmido y oligonucleótidos empleados en la obtención de las deleciones CDD simples (apartado 2.4.1 de Materiales y métodos). Como se observa en la figura R9-C, la cepa con la doble mutación mostró un fenotipo de sensibilidad a estrés similar al mostrado por la cepa MAD4234, carente únicamente del sitio CDD2. Por tanto se puede concluir que el sitio CDD1 no interfiere en la tolerancia a estrés abiótico mientras que el sitio CDD2 desempeña un papel parcial en la funcionalidad de CrzA.

### **3.5 La eliminación de dominios de unión a la calcineurina modifica el patrón electroforético del factor transcripcional.**

Los residuos ubicados en los sitios CDD1 y CDD2 no tienen un papel esencial en la funcionalidad de CrzA. Sin embargo, la disminución de la tolerancia al estrés mostrada por las cepas MAD4234 y MAD4390 hizo sospechar de una participación de estas regiones en la correcta señalización del FT. Con el objetivo de determinar el efecto a nivel molecular de los sitios CDD, se analizó el patrón electroforético de la quimera CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>-GFP expresada por la cepa MAD4390.

Así, el micelio de esta cepa fue sometido tanto a los diferentes tratamientos de estrés con calcio y alcalinización del medio como al tratamiento de inhibición con CsA descritos anteriormente (Figura R3). En cada experimento el estímulo se mantuvo durante los periodos indicados en la figura R10-A como paso previo a la extracción de proteínas por el método VFAL. Seguidamente estos extractos se analizaron mediante WB junto con extractos proteicos procedentes de micelio de la cepa MAD3021 que expresa la quimera de referencia CrzA(1-730)-GFP. Para simplificar la redacción y facilitar así la interpretación de los resultados presentados en este apartado, la

nomenclatura de la quimera CrzA(1-730)-GFP se sustituye a partir de este punto por CrzA<sup>wt</sup>-GFP. La inmunodetección de las quimeras CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>-GFP y CrzA<sup>wt</sup>-GFP se realizó empleando el anticuerpo α-GFP. Como se observa en la figura R10-A, la movilidad de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> es mayor que la movilidad de CrzA<sup>wt</sup> en ausencia de estímulo (carriles 2 y 4), probablemente como consecuencia directa de la diferencia de tamaño de las quimeras. El tratamiento con CsA del micelio de la cepa MAD4390 permitió detectar una disminución en la movilidad electroforética de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> (Figura R10-A, carriles 4 y 5). Este cambio en la movilidad fue similar al observado en la proteína control CrzA<sup>wt</sup> de los extractos del micelio de la cepa de referencia MAD3021 incubado en las mismas condiciones (Figura R10-A, comparar carriles 2-3 con 4-5).



**Figura R10: La proteína CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> muestra alterado su patrón de movilidad electroforética respecto al de la proteína silvestre CrzA<sup>wt</sup>.** **A)** Detección de cambios en el perfil electroforético de CrzA en ausencia de los CDDs. En la parte superior se muestra el análisis por WB de extractos VFAL de la cepa MAD4390 tras la incubación del micelio con CsA, calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o alcalinización del medio (pH8). Se incluyeron extractos VFAL de las cepas MAD3021 (silvestre, wt) y MAD3222 ( $\Delta$ cnaA) como control de la movilidad electroforética. En la parte inferior se muestra el perfil electroforético de la proteína CrzA silvestre en extractos VFAL del micelio incubado con los mismos estreses descrito previamente en la figura R5. **B)** Ensayo de desfosforilación *in vitro* de extractos VFA50 de la cepa MAD4390 de micelio incubado con o sin CsA. El tratamiento con PP $\lambda$  reveló una disminución en la movilidad electroforética de CrzA en ambos extractos. En la parte superior se indica el tratamiento de las muestras con la fosfatasa PP $\lambda$  y/o el inhibidor específico de la reacción. Se emplearon geles comerciales de SDS-poliacrilamida con gradiente 4–15% y el anticuerpo  $\alpha$ -GFP.

En la figura R10-A también se muestra el patrón electroforético de los extractos del micelio de la cepa MAD4390 obtenidos tras la inducción de estrés. En primer lugar se analizó el efecto del calcio. La comparación del carril 4 con los carriles 7-9 de la figura R10-A permitió apreciar diferencias en la movilidad de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>, donde la mayor movilidad electroforética se produjo tras 5 minutos de incubación con el estímulo. A pesar de que el estrés por calcio extracelular promovió cambios en la movilidad de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>, la cinética de la respuesta se alteró con respecto a CrzA<sup>wt</sup>, donde la mayor movilidad electroforética se alcanzaba tras 1 minuto de incubación con calcio (el panel Figura R5-B, que presenta el análisis electroforético de CrzA<sup>wt</sup>, se muestra nuevamente en la Figura R10-A). Por el contrario, la alcalinización del medio de cultivo no alteró el patrón electroforético de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> a corto ni a medio plazo, mostrando así la misma movilidad que en condiciones basales (Figura R10-A, comparar carriles 4 con 11-14).

El siguiente objetivo fue determinar el estado de fosforilación de CrzA en ausencia de los sitios CDD. En primer lugar, se incubó el micelio de la cepa MAD4390 en presencia o ausencia del inhibidor CsA y se siguió el método VFA50 durante la extracción de proteínas. Posteriormente se realizó un ensayo *in vitro* de desfosforilación y se procedió a la inmunodetección con el anticuerpo α-GFP.

Generalmente el método VFA50 impide la detección de formas fosforiladas de CrzA a no ser que se bloquee la actividad de la calcineurina (mediante la generación de alelos  $\Delta cnaA$  o el empleo de CsA). Sorprendentemente, el tratamiento con PPλ permitió detectar un cambio en la movilidad de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> en los extractos VFA50 del micelio incubado en condiciones basales (Figura R10-B). Además, la sobre-exposición del WB facilitó la visualización de un rastro de señal por debajo de la banda principal en los extractos no tratados con PPλ. Tras la desfosforilación *in vitro* de estas muestras, este rastro de bandas desapareció y dio lugar a una banda discreta de mayor movilidad electroforética. El ensayo de desfosforilación *in vitro* de los extractos del micelio incubado con CsA reveló un patrón electroforético de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> bastante parecido. De nuevo se apreció un rastro bajo las bandas de los extractos no tratados con PPλ (Figura R10-B). Tras la incubación con PPλ, se recuperó la banda discreta de mayor movilidad electroforética.

Todos estos resultados sugieren la participación de los sitios CDD en la correcta señalización de CrzA. A pesar de que la ausencia de los sitios CDD no impide que CrzA sea desfosforilada por la calcineurina, esta eliminación preserva el estado fosforilado del FT. Además, se ha demostrado la participación de estos sitios en la respuesta de CrzA frente al estrés ambiental. Sobre la función de estos dominios se profundizará en la sección II de resultados mediante otros abordajes experimentales.

#### **4. Identificación de quinasas involucradas en la fosforilación de CrzA.**

El conjunto de resultados obtenidos en los apartados previos ha permitido concluir que CrzA se modifica postraduccionalmente mediante fosforilación. También se ha demostrado que la principal responsable de la desfosforilación de CrzA es la calcineurina. Para profundizar en el sistema de señalización por fosforilación del FT, el siguiente objetivo fue la búsqueda de las quinasas implicadas en este proceso.

##### **4.1. La quinasa CkiA participa en la señalización de CrzA.**

La primera aproximación en la identificación de potenciales quinasas de CrzA se realizó analizando la ruta de señalización de su homólogo Crz1p en *S. cerevisiae*. Como se detalla en la introducción, en la fosforilación de Crz1p participan varias quinasas. Entre todas ellas, la principal responsable de este proceso es la quinasa Hrr25p, homóloga de la Casein kinase I (CK1) de mamíferos (ver apartado 2 de Introducción).

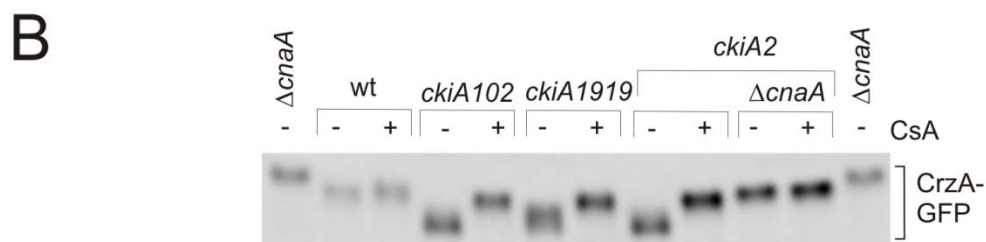
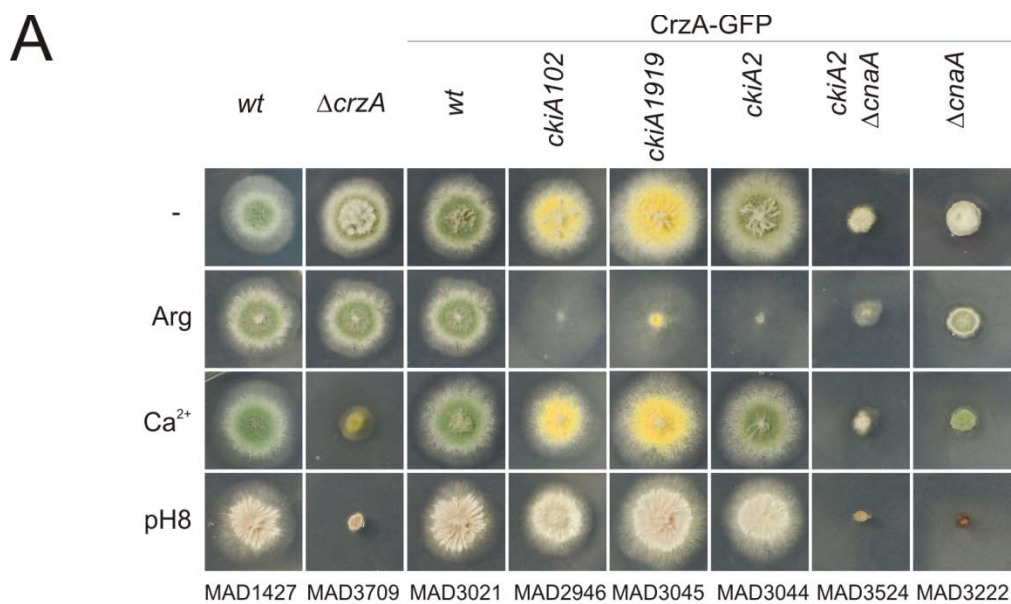
Recientemente se ha caracterizado en *A. nidulans* la proteína homóloga de Hrr25p, CkiA, mostrando su papel en el metabolismo de amino ácidos (Apostolaki *et al.* 2012). Dada la esencialidad de CkiA en la célula, durante su caracterización se emplearon cepas portadoras de mutaciones de pérdida de función parcial recesivas en *ckiA*. Las cepas MAD2918, MAD2921 y MAD2922 portaban diferentes sustituciones en la CDS de *ckiA* que daban lugar a los alelos mutantes *ckiA102*, *ckiA1919* y *ckiA2* respectivamente. Las mutaciones *ckiA1919* y *ckiA2* se localizan en la región codificante del dominio catalítico mientras que la mutación *ckiA102* reside en una región conservada entre los homólogos CKI del subfilo Pezizomycotina. Estas mutaciones de pérdida parcial de función de la proteína, se ordenan de menor a mayor función:  $ckiA102 \leq ckiA2 < ckiA1919 < ckiA^+$ .

Para estudiar la posible relación entre CkiA y CrzA, se analizó el efecto de las mutaciones de pérdida parcial de función de la quinasa sobre la modificación postraduccional del FT. Las cepas portadoras de las mutaciones en *ckiA* MAD2918 (*ckiA102*), MAD2922 (*ckiA2*) y MAD2921 (*ckiA1919*), fueron cedidas por el Dr. C. Scazzocchio. El cruce de estas cepas con la cepa MAD3020, (CrzA(1-730)-GFP), permitió la obtención de las cepas dobles mutantes MAD2946, MAD3044 y MAD3045 que expresaban la quimera de CrzA en fondos genéticos *ckiA102*, *ckiA2* y *ckiA1919* respectivamente.

En primer lugar se comprobó que las cepas *ckiA* mutantes de la nueva progenie manifestaban el mismo fenotipo que las cepas parentales. Como se observa en la figura R11-A, la

presencia de arginina como fuente principal de nitrógeno no permitió el crecimiento de las cepas MAD2946, MAD3044 y MAD3045. También se analizó si las mutaciones alélicas en *ckiA* alteraban la tolerancia a estrés abiótico que las pudiese relacionar con la actividad de CrzA. La presencia de elevadas concentraciones de calcio o la alcalinización del medio no causaron alteraciones en el crecimiento colonial sobre medio sólido de las cepas *ckiA* mutantes (Figura R11-A).

Con el fin de obtener un sistema deficiente en los procesos de fosforilación/desfosforilación de CrzA, se generó una cepa triple mutante que expresaba la quimera CrzA(1-730)-GFP en un fondo nulo  $\Delta cnaA$  y que a su vez portaba la mutación *ckiA2*. Esta cepa, MAD3524, se obtuvo



**Figura R11: La pérdida parcial de función de *ckiA* altera el estado de modificación de CrzA. A)** Test de crecimiento en placa de cepas *ckiA* mutantes. Las esporas fueron inoculadas puntualmente sobre MMA (-) o sobre MMA suplementado con los compuestos indicados en la parte izquierda del panel e incubadas a 37°C durante 48 horas. Las cepas portadoras de las diferentes mutaciones alélicas en *ckiA* mostraron la pérdida de la capacidad de la utilización de arginina como única fuente de nitrógeno (Arg; 5 mM). La adición de 50 mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o pH alcalino (pH8; 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) en MMA suplementado con 5mM tartrato amónico como principal fuente de nitrógeno mostró el fenotipo de resistencia al estrés de las cepas *ckiA* mutantes. La cepa mutante *ckiA2*,  $\Delta cnaA$ , CrzA-GFP mostró el fenotipo aditivo esperable debido a la combinación de las mutaciones *ckiA2* y  $\Delta cnaA$ . **B)** Análisis por WB de extractos VFAL del micelio de las cepas portadoras de los alelos de pérdida parcial de función en CkiA incubado o no con CsA. Se detectan cambios en la movilidad electroforética de CrzA en fondos genéticos *ckiA* mutantes. Se emplearon geles comerciales de SDS-poliacrilamida con gradiente 4–15% y el anticuerpo  $\alpha$ -GFP. Los extractos proteicos utilizados correspondían a las cepas *ckiA* mutantes MAD2946, MAD3045, MAD3044, MAD3524 y las cepas control MAD3021 (silvestre, wt) y MAD3222 ( $\Delta cnaA$ ).

mediante el cruce de las cepas MAD2457 y MAD3044. La cepa MAD3524 (CrzA(1-730)-GFP;  $\Delta cnaA$ ; *ckiA2*) mostró un fenotipo de sensibilidad por la combinación de los alelos mutantes  $\Delta cnaA$  y *ckiA2* pero no se observó un efecto aditivo (Figura R11-A).

El efecto a nivel molecular de las distintas formas mutantes CkiA sobre CrzA se analizó observando el patrón electroforético de la quimera CrzA(1-730)-GFP expresada por las diferentes cepas *ckiA* mutantes. Así, el micelio de las cepas MAD2946, MAD3044, MAD3045 y MAD3524 fue incubado con CsA y tras su recolección se extrajeron las proteínas tanto de éste como de micelio cultivado en condiciones basales mediante el método VFAL. En ausencia de CsA, la inmunodetección con el anticuerpo  $\alpha$ -GFP reveló un aumento de la movilidad electroforética de CrzA en los extractos de las cepas *ckiA* mutantes (Figura R11-B). El tratamiento del micelio con CsA causó en todos los casos una disminución en la movilidad electroforética de la quimera CrzA(1-730)-GFP, aunque no se recuperó la movilidad mostrada por el FT expresado en una cepa silvestre en ausencia de inhibidor (Figura R11-B). Además, el WB permitió detectar un diferente patrón electroforético del FT expresado por la cepa triple mutante MAD3524 (CrzA(1-730)-GFP,  $\Delta cnaA$  *ckiA2*) respecto al detectado en las cepas dobles mutantes MAD3044 (CrzA(1-730)-GFP; *ckiA2*) y MAD3222 (CrzA(1-730)-GFP;  $\Delta cnaA$ ) (Figura R11-B).

Por lo tanto, cualquiera de las mutaciones de pérdida parcial de función de la quinasa altera el estado de fosforilación del FT. No obstante, la anulación de actividad de la calcineurina mediante el empleo de CsA o mediante la generación de una cepa  $\Delta cnaA$  promovió un cambio en la movilidad electroforética de la quimera CrzA(1-730)-GFP de las cepas *ckiA* mutantes. El conjunto de resultados ponen de manifiesto el papel de CkiA en la modificación postraduccional de CrzA aunque evidencian la participación de quinasas adicionales en su señalización.

#### 4.2. Papel de la quinasa GskA en la ruta de señalización de CrzA.

Con el fin de identificar posibles quinasas de CrzA, se realizó una búsqueda *in silico* de dianas de las principales quinasas eucarióticas en la estructura primaria del FT. El programa informático NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>; (Blom *et al.* 2004)) indicó la presencia de dianas potenciales para quince de estas quinasas en la secuencia de CrzA (Figura R12-A). De entre todas ellas la que presentaba mayor número de potenciales dianas, con un total de dieciocho, fue la Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , Gsk3 $\beta$  (Figura R12-B). Cuando se analizó la distribución de estos sitios en la secuencia de CrzA se observó que todos ellos se localizaban entre los residuos 163 y 451 (Figura R12-A y R12-C). Dado que el análisis electroforético de las formas truncadas del FT realizado en el apartado 3.3 indicaba la presencia de grupos fosfato modificando

**Resultados- Sección I**  
**Señalización Molecular de CrzA**

la secuencia aminoacídica en la región N-terminal de CrzA, parecía razonable continuar con el estudio de la quinasa Gsk3 $\beta$ .

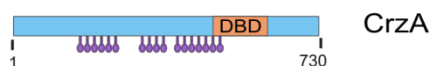
**A**

Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R	Q	R
GSK3	S-163	cdc2	S-47	cdk5	T-75	PKC	S-25	p38MAPK	T-75	PKA	S-88	RSK	S-203
GSK3	S-167	cdc2	S-49	cdk5	S-163	PKC	S-44	p38MAPK	S-163	PKA	S-203	RSK	S-401
GSK3	S-180	cdc2	S-72	cdk5	S-173	PKC	S-50	p38MAPK	T-195	PKA	S-237	RSK	S-413
GSK3	S-184	cdc2	S-114	cdk5	S-184	PKC	S-54	p38MAPK	S-248	PKA	S-399	RSK	S-415
GSK3	T-195	cdc2	S-127	cdk5	S-189	PKC	T-192	p38MAPK	S-265	PKA	S-460	RSK	S-433
GSK3	S-248	cdc2	S-181	cdk5	T-195	PKC	T-297	p38MAPK	S-301	PKA	T-506	RSK	S-460
GSK3	S-301	cdc2	S-240	cdk5	S-248	PKC	T-332	p38MAPK	S-305	PKA	T-603	RSK	S-481
GSK3	S-305	cdc2	S-256	cdk5	S-301	PKC	T-394	p38MAPK	S-387	PKG	S-21	CKI	S-173
GSK3	S-309	cdc2	S-275	cdk5	S-305	PKC	S-395	p38MAPK	S-416	PKG	S-399	CKI	S-559
GSK3	T-338	cdc2	S-399	cdk5	S-309	PKC	T-461	p38MAPK	S-433	PKG	S-460	CKI	S-597
GSK3	S-387	cdc2	S-409	cdk5	T-338	PKC	S-463	DNAPK	S-50	PKG	T-603	CKI	S-689
GSK3	S-391	cdc2	S-418	cdk5	S-413	PKC	S-486	DNAPK	S-122	INSR	Y-277	CKII	S-100
GSK3	S-395	cdc2	S-420	cdk5	S-416	PKC	T-506	DNAPK	S-170	INSR	Y-307	CKII	S-286
GSK3	S-413	cdc2	S-446	cdk5	S-428	PKC	S-513	DNAPK	S-275	INSR	Y-469	CKII	T-288
GSK3	S-416	cdc2	S-462	cdk5	S-433	PKC	T-649	DNAPK	T-297	INSR	Y-705	CKII	S-597
GSK3	S-443	cdc2	S-633	cdk5	S-451	ATM	S-159	DNAPK	S-354	EGFR	Y-307	CKII	T-659
GSK3	S-447	cdc2	S-663	PKB	S-401	ATM	S-170	DNAPK	S-597	EGFR	Y-336	CKII	S-663
GSK3	S-451			PKB	S-415	ATM	S-354			EGFR	Y-723	CKII	S-675

**B**

Q	R
GSK3	18
cdc2	17
cdk5	16
PKC	15
p38MAPK	10
DNAPK	7
RSK	7
PKA	7
CKII	7
CKI	4
PKG	4
INSR	4
ATM	3
PKB	2
EGFR	3

**C**



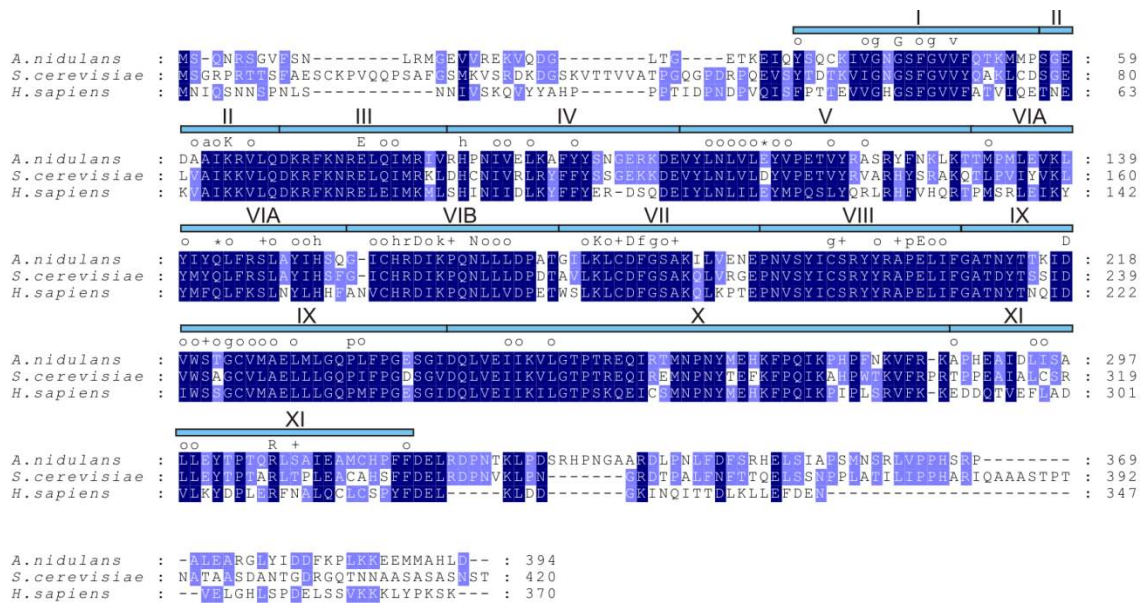
**Figura R12: Predicción de residuos fosforilables en la estructura primaria de CrzA.**  
**A)** Resultado de la búsqueda *in silico* de aminoácidos en CrzA potencialmente fosforilables por las principales quinasas eucarióticas. Q: quinasa. R: residuo (Serina, S, Treonina, T, o, Tirosina, Y) y su posición en la secuencia aminoacídica de CrzA. Las columnas Q y R en violeta indican la quinasa con mayor número de residuos modificables y su localización en CrzA. La predicción se realizó mediante el programa informático NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK>; Blom et al, 2004).  
**B)** Resumen de las 15 potenciales quinasas y el recuento de sus posibles dianas en CrzA. La fila en violeta destaca la presencia de 18 residuos en CrzA potencialmente fosforilables por la actividad GSK3 $\beta$ .  
**C)** Diagrama que representa la estructura primaria de CrzA, donde se indica la localización del DBD por un rectángulo naranja y la distribución de los residuos potencialmente fosforilables por una quinasa del tipo GSK3 $\beta$  mediante un símbolo violeta.

4.2.1. Identificación y caracterización de la quinasa GskA en *A. nidulans*.

En primer lugar se procedió a la identificación del homólogo de Gsk3 $\beta$  en el genoma de *A. nidulans*. Utilizando la secuencia de aminoácidos de Gsk3p/Rim11p/Mds1p de *S. cerevisiae* se realizó una búsqueda de similitud de secuencia mediante el empleo del algoritmo Blastp en la base de datos del genoma de *A. nidulans* (<http://www.aspergillusgenome.org/>).

La proteína con mayor nivel de similitud identificada en el proteoma de *A.nidulans*, con una puntuación, "score", de 394 y un "E-value" de  $3,0 \cdot 10^{-110}$ , se encontraba codificada por el locus AN6508. Empleando la secuencia deducida de la traducción de este gen se realizó una predicción de dominios funcionales a través del buscador Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) señalando así a un putativo dominio quinasa perteneciente a la superfamilia de las proteínas quinasa C con un "E-value" de  $4,2 \cdot 10^{-64}$ .

Un alineamiento múltiple de la secuencia del producto codificado por el locus AN6508 junto con las de las proteínas de *S. cerevisiae*, Gsk3p/Rim11p/Mds1p, y de *Homo sapiens*, Gsk3 $\beta$  (Figura R13), puso de manifiesto el alto grado de conservación entre ellas. El dominio quinasa comprende prácticamente la totalidad de la secuencia, que abarcaba desde el residuo 35 al 318 de los 369 aminoácidos que forman la proteína codificada por el locus AN6508, y en los que es fácil identificar los subdominios catalíticos que conforman el dominio quinasa. Dado que el producto codificado por el locus AN6505 mostró elevada similitud con las quinasa Gsk3p/Rim11p/Mds1p de la levadura y Gsk3 $\beta$  de humanos, este locus fue designado como *gskA* y el producto de su expresión, GskA.



**Figura R13: Dominios conservados en la estructura primaria de la familia de quinasa de GSK3 $\beta$ .** Alineamiento múltiple de secuencia de homólogos de GSK3 $\beta$  en eucariotas: *A. nidulans* Q5AYX2, *S. cerevisiae* P38615 y humana (*H. sapiens*) P49841. Los rectángulos azules representan los 12 subdominios catalíticos, indicados en números romanos, presentes en todos los miembros de la superfamilia de quinasa. En la parte superior del alineamiento se indica la conservación de los residuos con la siguiente nomenclatura: letras mayúsculas, residuos invariables; letras minúsculas, residuos con poca variación; o, residuos no polares; \*, residuos polares; +, residuos de polaridad neutra.

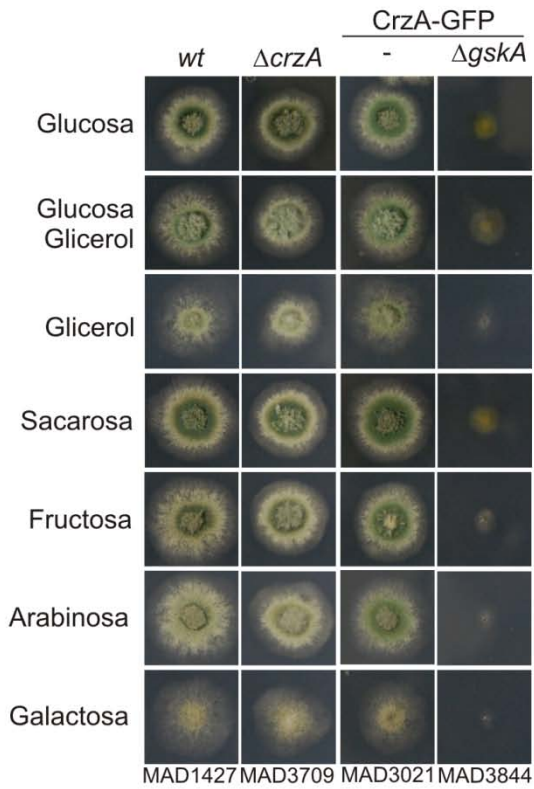
Como ya se mencionó en el apartado previo, el interés de caracterizar a GskA en este trabajo radicaba en su posible relación con CrzA, por lo que se decidió deletar la región codificante de *gskA* en una cepa que expresara la quimera CrzA(1-730)-GFP. En primer lugar se generó un casete que permitía el reemplazamiento génico de la CDS del locus *gskA* utilizando la técnica de PCR de fusión (apartado 4.1 de Materiales y métodos) y se transformó con este casete la cepa MAD3020. La mayoría de los transformantes que crecieron sobre el medio de regeneración selectivo mostraron importantes defectos en el crecimiento colonial y reducida su capacidad de esporulación. Tras la selección de los transformantes homocariontes y el análisis por "Southern blot", se continuó el estudio con la cepa MAD3844 ( $\Delta gskA$ ; CrzA(1-730)-GFP).

Con el fin de encontrar unas condiciones óptimas para el crecimiento micelial de la cepa  $\Delta gskA$ , se realizó un análisis fenotípico en medio sólido modificando las principales fuentes de carbono (C) o de nitrógeno (N). Metodológicamente, para ensayar la fuente de C se suplementó medio mínimo (MMA) con la fuente de N estándar (5 mM de tartrato de amonio) y con los requerimientos nutricionales pertinentes, a excepción de fuente de C. Este medio enriquecido se dividió en tantos volúmenes como sustratos a analizar y se complementó con las distintas fuentes de C a la concentración indicada en la figura R14-A. Para ensayar la fuente de N se empleó este mismo procedimiento pero complementando el medio enriquecido con D-glucosa al 1% (p/v) como fuente principal de C (Figura R14-B). Sobre estas placas se inocularon esporas de la cepa  $\Delta gskA$  CrzA(1-730)-GFP (MAD3844) así como de la cepa control etiquetada (CrzA(1-730)-GFP, MAD3021), de una *crzA* nula (MAD3709) y de una cepa silvestre (MAD1427), que se emplearon como control del crecimiento colonial del hongo.

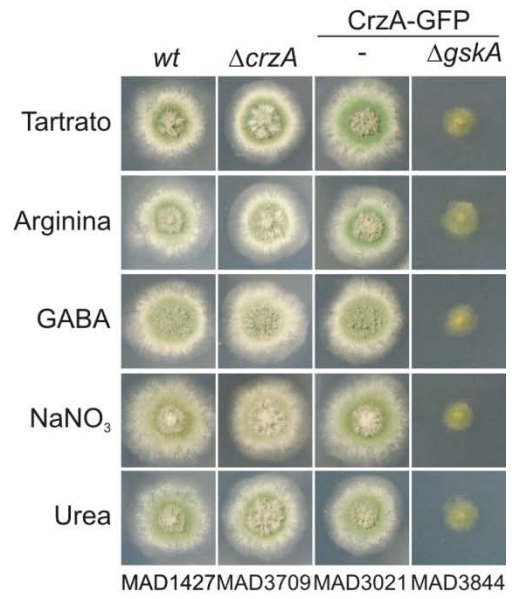
Ninguna de las fuentes de carbono analizadas produjo una mejora del crecimiento de la cepa  $\Delta gskA$  (Figura R14-A). De hecho sólo fue capaz de crecer en presencia de glucosa o sacarosa mientras que el glicerol, la fructosa, la arabinosa o la galactosa no permitieron el crecimiento de

**Figura R14: Fenotipo de las cepas portadoras del alelo  $\Delta gskA$ .** **A)** Análisis del crecimiento colonial de cepas nulas *gskA* en medio conteniendo diferentes fuentes principales de carbono y con 5 mM de tartrato amónico como fuente principal de nitrógeno. Las fuentes de carbono analizadas se indican en el lateral izquierdo de cada panel. En todos los casos la concentración final fue del 1% (p/v). **B)** Análisis del crecimiento colonial de cepas  $\Delta gskA$  en medio conteniendo diferentes fuentes principales de nitrógeno. Los medios contenían glucosa al 1% (p/v) como fuente principal de carbono, los requerimientos necesarios para complementar las auxotrofías y las fuentes de nitrógeno indicadas en el lateral izquierdo a la concentración final 5mM (p/v). En **A** y **B** se inocularon puntualmente esporas de las cepas *crzA* silvestre, nula y etiquetada y de  $\Delta gskA$  CrzA-GFP y se incubaron a 37°C durante 48 horas. **C)** En el análisis microscópico las esporas de la cepa nula *gskA* mostraron defectos en la germinación y mantenimiento del crecimiento apical. A la izquierda del panel se muestra una célula portadora del alelo *gskA* silvestre y la construcción CrzA-GFP, cepa MAD3021, tras 16 horas de incubación a 25°C. A la derecha se muestran diferentes imágenes de células de la cepa  $\Delta gskA$  CrzA-GFP, MAD3844, tomadas tras las mismas condiciones de incubación (16 horas a 25°C). **D)** Esporas de la cepa  $\Delta gskA$  CrzA-GFP, MAD3844, mejoran su desarrollo tras la incubación a 37°C durante 20 horas. Barra de escala: 5µm.

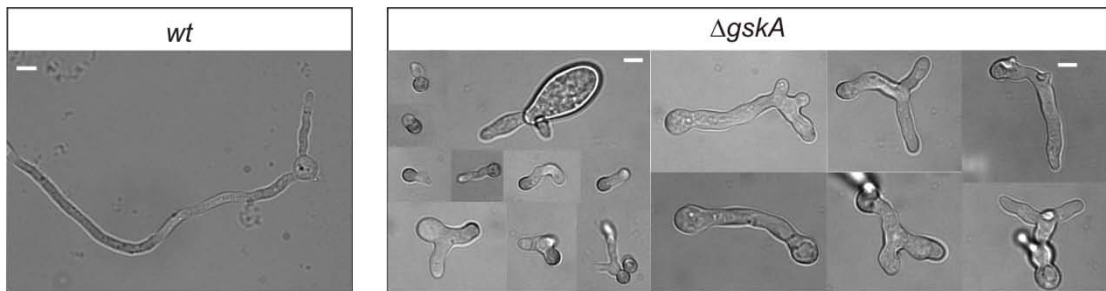
A



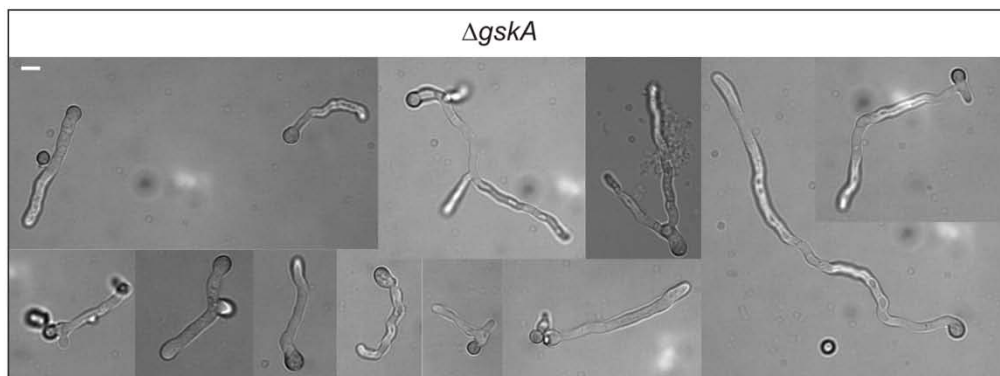
B



C



D



la cepa. La combinación de glucosa y glicerol, aunque muy levemente, mejoró el desarrollo de la cepa MAD3844 (Figura R14-A). La capacidad de la cepa *gskA* nula para utilizar distintas fuentes de nitrógeno fue mayor, creciendo sobre cualquiera de los sustratos añadidos de igual modo (Figura R13-B).

Además de los problemas de crecimiento y conidiación observados a nivel macroscópico, el análisis microscópico reveló anomalías morfológicas de las hifas así como problemas en la germinación de las esporas. En primer lugar, se inocularon esporas de la cepa MAD3844 en medio mínimo para microscopio (WMM) y se incubaron a 25°C durante 16 horas. Paralelamente, esporas de la cepa MAD3021 (*CrzA(1-730)-GFP*) fueron cultivadas bajo las mismas condiciones. Mientras que estas condiciones de cultivo permitieron el desarrollo filamentoso de las esporas de la cepa MAD3021 (Figura R14-C), las esporas de la cepa  $\Delta$ *gskA* mostraron problemas durante la germinación. Como se observa en la figura R14-C, en el cultivo de la cepa MAD3844 se encontraron conidiosporas aberrantes con un excesivo aumento del volumen celular. Las esporas que lograron iniciar la germinación lo hicieron de forma dicótoma o tricótoma (Figura R14-C).

Con el fin de mejorar el crecimiento de la cepa MAD3844, se modificaron las condiciones estándar empleadas previamente mediante la elevación de la temperatura de incubación de 25°C a 37°C y el incremento del tiempo de cultivo de 16 a 20 horas. Las esporas así incubadas mostraron una mejoría en el establecimiento del crecimiento polarizado a pesar de que aún se encontraron células con morfología anormal (Figura R14-D).

Estos resultados ponen de manifiesto que *gskA*, al contrario que *ckiA*, no es un gen esencial aunque debe desempeñar un papel importante en el desarrollo celular y colonial de *A. nidulans*.

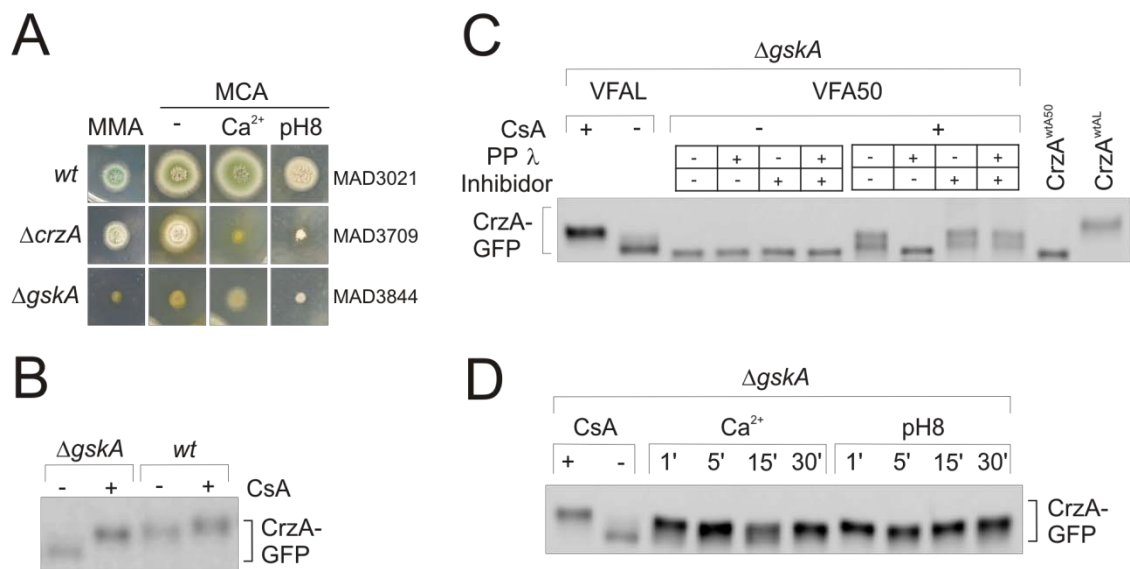
#### 4.2.2. GskA modifica el estado de fosforilación de CrzA.

El modelo de señalización de Crz1p en *S. cerevisiae* establece que la forma desfosforilada de este FT es la transcripcionalmente activa (ver apartado 2 de Introducción). En el modelo de NFATs GSK3 $\beta$  juega un papel importante en su señalización de una forma similar a la anterior (ver apartado 3 de Introducción). En el caso de CrzA, cabría pensar que en ausencia de la actividad GskA predominasen formas activas de CrzA que se traducirían tanto en la tolerancia al estrés ambiental como en la modificación postraduccional (migración electroforética) de este FT.

Para medir la tolerancia al estrés de la cepa  $\Delta$ *gskA* (MAD3844) se analizó su crecimiento colonial en presencia de elevadas concentraciones de calcio o la alcalinización del medio. Dado los severos problemas de crecimiento que presentó de por sí esta estirpe, se empleó medio completo

de *Aspergillus*, MCA (apartado 1.4 de Materiales y métodos). La utilización de este medio permitió una ligera mejoría del crecimiento radial y la capacidad de conidiación de la cepa  $\Delta gskA$  (Figura R14-A). Mientras que la presencia de elevados niveles de calcio en el medio tuvo un efecto positivo en el desarrollo del hongo, la alcalinización del medio redujo notablemente el crecimiento de la cepa  $\Delta gskA$  a niveles similares a los de la cepa  $\Delta crzA$  (Figura R15-A). Estos resultados sugerían una diferente participación de GskA en la señalización de CrzA frente al estrés por calcio y el pH alcalino.

Para examinar si la ausencia de la quinasa alteraba el estado de modificación postraduccional de CrzA, se procedió a analizar el patrón electroforético de CrzA en la cepa  $\Delta gskA$ . De este modo, micelio de la cepa MAD3844, que expresa la forma etiquetada CrzA(1-730)-GFP, fue incubado en condiciones basales de crecimiento así como en presencia de CsA como paso previo a la extracción de proteínas mediante el método VFAL. La inmunodetección empleando el anticuerpo  $\alpha$ -GFP mostró una banda correspondiente a CrzA(1-730)-GFP que tenía



**Figura R15: Alteración de la señalización de CrzA en ausencia de GskA. A)** Efecto del estrés por calcio o pH alcalino en el crecimiento colonial de la cepa  $\Delta gskA$ . Conidias de las diferentes cepas fueron inoculadas puntualmente sobre MMA o sobre MCA (-) suplementado con 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o 100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH8) e incubadas a 37°C durante 48 horas. El desarrollo colonial de la cepa  $\Delta gskA$  fue similar en las condiciones de estrés analizadas. **B)** CrzA muestra una mayor movilidad electroforética en extractos VFAL procedentes de los micelios de las cepas *gskA* silvestre, MAD3021, y mutante  $\Delta gskA$ , MAD3844, incubados tanto en presencia como en ausencia de CsA. **C)** Ensayo de desfosforilación *in vitro* de extractos VFA50 de la cepa MAD3844 obtenidos a partir de micelio incubado con o sin CsA. La combinación de la incubación del micelio con CsA y el tratamiento con PPλ del extracto revelaron cambios en la movilidad electroforética de CrzA. En la parte superior se indica el tratamiento de las muestras con la fosfatasa PPλ y/o el inhibidor específico de la reacción. Se incluyeron extractos VFA50 ( $\text{CrzA}^{\text{WFA50}}$ ) y VFAL ( $\text{CrzA}^{\text{VFAL}}$ ) del micelio la cepa *gskA* silvestre (MAD3021) como control de la movilidad electroforética. **D)** El análisis por WB de extractos VFAL tras la incubación del micelio con CsA, calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o alcalinización del medio (pH8) mostraron la alteración en la modificación postraduccional de CrzA en la cepa  $\Delta gskA$ , MAD3844. En todos los análisis por WB se emplearon geles comerciales en gradiente de SDS-poliacrilamida 4–15% y el anticuerpo  $\alpha$ -GFP.

una elevada movilidad electroforética en los extractos del micelio de la cepa  $\Delta gskA$  incubado en condiciones basales, siendo ésta mayor a la detectada en los extractos del micelio de la cepa *gskA* silvestre (MAD3021) (Figura R15-B). El tratamiento del cultivo con CsA, redujo la movilidad de CrzA(1-730)-GFP aunque no mostró la movilidad de esta forma de CrzA en presencia de la actividad GskA (Figura R15-B).

Para analizar si el cambio de movilidad producido por la incubación del micelio de la cepa  $\Delta gskA$  con CsA se debía a la aparición en el extracto de formas fosforiladas del FT debido al bloqueo de la calcineurina se procedió a realizar un ensayo *in vitro* de desfosforilación con PP $\lambda$ . Se obtuvieron extractos proteicos totales por el protocolo VFA50 del micelio de la cepa MAD3844 incubado en presencia o ausencia de CsA y posteriormente se realizó el tratamiento con PP $\lambda$ . El análisis por WB reveló un estado desfosforilado de la quimera CrzA(1-730)-GFP en los extractos del micelio incubado en condiciones basales y confirmó la presencia de formas fosforiladas del FT en presencia de CsA puesto que se detectó el incremento en la movilidad de CrzA hasta su nivel máximo tras el tratamiento con PP $\lambda$  (Figura R15-C).

Puesto que, aparentemente, el nivel de modificación postraducional de CrzA estaba reducido en el mutante nulo *gskA*, el siguiente objetivo fue determinar el efecto del estrés ambiental sobre la señalización del FT en este fondo genético. Así, la cepa MAD3844 se sometió a estrés por calcio y pH alcalino y posteriormente se extrajeron las proteínas del micelio según el método VFAL. En la figura R15-D se observa que ambos estreses indujeron una reducción en la movilidad electroforética de CrzA(1-730)-GFP respecto a la observada en los extractos procedentes de micelio cultivado en condiciones basales. Esta disminución en la movilidad de CrzA fue detectada desde el primer minuto y sin observarse cambios apreciables hasta el último tiempo muestreado, 30 minutos, de incubación del micelio con ambos estreses (Figura R15-D).

El conjunto de resultados ponen de manifiesto que GskA participa en la ruta de señalización de CrzA. La elevada movilidad de CrzA detectada en ausencia de actividad GskA sugiere que esta quinasa puede estar implicada directamente, a través de las numerosas dianas presentes en la secuencia de CrzA, o indirectamente en la modificación postraduccional de este FT. No obstante CrzA es susceptible de ser fosforilado en el fondo genético nulo *gskA*, tal y como indica el ensayo acoplado CsA/PP $\lambda$ . Este resultado muestra, junto con los del apartado anterior, que CrzA es diana de la actividad de varias quinasas. En cualquier caso, se pone de manifiesto que la señalización de CrzA es compleja dado que los resultados obtenidos tras la inducción de estrés por calcio o pH alcalino sugieren la activación de un sistema señalizador que modifica a CrzA en dichas condiciones ambientales.

## **RESULTADOS: SECCIÓN II**

### **Señalización celular de CrzA**



## **1. CrzA modifica su localización celular ante ciertos estímulos abióticos.**

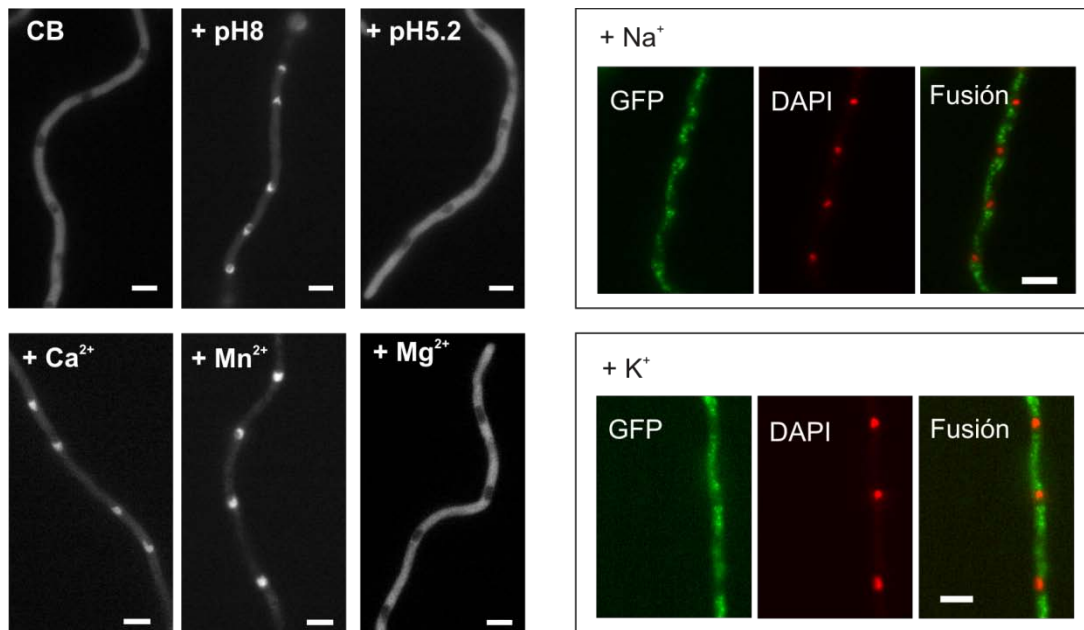
### **1.1. Señales que promueven cambio en la localización celular de CrzA.**

En los eucariotas el control de la localización celular de los FT puede ser un elemento clave en la regulación de la expresión génica. Así, en *S. cerevisiae*, Crz1p presenta una localización citoplásmica en condiciones basales mientras que es transportada al interior del núcleo en respuesta al estrés (ver apartado 2 de Introducción). Al igual que Crz1p en la levadura, en un estudio previo a este trabajo se ha demostrado que CrzA cambia su localización celular tras la inducción de estrés por calcio migra al núcleo en *A. nidulans* (Spielvogel *et al.* 2008).

Como ya ha sido mencionado previamente, CrzA desempeña un papel esencial en la tolerancia del hongo a elevadas concentraciones de calcio, manganeso o a condiciones alcalinas del medio (ver apartado 1.3 de Introducción). Sin embargo, este FT no se requiere para la homeostasis de otros cationes divalentes, como el magnesio, o monovalentes, como el sodio o el potasio (ver apartado 1.3 de Introducción). Dado que la localización celular de CrzA sólo había sido estudiada en respuesta al estrés por calcio, se procedió a analizar el efecto de otros estímulos sobre la señalización del FT. La cepa MAD3021 generada previamente en este trabajo y que expresa la quimera CrzA(1-730)-GFP, permitió estudiar la dinámica en la célula del FT mediante el microscopio de fluorescencia.

Primero se establecieron las condiciones de cultivo que permitían el crecimiento del hongo en ausencia de estrés, y que serán denominadas de aquí en adelante como las condiciones basales de crecimiento (CB). Ausencia de estrés se consideró cuando el micelio, en este caso de la cepa MAD3021, era incubado en medio específico para microscopía, WMM (apartado 1.3 de Materiales y métodos) durante 16 horas a 25°C. Para el estudio de los diferentes estreses ambientales se procedió al reemplazamiento sistemático del medio de cultivo basal por medio fresco suplementado con diferentes soluciones minerales (apartado 1.1 de Materiales y métodos).

La distribución de CrzA(1-730)-GFP en las células en condiciones basales de crecimiento era preferentemente citoplásmica, observándose la exclusión de la fluorescencia del núcleo. Cuando se añadió calcio al medio extracelular se observó en un tiempo breve, aproximadamente 1 minuto, la acumulación de fluorescencia en los diferentes núcleos del sincitio (Figura R16). Es preciso mencionar que en éste y sucesivos experimentos de estrés por calcio se utilizó sistemáticamente una concentración final de 50 mM de CaCl<sub>2</sub>. Igualmente se observó la inducción

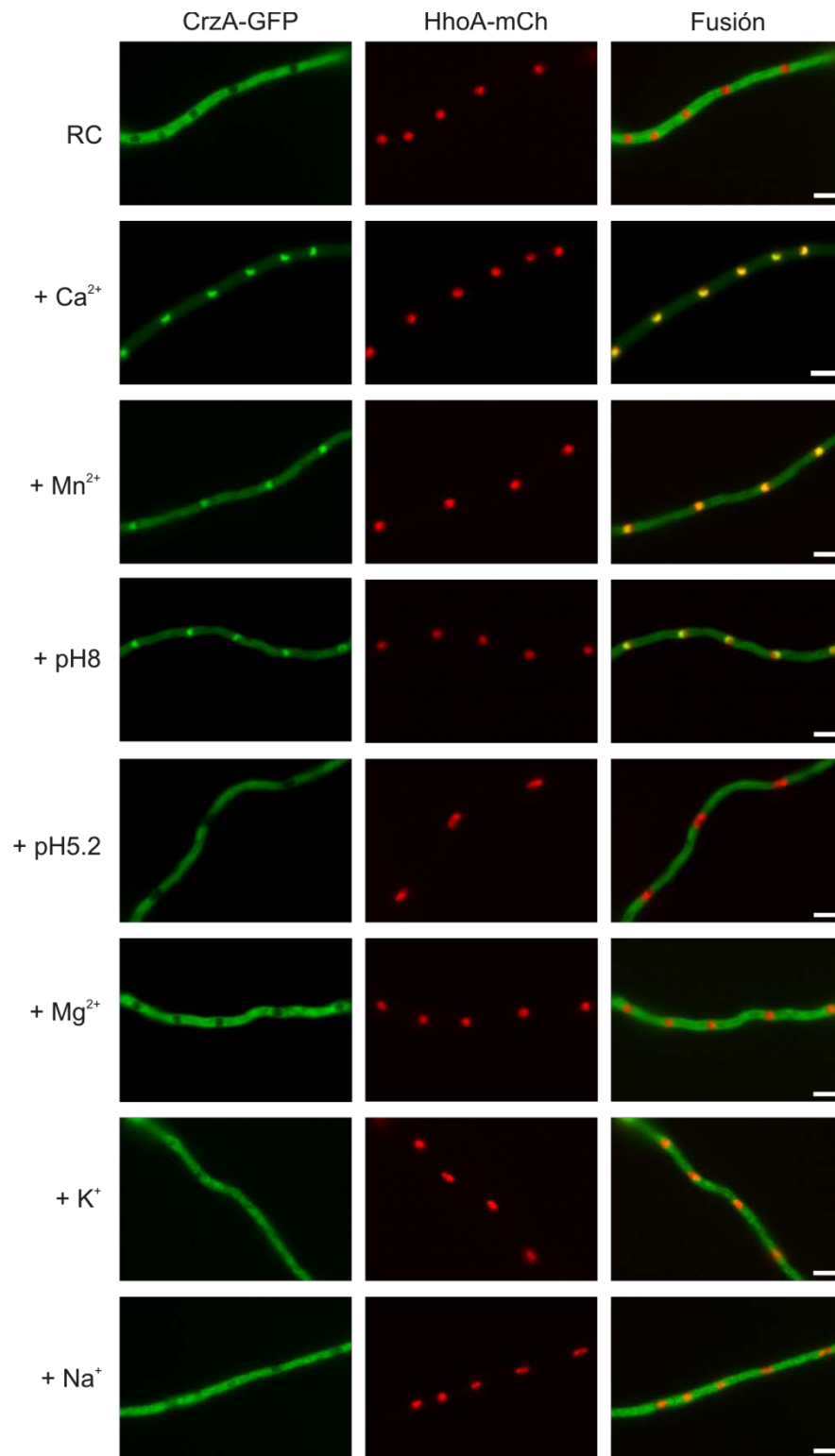


**Figura R16: Localización celular de CrzA en respuesta a estrés ambiental.** Observación de la fluorescencia emitida por la proteína CrzA(1-730)-GFP expresada por la cepa MAD3021 en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + pH5.2, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, + Mn<sup>2+</sup>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, + Mg<sup>2+</sup>, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, + Na<sup>+</sup>, 1 M NaCl, + K<sup>+</sup>, 1 M KCl. Los paneles de la derecha muestran imágenes de la tinción con DAPI de las muestras. La fusión de imágenes se muestra teñida en verde (GFP) y rojo (DAPI). Barra de escala: 5µm.

del transporte de CrzA al interior nuclear en presencia de otros estreses para los cuales el hongo necesita la actividad del FT, como fue el caso de elevadas concentraciones de manganeso (10 mM de MnCl<sub>2</sub>) o la alcalinización del medio (100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH8) (Figura R16).

Seguidamente se estudió la localización celular de CrzA en presencia de estímulos que no comprometen la supervivencia de una cepa *crzA* nula (ver apartado 1.3 de Introducción) y por tanto no deberían inducir la señalización del FT. Así, cuando el medio de cultivo fue tamponado a pH ácido (100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH5,8) no se detectaron alteraciones en la distribución celular de CrzA (Figura R16). Del mismo modo, la adición de otro catión divalente como es el magnesio (200 mM de MgCl<sub>2</sub>) no provocó efectos visibles por microscopía en la localización preferentemente citoplásmica de CrzA. En presencia de elevadas concentraciones de cationes monovalentes, como el sodio (1 M de NaCl) o el potasio (1 M de KCl), se mantuvo la exclusión nuclear de CrzA a pesar de que se observaron agregados fluorescentes en el citoplasma (Figura R16).

Con el fin de demostrar inequívocamente que la visualización de la fluorescencia emitida por CrzA(1-730)-GFP era reflejo de un cambio en la localización nucleocitoplásmica del FT, se procedió a generar una cepa que permitiese la visualización combinada de la fluorescencia emitida por CrzA y por una proteína con una localización nuclear exclusiva como la histona H1.



**Figura R17: CrzA se distribuye por el citoplasma o el nucleoplasma.** Localización de las quimeras CrzA(1-730)-GFP y HhoA-mCh expresadas por la cepa MAD4641 en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + pH5.2, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, + Mn<sup>2+</sup>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, + Mg<sup>2+</sup>, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, + Na<sup>+</sup>, 1 M NaCl, + K<sup>+</sup>, 1 M KCl. La fusión de imágenes se muestra teñida en verde (GFP) y rojo (mCh). Barra de escala: 5µm.

Para ello, se empleó el casete de DNA que codificaba para la quimera CrzA(1-730)-GFP en la transformación de la cepa MAD2446, que expresaba la histona H1 fusionada al epítipo mCherry, HhoA-mCh. Tras la purificación a homocariosis de los transformantes se continuó el estudio con la cepa MAD4641. Como se muestra en la figura R17, la respuesta de CrzA frente a los estímulos en la cepa MAD4641 fue idéntica a la observada previamente en la cepa MAD3021 (Figura R16). La observación con el microscopio de células de la cepa MAD4641 permitió verificar la colocalización de la fluorescencia emitida por ambas proteínas, CrzA y HhoA, en el núcleo en presencia de estrés por calcio, manganeso y pH alcalino, mientras que para el resto de estímulos quedó evidente que la señal emitida por la forma CrzA(1-730)-GFP quedaba excluida de los núcleos (Figura R17).

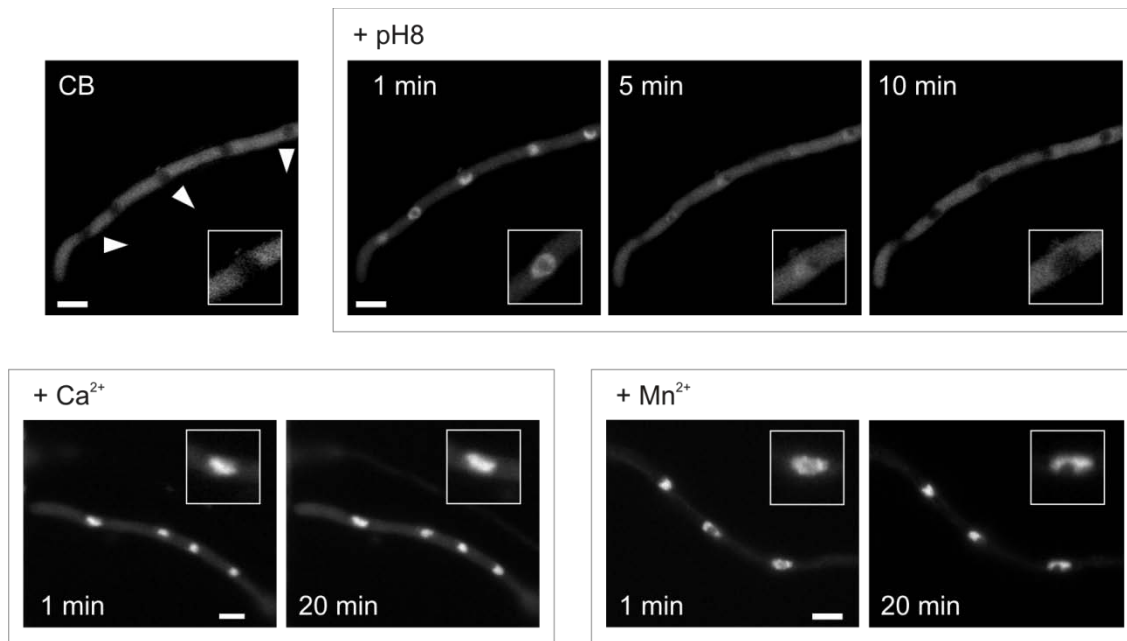
Estos resultados demuestran que la localización celular de CrzA está estrechamente relacionada con su función en la homeostasis de ciertos cationes y la tolerancia a la alcalinización del medio. Por lo tanto, el transporte nucleocitoplásmico de CrzA debe ser un punto de control importante en su sistema de señalización.

### **1.2. La duración e intensidad de la respuesta de CrzA depende del estímulo.**

Como se describe en el apartado anterior, el estrés inducido por el calcio, el manganeso y la alcalinización del medio desencadenaron el transporte nuclear de CrzA. Aunque la respuesta para estos tres estímulos fue inicialmente indistinguible, la observación prolongada del micelio reveló diferencias en la duración de la respuesta a la señal inducida.

La alcalinización del medio de cultivo estimuló una rápida respuesta de CrzA en las células de la cepa MAD3021. La incubación de las células en estas condiciones durante 1 minuto fue suficiente para observar un incremento de fluorescencia nuclear en detrimento de la fluorescencia citoplásmica. Esta señal fue transitoria ya que transcurridos de 2 a 5 minutos la fluorescencia entre ambos compartimentos se fue igualando. Finalmente, al cabo de aproximadamente 10 minutos desde el inicio de la señal el FT se hallaba de nuevo excluido de los núcleos (Figura R18). La presencia de calcio o de manganeso también promovió la acumulación de CrzA transcurridos 1 o 2 minutos desde el reemplazamiento del medio de cultivo. Sin embargo, la respuesta a ambos cationes desencadenó una señal prolongada ya que la fluorescencia permaneció en los núcleos durante al menos 20 minutos (Figura R18).

La temporalidad de la respuesta de CrzA observada en un medio alcalino contrastaba con la persistencia de la señal originada por los cationes calcio y manganeso. Esta respuesta de tipo prolongada podría ser debida a las elevadas concentraciones de cationes utilizadas. Con el fin de

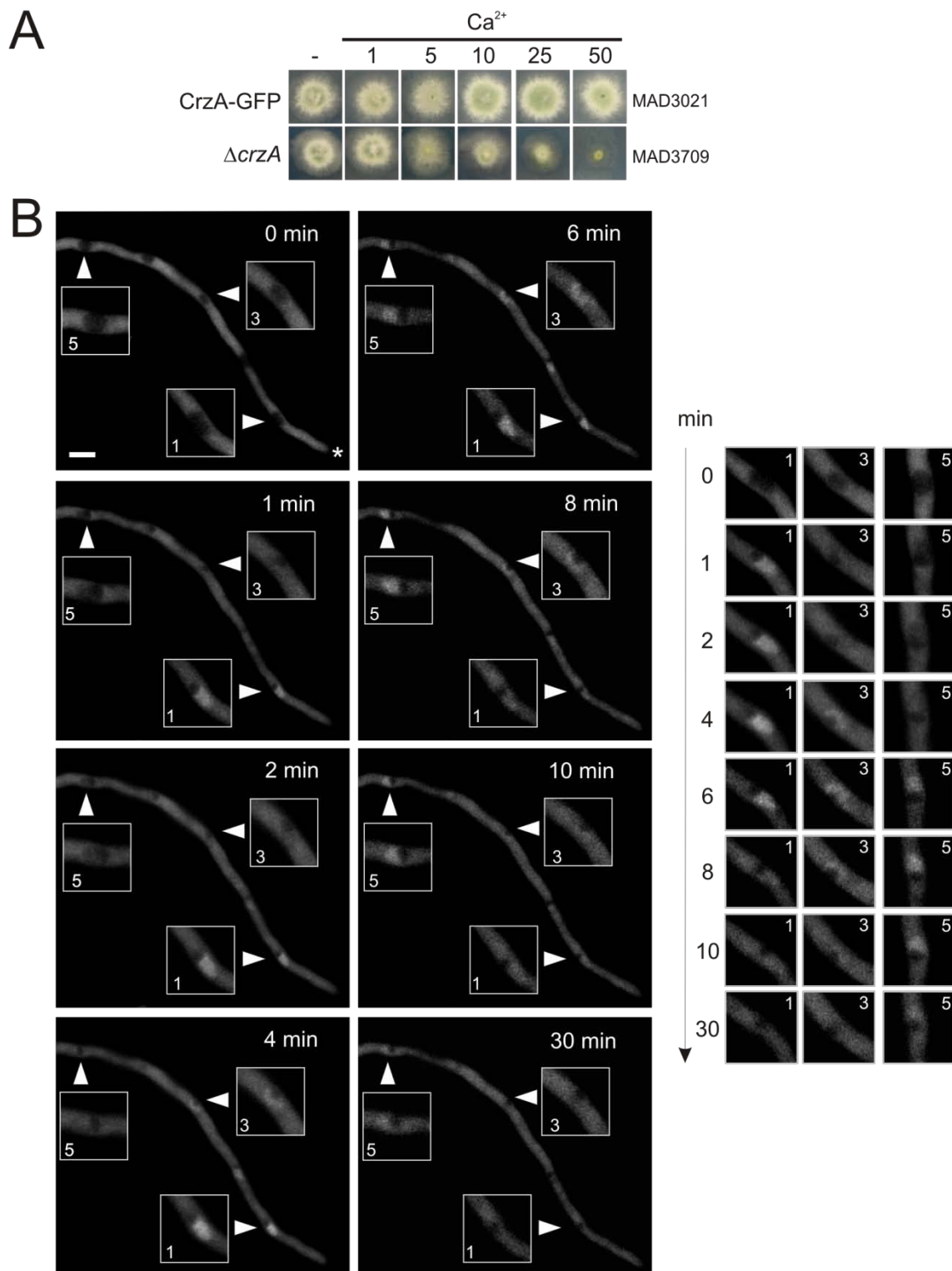


**Figura R18: Duración de la respuesta de CrzA al estrés abiótico.** Experimento de observación *in vivo* de la duración de la acumulación nuclear de CrzA(1-730)-GFP, expresada por la cepa MAD3021, tras la inducción de estrés. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, + Mn<sup>2+</sup>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>. Las fotografías fueron tomadas en los tiempos indicados en cada imagen. En cada fotograma se muestra con más detalle la fluorescencia de los núcleos. Barra de escala: 5µm.

demostrar la existencia de un efecto transitorio por el estrés catiónico, se procedió a estudiar el efecto causado al disminuir la dosis de calcio suplementada al medio de cultivo.

En primer lugar se redujo 50 veces la concentración de calcio empleada inicialmente, es decir, de 50 mM a 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Como se muestra en el análisis fenotípico de la figura R19-A, esta concentración de calcio no comprometió el crecimiento de la cepa *crzA* nula MAD3709. Sin embargo, la presencia de 1 mM de CaCl<sub>2</sub> en el medio extracelular desencadenó la misma respuesta en las células de la cepa MAD3021 que frente a concentraciones tóxicas de calcio, es decir, de 50 mM de CaCl<sub>2</sub>. Así, la incubación con 1 mM de CaCl<sub>2</sub> originó la acumulación de CrzA en el interior de los núcleos, al menos, dentro de los 20 minutos después de la inducción del estrés.

La disminución progresiva en los niveles de calcio añadidos al medio finalmente permitió observar una alteración en la señalización de CrzA. La bajada en la concentración de calcio no sólo promovió una respuesta transitoria sino que se produjo una modificación espacio-temporal en la señalización del FT. Cuando se añadió CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 10 µM se observó la acumulación de CrzA en los núcleos de forma asincrónica y polarizada. Así, el núcleo apical fue el primero en acumular fluorescencia tras la generación de la señal, mientras que en el resto de núcleos de la hifa se observó la exclusión nuclear de CrzA (Figura R19-B). Sucesivamente y de



**Figura R19: Análisis de la respuesta de CrzA a concentraciones bajas de calcio extracelular. A)** Análisis del crecimiento colonial en medio conteniendo diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> de las cepas portadoras del alelo nulo  $\Delta crzA$  o del alelo que codifica para la quimera CrzA(1-730)-GFP. Conidiosporas de las cepas MAD3021 y MAD3709 fueron inoculadas sobre MMA (-) y MMA conteniendo las concentraciones (mM) de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) indicadas en el margen superior. Las imágenes de las colonias fueron tomadas tras su incubación a 37°C durante 48 horas. **B)** Experimento de observación *in vivo* de la respuesta espacio-temporal de la acumulación nuclear de CrzA(1-730)-GFP expresada por la cepa MAD3021. Las fotografías fueron tomadas en los tiempos indicados en cada imagen tras el cambio de medio por medio suplementado con 10  $\mu$ M de CaCl<sub>2</sub>. En cada fotograma se muestra con más detalle la fluorescencia de los núcleos, numerados en relación a su posición respecto a la punta de la hifa (marcada con un asterisco). En el margen derecho se muestra con mayor detalle los núcleos seleccionados, ordenados cronológicamente. Barra de escala: 5 $\mu$ m.

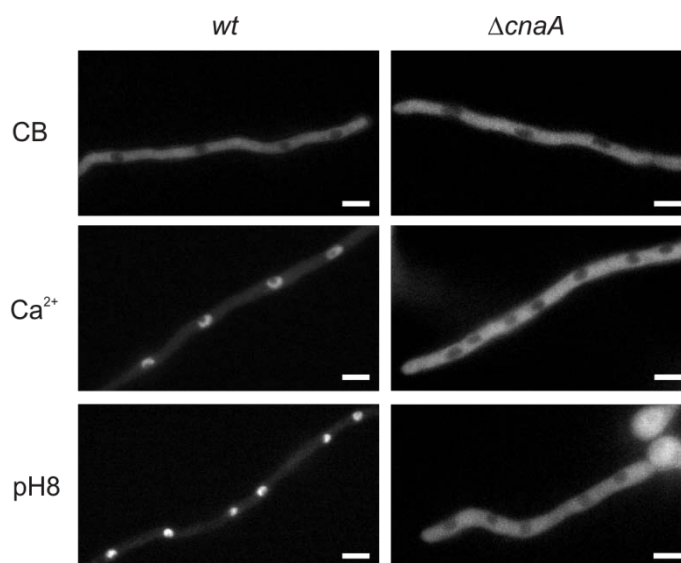
forma basípeta, el resto de núcleos fueron mostrando la importación de CrzA. Además, se observó una respuesta temporal de CrzA al estrés catiónico similar a la producida mediante la alcalinización del medio. Como se observa en la figura R19-B, los núcleos fueron paulatinamente perdiendo la acumulación de fluorescencia. Finalmente mencionar que la disminución a concentraciones nanomolares (10 nM) del calcio suplementado continuó manteniendo la capacidad de señalizar al FT al interior de los núcleos.

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de cambios en la señalización de CrzA en función de la naturaleza e intensidad del estímulo. Dado que la distribución del FT en el citoplasma es homogénea a lo largo de toda la hifa, la respuesta espacial en relación al ápice al estrés sugiere la participación de elementos polarizados en la cascada de señalización de CrzA.

## 2. Papel de la calcineurina en la señalización celular de CrzA.

### **2.1. La actividad de la calcineurina es necesaria para el transporte nuclear de CrzA.**

El modelo de señalización en *S. cerevisiae* establece que la calcineurina regula la localización celular de Crz1p a través de su estado de defosforilación (ver apartado 2 de Introducción). La batería de experimentos realizados en la Sección I de resultados ha puesto de manifiesto el papel esencial de la calcineurina en la señalización molecular de CrzA. Así, en el fondo genético  $\Delta cnaA$ , el FT expresado por la cepa MAD3222 conservaba un estado fosforilado constante e independiente del estrés abiótico. Para determinar el papel de la calcineurina en la señalización celular de CrzA, se realizó un análisis microscópico de células de la cepa MAD3222.



**Figura R20: La acumulación nuclear de CrzA es dependiente de la calcineurina.** Observación de la fluorescencia emitida por la proteína CrzA(1-730)-GFP expresada por la cepa *cnaA* silvestre, MAD3021, y  $\Delta cnaA$ , MAD3222, en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

La observación de la fluorescencia debida a CrzA-GFP en las células de la cepa  $\Delta cnaA$  mostró que CrzA mantenía una localización preferentemente citoplásmica en condiciones basales de crecimiento del mismo modo que en la cepa silvestre MAD3021 (Figura R20). La necesidad de la actividad fosfatasa de la calcineurina se puso en evidencia al analizar la distribución celular de CrzA cuando se indujo estrés tanto por calcio (añadiendo una cf. de 50 mM) como alcalinizando el pH del medio. Ninguno de los dos estreses causaron cambios en la localización celular de CrzA en la cepa  $\Delta cnaA$  (Figura R20). La exclusión nuclear de CrzA se mantuvo tras la observación prolongada del micelio en ambos medios de cultivo al menos durante 30 minutos.

Por lo tanto, la presencia de calcineurina es esencial para promover el transporte nuclear de CrzA en respuesta al estrés abiótico.

## **2.2. La calcineurina interacciona *in vitro* con CrzA.**

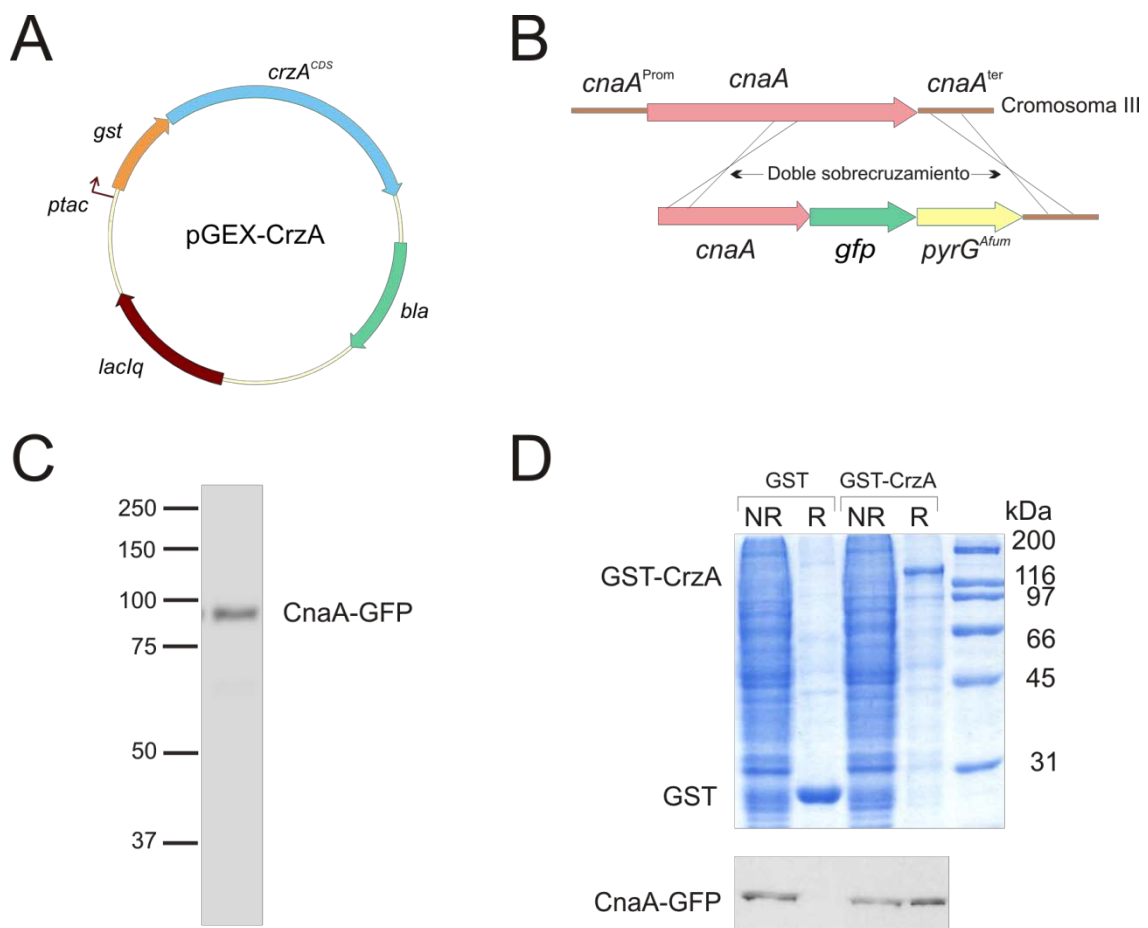
Según los modelos de los sistemas de señalización basados en la calcineurina y que han sido descritos tanto en organismos eucariotas inferiores como superiores, la actividad de esta fosfatasa sobre sus sustratos se sustenta en una interacción directa y estable entre ambas proteínas (ver apartado 4.2 de Introducción). En este apartado se demostrará la interacción entre la calcineurina de *A. nidulans* y CrzA.

Para probar que CrzA interacciona con CnaA, la subunidad catalítica de la calcineurina, se preparó todo un conjunto de materiales. En primer lugar se generó a partir del plásmido comercial pGEX-2T un plásmido recombinante que expresaría la quimera GST-CrzA. Para ello se insertó el cDNA de *crzA* en fase con la CDS de la glutation-S-transferasa, GST (apartado 2.4.3 de Materiales y métodos y Figura R21-A). El plásmido resultante fue introducido en *E. coli* y la proteína de fusión GST-CrzA fue expresada siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.4 de Materiales y métodos. Se verificó la solubilidad de la proteína recombinante GST-CrzA y su capacidad de unión a la resina glutatión-sefarosa, lo que permitiría su utilización en experimentos de interacción proteína-proteína o “pull-down” (PD). Como control de la especificidad de interacción entre GST-CrzA y CnaA, se utilizaría como cebo únicamente el epítipo GST.

Por otra parte, se procedió a generar una cepa de *A. nidulans* que expresaba la subunidad catalítica de la calcineurina fusionada en su extremo C-terminal a GFP, CnaA-GFP. El casete de reemplazamiento génico se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito en ocasiones anteriores (Figura R21-B y apartado 4.1 de Materiales y métodos). Este casete se empleó en la transformación de la cepa MAD1739, y tras el análisis por “Southern blot” de los transformantes,

se continuó el estudio con la cepa MAD4366. El análisis fenotípico de esta cepa será descrito en profundidad en el apartado 7.1 (Sección II de Resultados).

Para llevar a cabo los análisis de PD fue nuevamente necesario el empleo de extractos proteicos en estado nativo mediante el protocolo de A50. Con el mismo fin de reducir la manipulación del micelio que se persiguió durante el estudio del patrón electroforético de CrzA en la Sección I de Resultados (apartado 2.2), se decidió emplear el método VF durante la recolección. Así, tras la incubación del micelio de la cepa MAD4366 en condiciones basales de crecimiento, se siguió el procedimiento VFA50 y se analizó el patrón electroforético de CnaA. El análisis por WB utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -GFP permitió detectar una única banda de movilidad electroforética estimada con un peso molecular de 90 kDa (Figura R21-C).



**Figura R21: Ensayo de interacción *in vitro* de CrzA y CnaA.** **A)** Plásmido empleado para la expresión de la proteína GST-CrzA en las células de *E. coli*. **B)** Representación esquemática de la estrategia empleada en el reemplazamiento génico del alelo mutante que codifica para la proteína CnaA-GFP en *A. nidulans*. **C)** Movilidad electroforética de CnaA-GFP en extractos VFAL del micelio de la cepa MAD4366. Se emplearon geles comerciales de SDS-poliacrilamida con gradiente 4–15% y el anticuerpo  $\alpha$ -GFP. **D)** Ensayo de PD entre GST-CrzA y CnaA-GFP. El gel teñido con coomassie muestra las fracciones no retenidas (NR) y retenidas (R) en la resina tras el ensayo de PD. En el análisis por WB se detecta la proteína CnaA-GFP en el carril correspondiente a la fracción retenida de GST-CrzA. Se emplearon geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10% y en la inmunodetección de CnaA-GFP se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -GFP.

Una vez generadas las herramientas genéticas, moleculares y bioquímicas necesarias, se procedió a realizar el ensayo de PD. En primer lugar se purificó tanto la proteína GST como su fusión con CrzA (GST-CrzA) mediante su capacidad de unión a la resina comercial de glutatión-S-sefarosa (apartado 5.5 de Materiales y métodos). Para ello se incubó el extracto proteico de la cepas recombinantes de *E. coli* que expresaban estas proteínas con la resina previamente lavada. Una vez verificada la unión mediante SDS-PAGE, se incubó la resina cargada con el extracto proteico del micelio de la cepa de *A. nidulans* que expresaba la quimera CnaA-GFP, MAD4366. De este modo se obtuvo una fracción proteica no retenida (NR) en la resina y una fracción retenida (R) que fueron analizadas mediante SDS-PAGE por duplicado con tinción Coomasie y WB. La tinción con Coomasie mostró en la fracción R la correcta purificación de las proteínas GST y GST-CrzA por su unión a la resina y en la fracción NR el resto de proteínas que no había interactuado, con el patrón de bandas típico de extractos proteicos totales de *A. nidulans* (Figura R21-D). El análisis por WB con el anticuerpo  $\alpha$ -GFP permitió la detección de la quimera CnaA-GFP entre las proteínas que habían sido retenidas (fracción R) por la proteína de fusión GST-CrzA mientras que no se detectó en la fracción R procedente de haber utilizado únicamente el epítipo GST como cebo (Figura R21-D).

Este resultado pone de manifiesto la capacidad de interacción *in vitro* de CrzA con CnaA y por tanto sugiere que la calcineurina actúe directamente sobre la señalización del FT *in vivo* a través de las dianas o motivos (Calcineurin docking domains, CDDs) presentes en éste.

### **3. Análisis de los sitios CDD en la señalización celular de CrzA.**

La calcineurina reconoce el dominio de unión “Calcineurin Docking Domain”, CDD, en sus sustratos (ver apartado 4.2 de Introducción). Durante el desarrollo de esta tesis se han identificado CDDs del tipo PxlIT en la estructura primaria de CrzA, designadas sitios CDD1 y CDD2 (apartado 3.4 de la Sección I de Resultados). En el estudio llevado a cabo en la Sección I de Resultados se investigó el papel de estos residuos en el proceso de señalización de CrzA analizando la localización celular de este FT en ausencia de estos posibles dominios de unión a la calcineurina.

#### **3.1. El dominio CDD2 modula la localización celular de CrzA en respuesta a estrés.**

Con el fin de analizar el papel de los motivos CDD en la distribución de CrzA en la célula, se procedió a visualizar la fluorescencia de las quimeras de CrzA carentes de los sitios CDD1 y CDD2 que fueron generadas en la Sección I de Resultados.

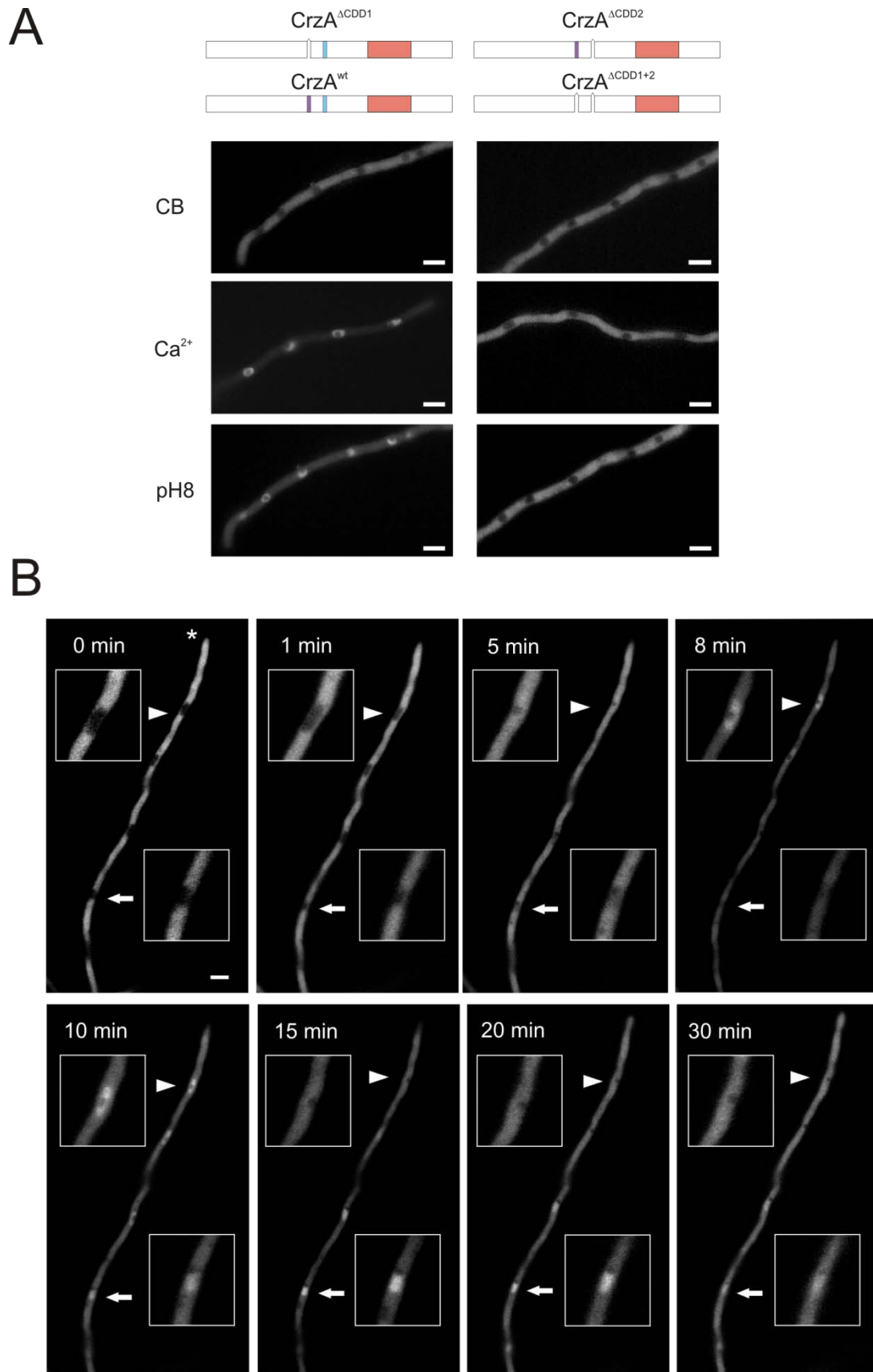
En primer lugar se estudió el papel del sitio CDD1 (residuos comprendidos entre la glutamina 294 y la histidina 316) analizando la localización de la quimera CrzA<sup>ΔCDD1</sup>-GFP expresada por la cepa MAD3806. La proteína CrzA<sup>ΔCDD1</sup>-GFP mostró la característica exclusión nuclear del FT en condiciones basales de crecimiento (Figura R22-A). Esta distribución se modificó tras aplicar estrés catiónico o alcalino, detectándose acumulación en el núcleo de CrzA<sup>ΔCDD1</sup>-GFP al cabo de 1 minuto (Figura R22-A).

Seguidamente se procedió a visualizar las células de la cepa MAD4234 que expresaban la proteína mutante CrzA<sup>ΔCDD2</sup>-GFP carente de la región comprendida entre la metionina 356 y la alanina 372. La fluorescencia emitida por la quimera CrzA<sup>ΔCDD2</sup>-GFP estaba distribuida por el citoplasma en condiciones basales de crecimiento (Figura R22-A). La inducción de estrés a las células mediante la adición de calcio o la alcalinización del medio no promovieron la inmediata internalización en los núcleos de la proteína mutante CrzA<sup>ΔCDD2</sup> (Figura R22-A). Así, tras 1 minuto de incubación en presencia de cada estrés no se detectaron cambios en la distribución de la fluorescencia en las células. Sin embargo, una prolongada exposición a estos estímulos permitió observar diferencias en la señalización de CrzA<sup>ΔCDD2</sup>. Mientras que la exclusión nuclear de CrzA<sup>ΔCDD2</sup> se mantuvo al menos durante los 30 minutos siguientes a la alcalinización del medio (Figura R22-A), el patrón de respuesta de la proteína CrzA<sup>ΔCDD2</sup>-GFP en un medio conteniendo elevadas concentraciones de calcio (50 mM de CaCl<sub>2</sub>) fue similar al detectado con la proteína CrzA<sup>wt</sup> a bajas concentraciones de calcio (10 μM ó 10 nM) (comparar Figura R22-B y Figura R19-B). Así, en presencia de calcio, la exclusión nuclear comenzó a perderse en el núcleo más apical y se fue propagando al resto de núcleos de forma basípetal (Figura R22-B). Sin embargo se produjo un retraso en el inicio de la señal respecto al descrito en la Figura R19B dado que fueron necesarios al menos 5 minutos de incubación para visualizarse la pérdida de exclusión nuclear (Figura R22-B).

Para estudiar una posible participación combinada de los sitios CDD1 y CDD2 en la señalización celular del FT, se analizó la distribución de la quimera CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>-GFP expresada por la cepa MAD4390. La forma mutante CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> mostró una distribución similar a la forma mutante CrzA<sup>ΔCDD2</sup>, producida por la cepa MAD4234. Así se detectó la exclusión nuclear del FT tanto en condiciones basales como alcalinas y una señalización polarizada en respuesta al estrés por calcio.

Por tanto, el análisis microscópico de las cepas portadoras de estas tres variantes de CrzA (CrzA<sup>ΔCDD1</sup>, CrzA<sup>ΔCDD2</sup> y CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>) ha puesto de manifiesto la participación del sitio CDD2 en la localización celular de CrzA y por consiguiente demuestran que el dominio CDD1 es prescindible para la señalización del FT. Dada la alteración en la respuesta de las formas CrzA<sup>ΔCDD2</sup> y CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>,

estos resultados sugieren una deficiente señalización del FT por la calcineurina en ausencia del sitio CDD2.



**Figura R22: Efecto de los sitios CDD en la localización celular de CrzA.** A) Observación de la fluorescencia emitida por las formas mutantes de CrzA en los sitios CDD1 y/o CDD2 en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>. En el margen superior de los fotogramas se muestra la representación esquemática de las construcciones de CrzA carentes de los sitios CDD que muestran la misma distribución de la fluorescencia, cepas MAD3806, MAD3021, MAD4234 y MAD4390. Los rectángulos violeta y azul claro indican la localización de CDD1 y CDD2 respectivamente. El rectángulo naranja representa el dominio de unión a DNA, DBD. Barra de escala: 5µm. B) Experimento de observación *in vivo* de la respuesta espacio-temporal de la acumulación nuclear de CrzA<sup>ΔCDD2</sup>-GFP expresada por la cepa MAD4234. Las fotografías fueron tomadas en los tiempos indicados en cada fotograma tras el cambio de medio por medio suplementado con 50mM de CaCl<sub>2</sub>. En cada fotograma se muestra con más detalle la fluorescencia de los núcleos, numerados en relación a su posición respecto a la punta de la hifa (marcada con un asterisco). Barra de escala: 5µm.

### 3.2. El dominio CDD2 media la interacción *in vitro* de CrzA con la calcineurina.

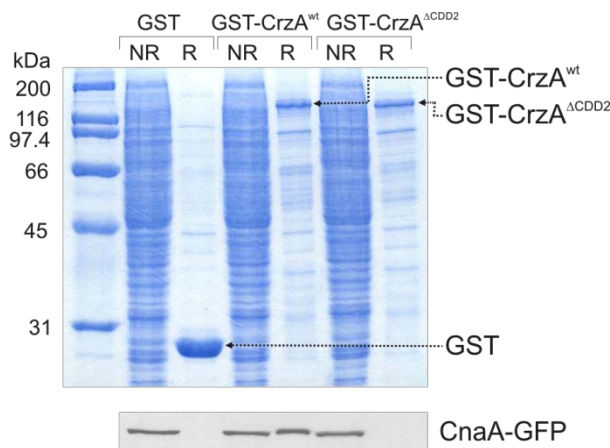
Como se ha demostrado previamente, la ausencia del sitio CDD2 modificó la señalización de CrzA mientras que la eliminación de las dos secuencias solapantes del tipo PxlXIT presentes en el sitio CDD1 no alteraron la respuesta del FT. Con el fin de determinar si el dominio CDD2 de CrzA es una diana preferente de anclaje de la calcineurina, se analizó el papel de esta región en la interacción entre la calcineurina y el FT.

Para ello se realizó un ensayo de interacción *in vitro* entre la calcineurina y una forma de CrzA que carecía del sitio CDD2, CrzA<sup>ΔCDD2</sup>. Siguiendo el esquema metodológico del apartado 2.2 se generó un nuevo plásmido a partir del plásmido basado en pGEX-2T que expresaba la fusión GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup>. En la generación de este plásmido se empleó la técnica de mutagénesis dirigida a partir del plásmido pGEX-CrzA obtenido previamente (apartado 2.4.3 de Materiales y métodos). La expresión de la quimera GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup> se realizó siguiendo el mismo protocolo que con la proteína GST-CrzA (apartado 5.4 de Materiales y métodos).

En el ensayo de PD se empleó como cebo GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup> y como presa la quimera CnaA-GFP procedente de los extractos VFA50 del micelio de la cepa MAD4366 de *A. nidulans* obtenidos con anterioridad. Además, en el ensayo de PD se incluyeron los extractos proteicos de las cepas de *E. coli* que expresaban las proteínas GST o GST-CrzA, como controles negativo y positivo de interacción, respectivamente. Se analizaron las fracciones retenida (R) y no retenidas (NR) en la resina de glutatión-S-sefarosa de los tres ensayos mediante SDS-PAGE y posterior visualización por tinción Coomassie y WB. La capacidad de unión a la resina glutatión-S-sefarosa de la fusión GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup> fue similar a la observada para el control positivo GST-CrzA, siendo en ambos casos inferior al control negativo con GST (Figura R23). Cuando se analizó la presencia de calcineurina etiquetada en los ensayos de interacción empleando el anticuerpo α-GFP sólo se pudo detectar la banda correspondiente a la quimera CnaA-GFP en la fracción R del control positivo GST-CrzA

(Figura R23). La ausencia de detección en la fracción R de la resina cargada con GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup> demuestra la importancia del sitio CDD2 en la interacción *in vitro* entre CrzA y la calcineurina.

El conjunto de resultados pone de manifiesto que la señalización de CrzA por la calcineurina está mediada en gran parte a través del sitio CDD2. Por tanto, se puede concluir que los residuos localizados en el sitio CDD2 forman parte de un dominio funcional en el reconocimiento y anclaje de la calcineurina del tipo PxlIT.



**Figura R23: Interacción de CrzA y CnaA mediante el dominio CDD2.** Ensayo de PD entre CnaA-GFP y las proteínas GST-CrzA<sup>wt</sup> o GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup>. El gel teñido con coomassie muestra las fracciones no retenidas (NR) y retenidas (R) en la resina tras el ensayo de PD. En el análisis por WB se detecta la proteína CnaA-GFP en el carril correspondiente a la fracción retenida de GST-CrzA mientras que no hay detección en el correspondiente a GST-CrzA<sup>ΔCDD2</sup>. Se emplearon geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10% y la proteína CnaA-GFP se detectó utilizando un anticuerpo α-GFP.

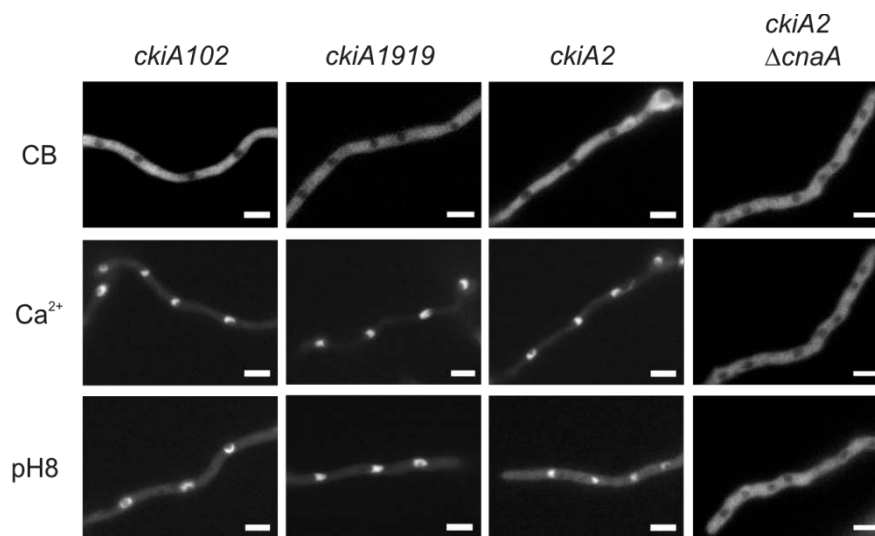
#### **4. Papel de las quinasas CkiA y GskA en la localización celular de CrzA.**

En ausencia de la calcineurina CrzA mostró una localización citoplásmica en cualquiera de las condiciones de cultivo analizadas (Figura R20). Este resultado podría indicar que la defosforilación de CrzA es necesaria para el transporte de este FT a los núcleos y que, por lo tanto, la fluorescencia citoplásmica correspondería a la emitida por forma fosforilada de CrzA-GFP. Sería por lo tanto esperable que la alteración del sistema de fosforilación de CrzA diera lugar a una preferente localización nuclear del FT. En la sección I de resultados se realizó una búsqueda de quinasas que pudiesen formar parte de la ruta de señalización de CrzA. Así, se determinó el papel de las quinasas CkiA y GskA en la modificación postraduccional del FT. Para estudiar la función de estas proteínas en la localización celular de CrzA, se realizó la observación microscópica de las cepas que portaban mutaciones en las quinasas CkiA y GskA.

Durante el análisis molecular de CrzA de la Sección I de resultados, se generó una colección de cepas que nos permitirían determinar el papel de CkiA en la localización celular de CrzA, dado que expresaban la quimera CrzA-GFP y portaban diferentes alelos de pérdida parcial de función en *ckiA* (apartado 4.1 de la Sección I de Resultados). Estas cepas eran MAD2946, MAD3044 y

MAD3045 que portaban las mutaciones *ckiA102*, *ckiA2* y *ckiA1919* respectivamente. También se generó la cepa MAD3524 que expresaba la quimera CrzA-GFP en un fondo *ckiA2* y nulo  $\Delta cnaA$ .

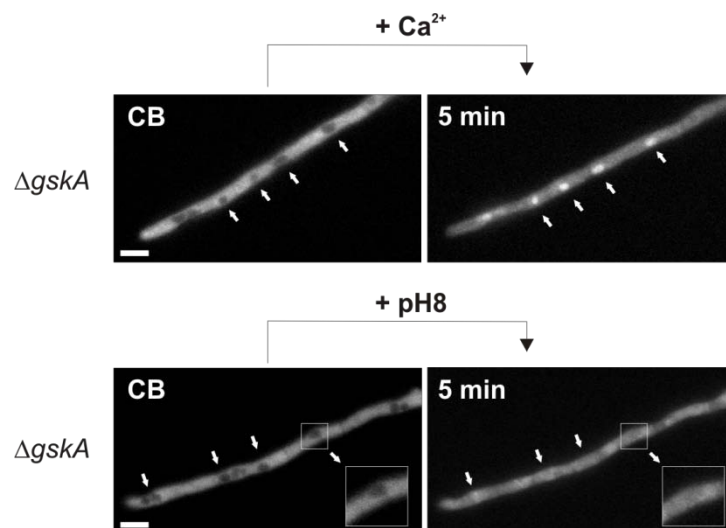
La observación al microscopio de fluorescencia de las células de las diferentes cepas *ckiA* mutantes reveló una localización citoplásmica de CrzA en condiciones basales de crecimiento (Figura R24). Posteriormente se analizó el fenotipo de estas células en respuesta al estrés mediante la alcalinización o adición de concentraciones elevadas de calcio al medio de cultivo. Ninguna de las formas mutantes de CkiA causó una alteración en la señalización de CrzA. Las hifas de las cepas *ckiA* mutantes MAD2946, MAD3044 y MAD3045 mostraron el mismo patrón de respuesta que una cepa *ckiA* silvestre, MAD3021. Así, se observó una acumulación de fluorescencia en los núcleos al cabo de 1 minuto de incubación en medio alcalino o con calcio, con una duración transitoria o prolongada respectivamente (Figura R24). De forma similar, la cepa *ckiA2*  $\Delta cnaA$ , MAD3524, mostró el mismo fenotipo que la cepa *ckiA*<sup>wt</sup>  $\Delta cnaA$ , MAD3222 (Figura R24). En este caso, se mantuvo en todas las condiciones de cultivo analizadas la distribución de CrzA en el citoplasma y por tanto prevaleció el efecto de ausencia de la fosfatasa (Figura R24). Estos resultados parecían estar en contra de la hipótesis inicial.



**Figura R24: La pérdida parcial de función de *ckiA* no modifica la distribución celular de CrzA.** Localización de la proteína CrzA(1-730)-GFP expresada en los fondos genéticos *ckiA* mutantes en diferentes medios de cultivo. La cepa mutante *ckiA2*,  $\Delta cnaA$  mostró la dependencia de la calcineurina en la acumulación nuclear de CrzA(1-730)-GFP. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;+ Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Cepas MAD2946, MAD3045, MAD3044 y MAD3524. Barra de escala: 5μm.

A continuación se procedió a estudiar el efecto de GskA en la localización celular de CrzA. Para ello, se analizó la cepa MAD3844 generada previamente en este trabajo y que expresaba la quimera CrzA-GFP en un fondo genético  $\Delta gskA$ . Dado los problemas morfológicos que presentaba

esta cepa, para este experimento las esporas fueron incubadas en las condiciones de cultivo que permitieron mejorar su crecimiento, es decir, durante 20 horas a 37°C (apartado 4.2.1 de la Sección I de Resultados). El estudio de la localización celular de CrzA en la cepa MAD3844 en condiciones basales no reveló un efecto de GskA en la exportación nuclear del FT, detectándose la fluorescencia de la quimera CrzA-GFP en el citoplasma (Figura R25). Sin embargo, se observó una alteración en la señalización de CrzA frente al estrés abiótico en la cepa  $\Delta gskA$ . Por una parte, elevadas concentraciones de calcio en el medio no promovieron una respuesta inmediata, si no que la acumulación nuclear de CrzA se completó al cabo de 5 minutos de incubación (Figura R25). Una mayor alteración en la localización de CrzA en la cepa  $\Delta gskA$  fue detectada en la respuesta al estrés alcalino. Así, la elevación del pH sólo causó la pérdida de la exclusión nuclear transcurridos 5 minutos, pero no se observó la acumulación nuclear de fluorescencia (Figura R25).



**Figura R25: Alteración de la localización celular de CrzA en ausencia de GskA.** Observación de la fluorescencia emitida por la proteína CrzA(1-730)-GFP expresada por la cepa  $\Delta gskA$ , MAD3844, en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Las flechas señalan la localización de los núcleos. En los fotogramas del panel inferior se muestran con más detalle la fluorescencia de los núcleos. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

El conjunto de resultados ponen de manifiesto que la alteración del estado de fosforilación de CrzA no impide su exclusión del núcleo. De hecho, ninguna de las mutaciones de pérdida parcial de función en CkiA promovió cambios en el transporte nucleocitoplásmico de CrzA. Por el contrario, el análisis de la cepa  $\Delta gskA$  mostró una alteración en el sistema de importación de CrzA en respuesta a los estímulos, especialmente frente a la alcalinización del medio.

## **5. Localización de señales implicadas en el transporte nucleocitoplásmico de CrzA.**

La observación en el microscopio de fluorescencia de las cepas portadoras de la quimera CrzA-GFP ha puesto de manifiesto la modificación de la localización celular de CrzA en función del contexto genético y ambiental. En el homólogo de CrzA en *S. cerevisiae*, Crz1p, se ha descrito la presencia de señales de localización y exclusión nuclear, NLS y NES respectivamente, que controlan la distribución nuclear y citoplásmica de Crz1p en respuesta a los estímulos (ver apartado 2 de Introducción). Con el fin de establecer la existencia en *A. nidulans* de un mecanismo de control del transporte nucleocitoplásmico de CrzA similar, se propuso determinar la presencia de señales de la misma naturaleza en CrzA.

### **5.1. CrzA porta señales de exportación e importación nuclear.**

El primer abordaje experimental realizado en esta tesis consistió en generar una batería de cepas que portaban alelos mutantes de *crzA* regulados por el sistema de expresión constitutivo del promotor *gpdA<sup>mini</sup>* (apartado 1.1 de la Sección I de Resultados). Estas cepas expresaban formas truncadas de CrzA que estaban fusionadas en su extremo N-terminal al epítipo GFP, lo que permitiría su visualización en el microscopio de fluorescencia. Así se procedió a analizar la localización de las quimeras de las formas truncadas de CrzA tanto en condiciones basales como su respuesta frente a la inducción de estrés.

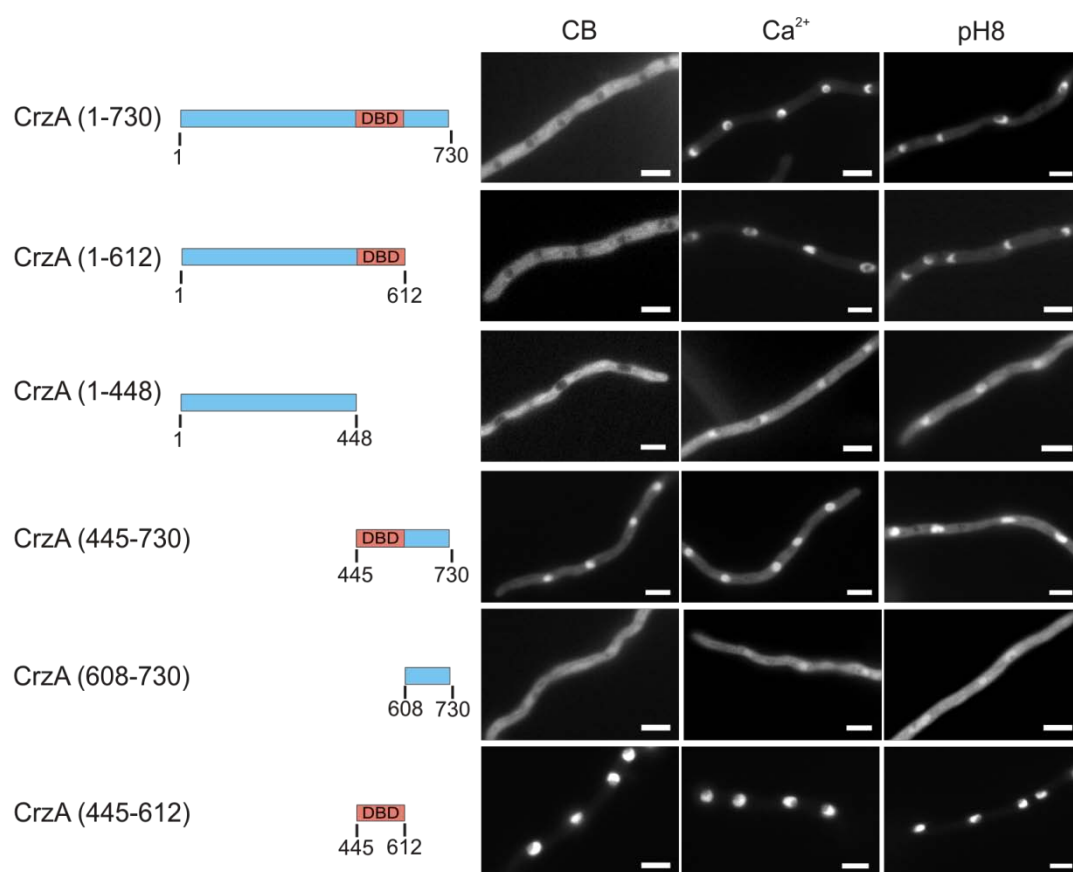
Inicialmente se analizó la distribución de la proteína completa GFP-CrzA(1-730) expresada de forma constitutiva en la cepa MAD2166. La visualización al microscopio de fluorescencia mostró una respuesta de GFP-CrzA(1-730) idéntica a la observada en los experimentos previos con la quimera CrzA(1-730)-GFP expresada bajo la regulación de su propio promotor en la cepa de referencia MAD3021. La proteína CrzA(1-730) se visualizó en el citoplasma de las hifas y respondió a los estímulos con la misma cinética descrita en los ensayos previos. Así la alcalinización del medio promovió la acumulación momentánea de fluorescencia en los núcleos mientras que el estrés por calcio causó una respuesta prolongada (Figura R26).

La quimera GFP-CrzA(1-612) expresada por la cepa MAD3493 manifestó la misma distribución de la fluorescencia que la proteína completa CrzA(1-730). Esta proteína truncada mimetizaba al FT presente en levaduras y mantenía la funcionalidad imprescindible para la tolerancia al estrés ambiental (apartado 1.1 de la Sección I de Resultados). Del mismo modo reveló un fenotipo silvestre a nivel microscópico tanto en condiciones basales, distribuida por el

citoplasma, como en presencia de estrés catiónico o alcalino, transportándose a los núcleos de las células (Figura R26).

La eliminación del DBD en la forma truncada previa, proteína GFP-CrzA(1-448), daba lugar a una forma del FT no funcional (apartado 1.1 de la Sección I de Resultados). No obstante, el estudio de esta quimera en la cepa MAD2168 reveló el mantenimiento de las señales necesarias para su exclusión nuclear en condiciones basales y su importación al núcleo tras la inducción de estrés (Figura R26). Tanto el estrés por calcio como por pH alcalino causaron la pérdida de la exclusión nuclear de CrzA aunque la acumulación de fluorescencia en los núcleos fue menor (Figura R26).

La observación al microscopio de la proteína GFP-CrzA(445-730) expresada por la cepa MAD2169 reveló la desregulación del sistema de transporte dado que mostró la fluorescencia en los núcleos de las células en condiciones basales de crecimiento (Figura R26). La alcalinización del



**Figura R26: Localización celular de las formas truncadas de CrzA.** En el margen izquierdo se muestra esquemáticamente las diferentes versiones de CrzA analizadas. El rectángulo naranja representa el dominio de unión a DNA, DBD, y los números indican las coordenadas de los aminoácidos inicial y final para cada una de las formas truncadas de CrzA estudiadas. A la derecha se muestran los fotogramas de la fluorescencia emitida por las formas truncadas de CrzA en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Cepas MAD2166, MAD3493, MAD2168, MAD2169, MAD3648 y MAD2170. Barra de escala: 5µm.

medio y la presencia de calcio extracelular no estimularon cambios en la distribución de esta forma truncada del FT (Figura R26).

La cepa MAD2170 expresa la quimera GFP-CrzA(608-730) correspondiente a la región, exclusiva de hongos filamentosos, situada en extremo C-terminal del DBD de CrzA. La proteína GFP-CrzA(608-730) mostró una localización homogénea de la fluorescencia a lo largo de la hifa. Esta proteína se visualizó dispersa tanto por el citoplasma como en el nucleoplasma de las células en condiciones de reposo y la adición de calcio o la alcalinización del medio no promovieron un incremento de la importación nuclear del FT (Figura R26).

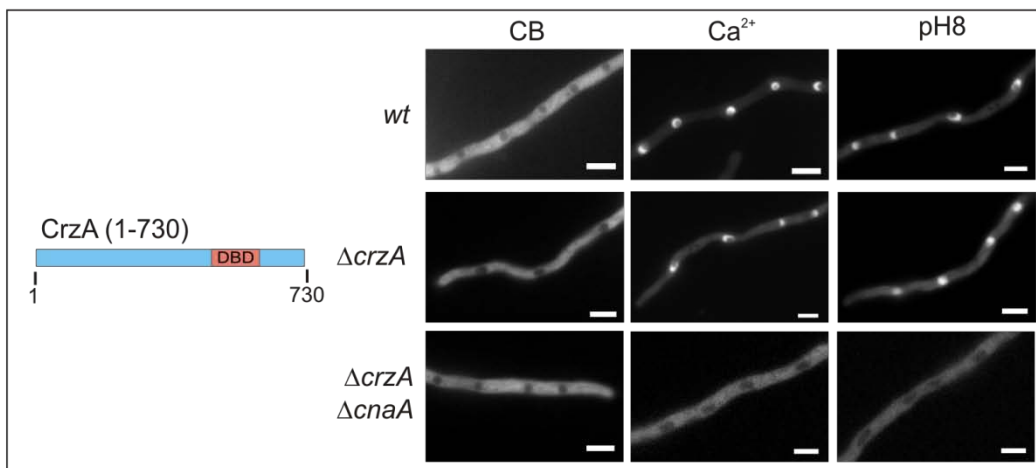
Finalmente se analizó la distribución de la quimera de la forma truncada CrzA(445-612), correspondiente a la fusión del DBD con GFP, expresada por la cepa MAD3648. Esta proteína mostró una localización exclusivamente nuclear tanto en condiciones basales como en presencia de elevadas concentraciones de calcio o elevación del pH del medio (Figura R26).

El conjunto de resultados han permitido delimitar las regiones de CrzA donde es probable que se localicen las señales que controlan el transporte nucleocitoplásmico. Dado que la forma CrzA(1-448) mantiene la capacidad de exportarse e importarse de los núcleos, estos residuos deben albergar al menos una NES y una NLS. Además, el estudio de las formas CrzA(445-730) y CrzA(608-730) sugieren que una NLS debe localizarse en la región C-terminal y muy probablemente situada por delante o contenida en el DBD. Por lo tanto, la señal NES que media la exclusión de CrzA en condiciones basales se localiza en la región N-terminal del FT y al menos dos NLS promueven el importe nuclear de CrzA, uno en la misma región N-terminal donde se localiza la NES y otro en las proximidades del DBD.

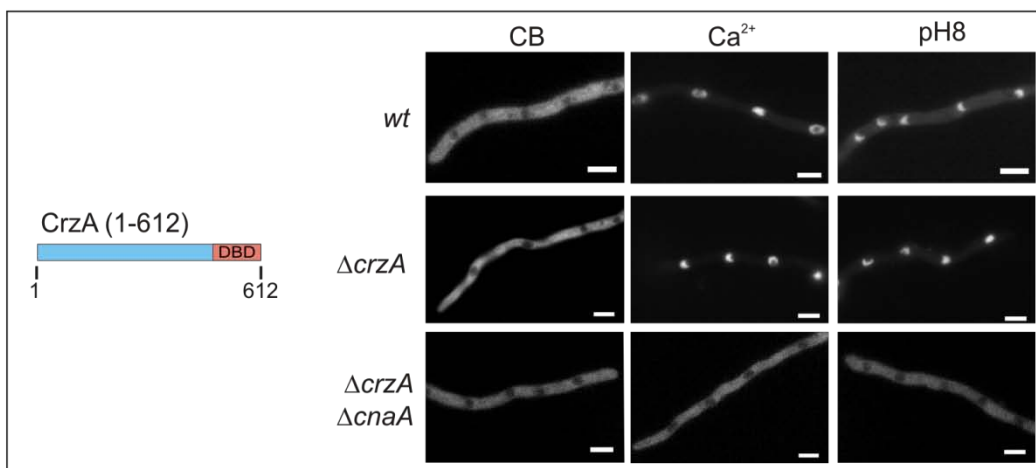
## **5.2. La calcineurina regula la localización celular de CrzA a través de elementos reguladores presentes en su región N-terminal.**

En el apartado 2.1 de esta sección de Resultados se demostró la necesidad de la calcineurina para el transporte de CrzA al interior de los núcleos en respuesta al estrés ambiental. Con el fin de determinar si esta fosfatasa ejerce un papel regulador en el transporte de CrzA se analizó la influencia de la calcineurina en la localización de las formas truncadas del FT. Para ello se emplearon las cepas generadas previamente en este trabajo que expresaban de forma constitutiva las formas de CrzA que mantenían la funcionalidad en un fondo nulo *crzA*, cepas MAD2171, MAD3494 y MAD3386, y los descendientes de éstas obtenidos por cruce con la cepa  $\Delta cnaA$ , cepas MAD3555, MAD3559 y MAD3527.

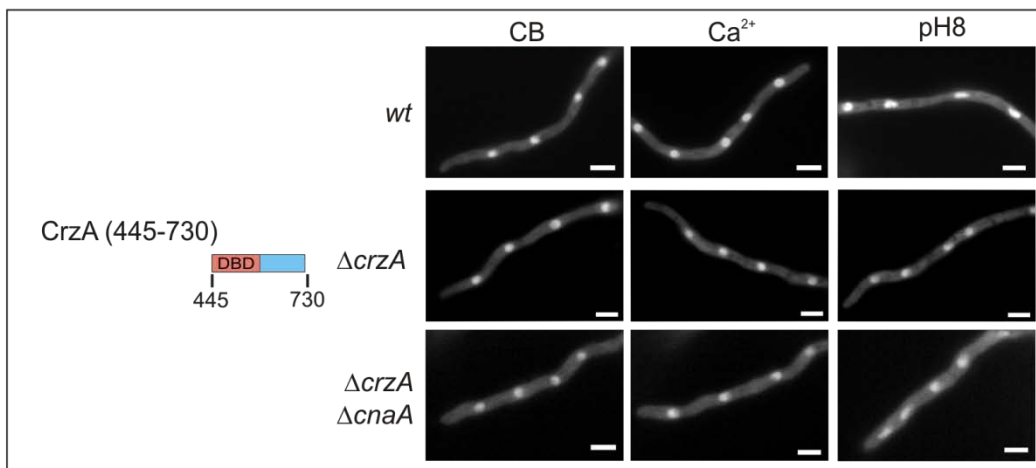
A



B



C



**Figura R27: Señalización de las formas funcionales de CrzA en fondos genéticos  $\Delta crzA$  y  $\Delta cnaA$ .** Observación de la fluorescencia emitida por la proteína *CrzA(1-730)-GFP*, *CrzA(1-612)-GFP* y *CrzA(445-730)-GFP* en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100 mM  $Na_2HPO_4$ ; +  $Ca^{2+}$ , 50 mM  $CaCl_2$ . Cepas MAD2166, MAD2171, MAD3555, MAD3493, MAD3494, MAD3559, MAD2169, MAD3386 y MAD3527. En el margen izquierdo se muestra esquemáticamente cada versión de *CrzA* analizada en los fondos genéticos *wt*,  $\Delta crzA$  y  $\Delta cnaA$ . El rectángulo naranja representa el dominio de unión a DNA, DBD, y los números indican las coordenadas de los aminoácidos inicial y final para cada una de las formas completa y truncada de *CrzA*. Barra de escala: 5  $\mu m$ .

La localización de la proteína GFP-CrzA(1-730) expresada por la cepa  $\Delta crzA$  MAD2171 fue idéntica a la que presentó la cepa MAD2166 que portaba esta misma construcción en un fondo *crzA* silvestre tanto en condiciones basales como tras la inducción de estrés (Figura R27-A). La proteína GFP-CrzA(1-730), expresada constitutivamente y como única fuente del FT en un fondo  $\Delta cnaA$  por la cepa MAD3555, mostró una localización citoplásmica tanto en condiciones basales como tras la inducción de estrés (Figura R27-A). Este resultado fue el mismo que el observado en la cepa MAD3222 que codificaba para la proteína completa CrzA(1-730)-GFP regulada por la expresión de su propio promotor *crzA* en un fondo  $\Delta cnaA$  (Figura R20).

Como ya se demostró en el apartado 5.1 (Sección II de Resultados), la proteína GFP-CrzA(1-612) portaba las señales necesarias para la regulación del transporte nucleocitoplásmico del FT en la cepa MAD3493. La ausencia de CrzA endógeno no modificó el comportamiento de la forma truncada CrzA(1-612) manteniéndose la exportación e importación nuclear de la quimera en ausencia y presencia de estrés respectivamente (cepa MAD3494, Figura R27-B). En la cepa MAD3559, al eliminarse la expresión de *cnaA*, se observó la pérdida de la señalización de la forma truncada CrzA(1-612) dado que la fluorescencia permaneció en el citoplasma tras la elevación del pH o del contenido de calcio en el medio (Figura R27-B).

Finalmente se analizó si la señalización de la forma truncada CrzA(445-730) estaba alterada en los fondos genéticos  $\Delta crzA$ , cepa MAD3386 y  $\Delta crzA \Delta cnaA$ , cepa MAD3527. El análisis microscópico reveló el mismo fenotipo para las cepas portadoras de GFP-CrzA(445-730) independientemente del fondo genético y de las condiciones del medio al igual que se había observado previamente en la cepa *crzA* silvestre MAD2169 (Figura R27-C).

Estos resultados ponen de manifiesto que la proteína CrzA endógena no interviene en la señalización de las formas funcionales de CrzA expresadas de forma autónoma. Además se ha demostrado que la región N-terminal de CrzA contiene las dianas y los dominios funcionales necesarios para responder a los estímulos siendo éstos regulados por la acción de la calcineurina. Asimismo, la independencia de las condiciones ambientales y del fondo genético para el mantenimiento de la localización de CrzA(445-730) en los núcleos refuerza la hipótesis de la existencia de una NLS en la región C-terminal del FT.

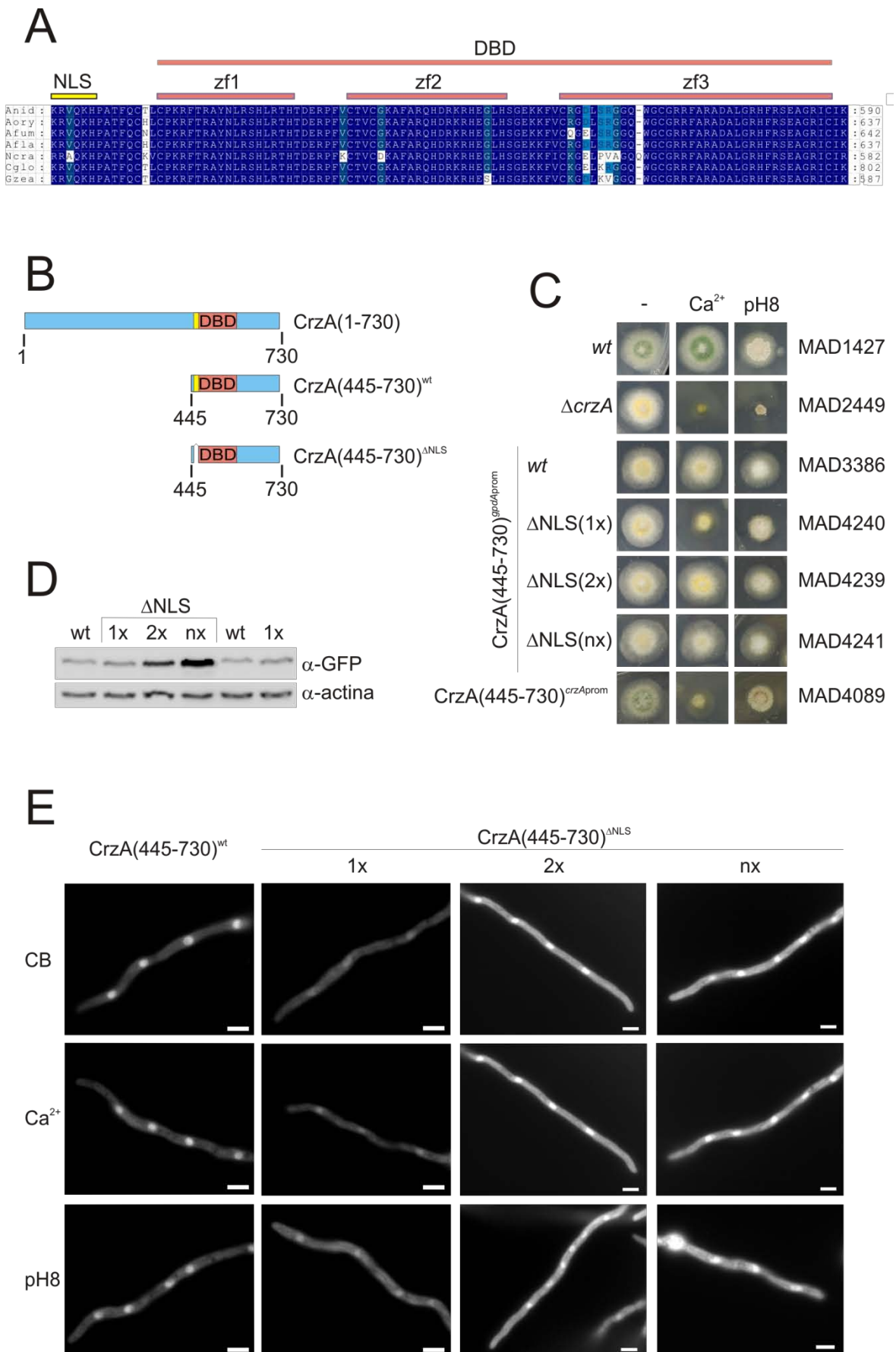
### 5.3. Identificación de una NLS en CrzA.

Las señales para el transporte nucleocitoplásmico NLS y NES presentes en las macromoléculas residen en un péptido señal que favorece su reconocimiento por las proteínas transportadoras. Las NLS de tipo clásico se caracterizan por contener uno o más pequeños grupos de residuos de carácter básico como lisinas y argininas mientras que las NES clásicas, es decir reconocidas por los homólogos de la exportina-1 (KapK en *A. nidulans*), están formadas por aminoácidos hidrofóbicos que suelen cumplir el consenso LxxxLxxLxL (Pemberton *et al.* 2005). El estudio de las formas truncadas de CrzA permitió delimitar las regiones que pudiesen albergar esta clase de señales. Con el fin de identificar las señales NLS y NES en la estructura primaria de CrzA se realizó un alineamiento múltiple de secuencia con homólogos CrzAs procedentes de hongos filamentosos (Figura R28-A).

Si bien la búsqueda *in silico* no permitió identificar ningún dominio con similitud a una NES clásica, se localizó una región conservada rica en aminoácidos básicos que cumplía los requisitos para ser una NLS. Esta región estaba comprendida entre la lisina 487 y la histidina 492 y situada muy próxima al primer dedo de zinc del DBD (Figura R28-A y B). Este resultado era coherente con los datos obtenidos previamente en el estudio de las señales de transporte en las formas truncadas de CrzA, sugiriendo que la forma CrzA(445-730) debiese su constante localización nuclear a la presencia de esta señal.

Para analizar la función de la putativa NLS, se generó un plásmido que codificaba para la forma truncada GFP-CrzA(445-730) carente de la región NLS, CrzA(445-730)<sup>ΔNLS</sup>, mediante mutagénesis dirigida (apartado 2.4.2 de Materiales y métodos) y posteriormente fue empleado en

**Figura R28: Análisis funcional de una NLS en CrzA. A)** Alineamiento múltiple de secuencia de homólogos fúngicos de CrzA de la región de la NLS junto al dominio de unión a DNA, DBD, formado por tres dedos de zinc, zf. Los rectángulos naranjas indican la posición de cada uno de los dedos de zinc en CrzA. El rectángulo amarillo indica los residuos eliminados en la generación de la forma de CrzA que carece de la NLS. En el alineamiento múltiple se muestran fragmentos de la estructura primaria de los posibles homólogos de CrzA en *A. nidulans* (Anid) BAE94327, *Aspergillus oryzae* (Aory) BAE57003, *Aspergillus fumigatus* (Afum) EAL88401, *Aspergillus flavus* (Afla) B8NNI1, *Neurospora crassa* (Ncra) EAA32849, *Chaetomium globosum* (Cglo) EAQ88414 y *Gibberella zeae* (Gzea) XP\_381517. Las coordenadas de cada secuencia se indican en la parte derecha del alineamiento. **B)** Representación esquemática de la posición de la NLS en las formas completa y truncadas de CrzA indicado por un rectángulo amarillo. El rectángulo naranja representa el dominio de unión a DNA, DBD. **C)** Análisis fenotípico de cepas que expresan una o más copias de la forma de CrzA carente de la NLS. Conidias de las cepas portadoras de alelos silvestres o mutantes de *crzA* fueron inoculadas sobre MMA (-) y MMA conteniendo 50mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH8) e incubadas a 37°C durante 48 horas. **D)** Comparación de los niveles de expresión de la forma truncada de CrzA carente de la NLS en extractos VFAL del micelio de cepas portadoras de una (1x), dos (2x) o mayor número (nx) de integraciones del plásmido en el genoma. En el análisis por WB se emplearon geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida al 10%. La inmunodetección de CrzA se realizó mediante el empleo de los anticuerpos α-GFP. Se utilizaron los niveles de actina (α-actina) como control de carga. **E)** Observación de la fluorescencia emitida por las proteínas CrzA(445-730)<sup>wt</sup>-GFP y CrzA(445-730)<sup>ΔNLS</sup>-GFP expresada en una o mayor número de copias en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50mM CaCl<sub>2</sub>. Cepas MAD3386, MAD4240, MAD4239 y MAD4241. Barra de escala: 5μm.



la transformación de la cepa  $\Delta crzA$  MAD2449. El análisis por “Southern blot” de los transformantes homocariontes analizados determinó la integración del plásmido en una sola copia (1x), al menos en dos (2x) o en mayor número de copias (nx), seleccionándose así las cepas MAD4240, MAD4239 y MAD4241, respectivamente. El análisis fenotípico de estas cepas mostró que, independientemente del número de integraciones del plásmido, la proteína CrzA(445-730) <sup>$\Delta$ NLS</sup> no alteró el desarrollo colonial del hongo en ausencia de estrés (Figura R28-C). Sin embargo, la presencia de una sola copia no revirtió completamente la sensibilidad a elevadas concentraciones de calcio o la alcalinización del medio de la cepa MAD4240. Así, la tolerancia al estrés de esta estirpe fue similar a la que mostró la cepa MAD4089, que portaba el alelo de la forma truncada CrzA(445-730) expresada bajo el control del propio promotor *crzA* (Figura R28-C). El incremento en el número de copias de la proteína CrzA(445-730) <sup>$\Delta$ NLS</sup> permitió el crecimiento de las cepas MAD4239 y MAD4241 en presencia de estrés por calcio o pH alcalino de manera similar al de una cepa MAD3386, que expresaba de forma constitutiva la versión silvestre de la forma truncada CrzA(445-730)<sup>wt</sup> (Figura R28-C).

Para comprobar si el mayor número de integraciones en el genoma causaba un aumento en los niveles de expresión de la proteína, se analizó el patrón electroforético de las estirpes portadoras de las quimeras GFP-CrzA(445-730) silvestre o  $\Delta$ NLS. Para ello, se procedió a la extracción de proteínas mediante el método VFAL del micelio de la cepa MAD3386, que expresaba la proteína CrzA(445-730)<sup>wt</sup>, y de las cepas que expresaban la forma CrzA(445-730) <sup>$\Delta$ NLS</sup> MAD4240, MAD4239 y MAD4241. Como se muestra en el WB de la figura R28-D, la cepa MAD4240 que constaba de una sola integración del plásmido mostró unos niveles de expresión de la proteína CrzA(445-730) <sup>$\Delta$ NLS</sup> semejantes a los de CrzA(445-730)<sup>wt</sup> expresados en la cepa control MAD3386. La presencia de dos (2x) o mayor número (nx) de copias de CrzA(445-730) <sup>$\Delta$ NLS</sup> en las cepas MAD4239 y MAD4241 promovió un incremento proporcional en los niveles de proteína detectados (Figura R28-D). El control de carga de los diferentes extractos en el WB se realizó mediante la inmunodetección de la actina (Figura R28-D).

Para determinar si la putativa NLS realmente cumplía un papel en la señalización de CrzA, se procedió al análisis microscópico de las formas truncadas CrzA(445-730) silvestre y  $\Delta$ NLS. En este experimento la localización de la proteína GFP-CrzA(445-730)<sup>wt</sup> expresada por la cepa MAD3386 fue idéntica a la descrita en el apartado previo, es decir, se acumuló en los núcleos independientemente del ambiente (Figuras R27 y R28-E). La fluorescencia emitida por la quimera GFP-CrzA(445-730) <sup>$\Delta$ NLS</sup> en las células de la cepa MAD4240 reveló una disminución de la acumulación nuclear de CrzA a pesar de que no se consiguió recuperar la exclusión nuclear de

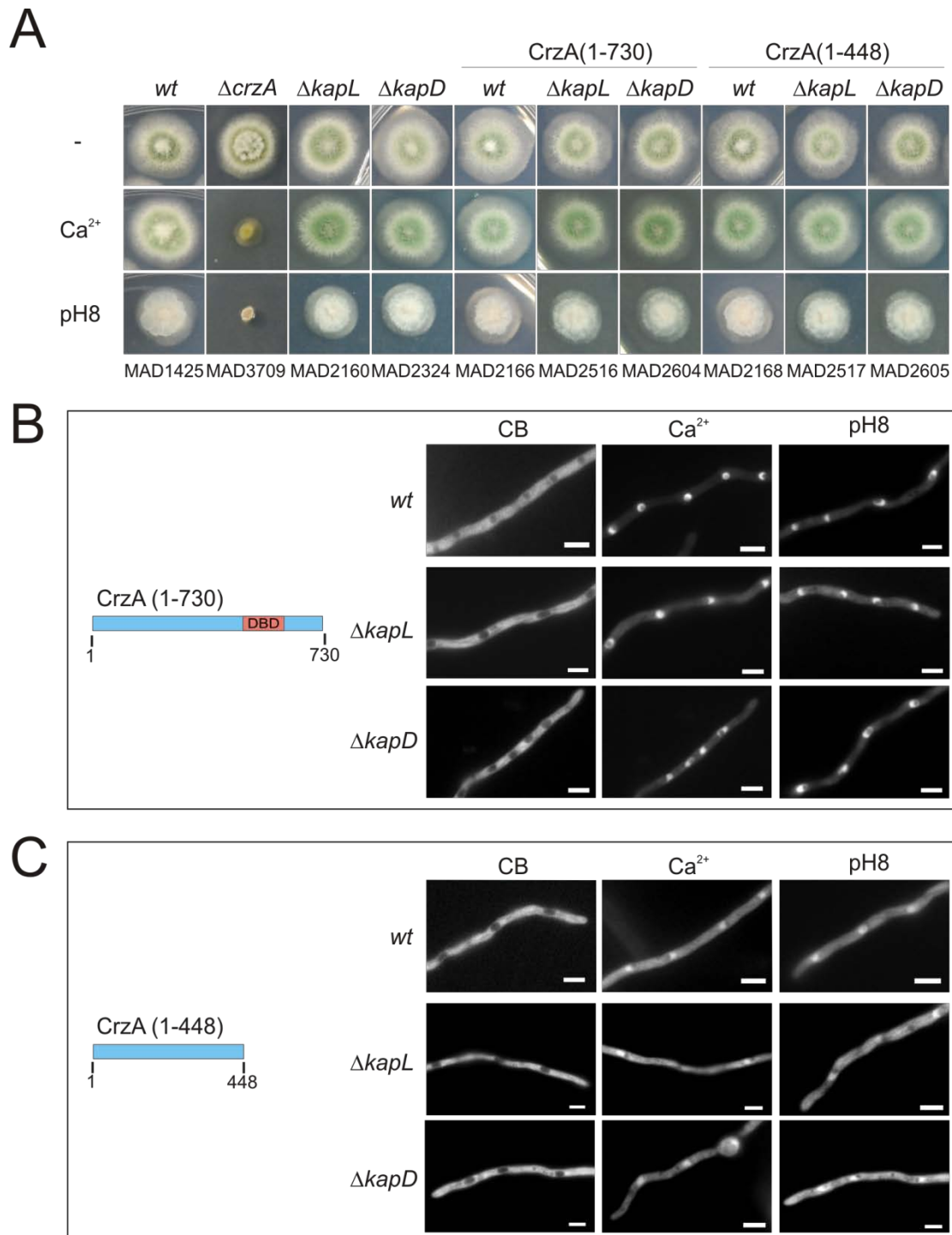
CrzA esperable en ausencia de estrés (Figura R28-E). La elevación del calcio extracelular o la alcalinización del medio no promovieron cambios en la distribución celular de CrzA (Figura R28-E). El aumento en el número de copias de la proteína CrzA(445-730)<sup>ANLS</sup> en las células de las cepas MAD4239 (2x) y MAD4241 (nx) también se vio reflejado en un incremento de la fluorescencia de las hifas de modo que para la observación de las quimeras en estas estirpes se disminuyó el tiempo de exposición. Como se observa en la figura R28-E, la proteína CrzA(445-730)<sup>ANLS</sup> mostró una localización tanto nuclear como citoplásmica en las cepas que portaban dos (2x) o más (nx) copias del plásmido en cualquiera de las condiciones del medio.

Dado que el aumento del número de copias del plásmido integrado en el genoma de las cepas MAD4239 y MAD4241 promovió un aumento en los niveles de expresión de CrzA(445-730)<sup>ANLS</sup>, la tolerancia al estrés mostrada por estas cepas puede ser debida a la acumulación de la proteína en los núcleos. El conjunto de resultados demuestran que la NLS identificada, región comprendida entre los residuos 487 y 492, participa en la señalización de CrzA favoreciendo su localización nuclear.

## **6. Estudio de transportadores nucleares.**

En *S. cerevisiae* el exportador que se encarga de mantener a Crz1p en el citoplasma en condiciones basales es Msn5p mientras que Nmd5p es el importador específico que transporta al FT al núcleo en respuesta al estrés (ver apartado 2 de Introducción). La ausencia de estos transportadores en la levadura lleva asociado un fenotipo de sensibilidad a calcio característico de las células  $\Delta crz1$  (Polizotto *et al.* 2001; Boustany *et al.* 2002). El estudio sistemático de los transportadores nucleares presentes en *A. nidulans* ha permitido la identificación y caracterizaron de las carioferinas KapL y KapD como las proteínas homólogas de Msn5 y Nmd5 en el hongo filamentoso (Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011). Los genes que codifican para estos transportadores, *kapL* y *kapD*, no son esenciales en *A. nidulans* y su delección en las cepas MAD2160 y MAD2324 respectivamente no redujeron o alteraron el crecimiento del hongo en presencia de calcio o en un medio alcalino (Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011).

Para estudiar la participación de KapL y KapD en el transporte nucleocitoplásmico de CrzA, se procedió a analizar la localización celular de CrzA en ausencia de estas carioferinas. Así, se realizó el cruce de las cepas nulas  $\Delta kapL$ , MAD2160, y  $\Delta kapD$ , MAD2324, con la cepa MAD2166 que expresaba de forma constitutiva la quimera GFP-CrzA(1-730). Los descendientes del cruce que expresaban la quimera GFP-CrzA(1-730) en el fondo genético  $\Delta kapL$ , MAD2516, o  $\Delta kapD$



**Figura R29: Estudio de la importación y exportación de CrzA en cepas nulas de los transportadores.** **A)** Análisis fenotípico de las cepas portadoras de alelos mutantes de *crzA* en fondos genéticos nulos de los transportadores. Esporas de cada cepa analizada se inocularon puntualmente sobre MMA (-), MMA suplementado con 50mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o tamponado a pH alcalino con 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH8). Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y se fotografió la colonia formada en cada condición. **B)** Visualización de las formas completa y truncada de CrzA expresadas en una cepa silvestre o nula para los transportadores en diferentes medios de cultivo. CB, condiciones basales; + pH8, 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; + Ca<sup>2+</sup>, 50mM CaCl<sub>2</sub>. En el margen izquierdo de cada panel se muestra esquemáticamente la versión de CrzA analizada. El rectángulo naranja representa el dominio de unión a DNA, DBD, y los números indican las coordenadas de los aminoácidos inicial y final de las formas completa y truncada de CrzA. Barra de escala: 5µm.

MAD2604, mostraron tolerancia a elevadas concentraciones de calcio y a la alcalinización del medio (Figura R29-A).

La observación al microscopio de las cepas MAD2516 y MAD2604 mostró que CrzA mantenía la misma distribución en las células que en una cepa silvestre para los transportadores, MAD2166 (Figura R29-B). En la cepa nula del exportados  $\Delta kapL$  la fluorescencia se observó excluida de los núcleos en condiciones basales y se acumuló en los núcleos tras la inducción de estrés (Figura R29-B). Asimismo, la ausencia del importador KapD no impidió que CrzA fuese transportado del citoplasma a los núcleos en presencia de calcio o en un medio alcalino (Figura R29-B).

Dado que el estudio de los transportadores empleando la proteína completa CrzA(1-730) no permitió observar cambios en la señalización de CrzA, se decidió realizar otro abordaje experimental. Los resultados obtenidos en el apartado 5.1 (Sección II de Resultados) demostraron la presencia de varias señales de transporte celular en CrzA empleando formas truncadas del FT. Asimismo se identificó una NLS en la estructura primaria de CrzA demostrando su función en la importación nuclear de la forma CrzA(445-730) (apartado 5.3 de la Sección II de Resultados).

La forma truncada CrzA(1-448), que carece de la NLS identificada, mostró una distribución celular similar a la de una cepa silvestre tanto en condiciones de reposo como de estrés por lo que se empleó en el estudio de la señalización del FT en los fondos nulos de las carioferinas. Mediante el cruce de la cepa que codificaba para la proteína GFP-CrzA(1-448) (MAD2168) con las cepas  $\Delta kapL$  (MAD2160) y  $\Delta kapD$  (MAD2324) se obtuvieron las cepas MAD2517 y MAD2605 que portaban los alelos  $\Delta kapL$  y  $\Delta kapD$  respectivamente y expresaban la quimera GFP-CrzA(1-448). Estas cepas mostraron el mismo fenotipo silvestre de resistencia al estrés que el mostrado por las cepas parentales (Figura R29-A).

La ausencia del exportador KapL en la cepa MAD2517 no alteró la localización de la forma truncada CrzA(1-448) observándose la fluorescencia excluida de los núcleos en condiciones basales y tanto la alcalinización del medio como la presencia de calcio promovieron la importación del FT a los núcleos (Figura R29-C). En la cepa  $\Delta kapD$  la fluorescencia de CrzA(1-448) se observó en el citoplasma en condiciones basales y la inducción de estrés por calcio o pH alcalino generó la misma respuesta que la observada en la cepa silvestre de los transportadores MAD2168 (Figura R29-C).

El estudio de la localización celular de CrzA en los fondos genéticos  $\Delta kapL$  y  $\Delta kapD$  no ha permitido establecer una función de estas carioferinas en el transporte nucleocitoplásmico de CrzA. Estos resultados sugieren que la ruta de transporte de CrzA no está mediada del mismo modo que en la levadura y que exista una situación alternativa en la que otras carioferinas participen en el sistema de transporte de forma redundante.

### **7. Señalización de los elementos reguladores en trans de CrzA.**

Durante la realización de esta tesis doctoral se ha analizado la señalización de CrzA tanto a nivel molecular como celular en diferentes fondos genéticos. Son varios los experimentos realizados que han permitido establecer la participación de elementos en *trans* que modulan la respuesta de CrzA en respuesta a los estímulos. Con el fin de profundizar en el mecanismo de transducción de señales, se procedió a analizar la respuesta de los componentes de la cascada de señalización intracelular de CrzA frente a los estímulos para los cuales es necesaria la función de este FT.

#### **7.1. Estudio de la calmodulina y de la calcineurina en respuesta a estrés.**

Como se ha demostrado, la calcineurina participa tanto en la modificación postraduccional como en la distribución celular de CrzA en *A. nidulans*. El modelo general de señalización de la calcineurina establece que su actividad fosfatasa se desencadena tras la formación de un complejo trimérico constituido por las subunidades catalítica y reguladora de la calcineurina así como por la proteína calmodulina en presencia de calcio (ver apartado 4.1 de Introducción).

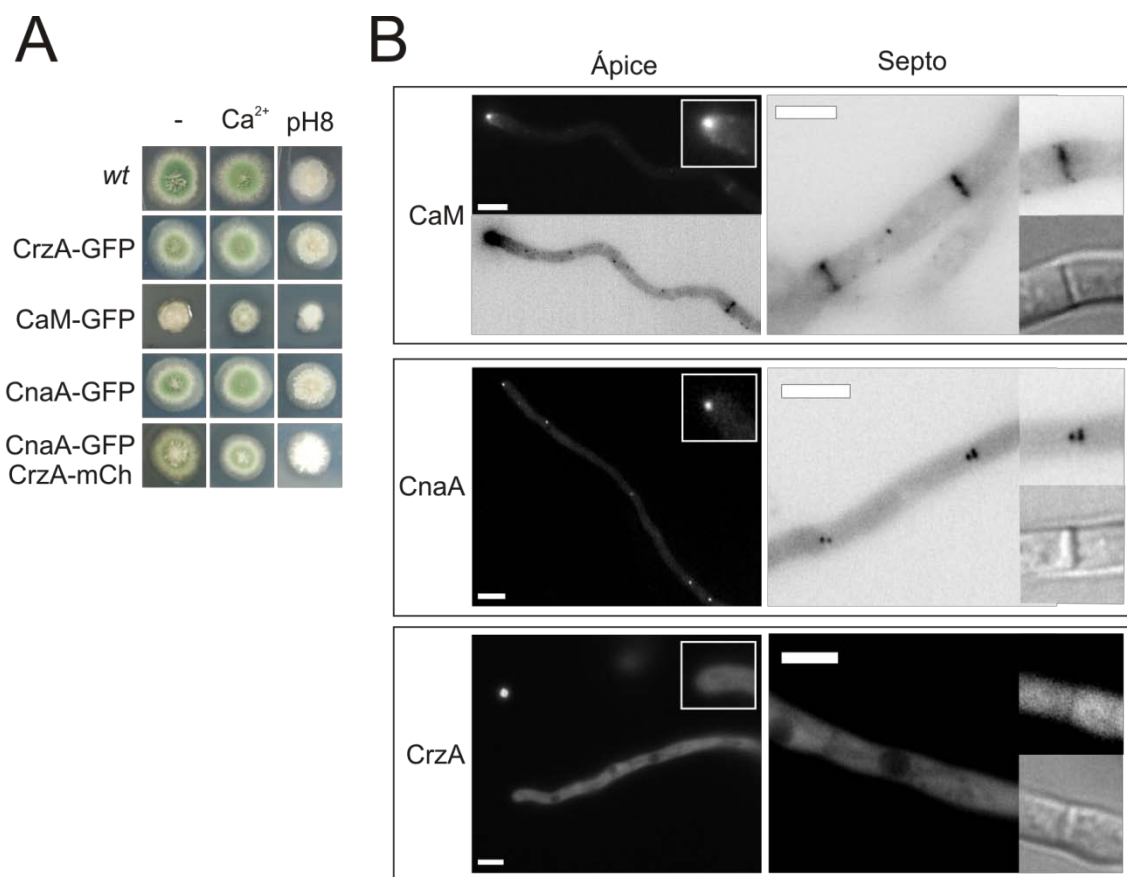
Ambas proteínas, calcineurina y calmodulina, se encuentran conservadas en los eucariotas y han sido ampliamente estudiadas en diferentes organismos. En *A. nidulans* la calmodulina muestra una distribución polarizada con una mayor acumulación de proteína en el ápice de las hifas además de encontrarse en los septos (Chen *et al.* 2010; Wang *et al.* 2006). La localización de la calcineurina en *A. nidulans* no ha sido descrita sin embargo la proteína homóloga en *A. fumigatus* muestra una localización similar, es decir, mayor presencia de fosfatasa en los septos y en la punta de las hifas (Juvvadi *et al.* 2008; Juvvadi *et al.* 2011). Dado que la localización de CrzA se altera en presencia de estrés ambiental, se procedió a estudiar la respuesta de estas proteínas señalizadoras frente a los estímulos.

Para este análisis se emplearon cepas que expresaban quimeras fluorescentes de la calmodulina, CaM, o de la subunidad catalítica de la calcineurina, CnaA. Así, se procedió a generar

un casete de reemplazamiento génico que codificaba para la quimera CaM-GFP mediante la fusión del epítipo GFP al extremo C-terminal de la proteína (apartado 4.1 de Materiales y métodos). El casete de DNA se empleó en la transformación de la cepa MAD1425 y tras el análisis por “Southern blot” se continuó el análisis con la cepa MAD4310.

La obtención de la cepa que expresaba la quimera fluorescente CnaA-GFP, MAD4366, fue descrita en el apartado 2.2 cuando fue necesaria su obtención para el ensayo de PD. Sin embargo, para este experimento se generó una cepa doble mutante que expresaba la proteína CnaA-GFP y una nueva forma quimérica de CrzA etiquetada en el extremo C-terminal con el epítipo mCherry. Esta nueva cepa, MAD4522, se obtuvo reemplazando el locus *crzA* con el casete de DNA que portaba el alelo mutante en la cepa receptora MAD4366.

La funcionalidad de las quimeras se comprobó mediante el análisis fenotípico de las cepas portadoras de los alelos mutantes MAD4310 (CaM-GFP), MAD4366 (CnaA-GFP) y MAD4522



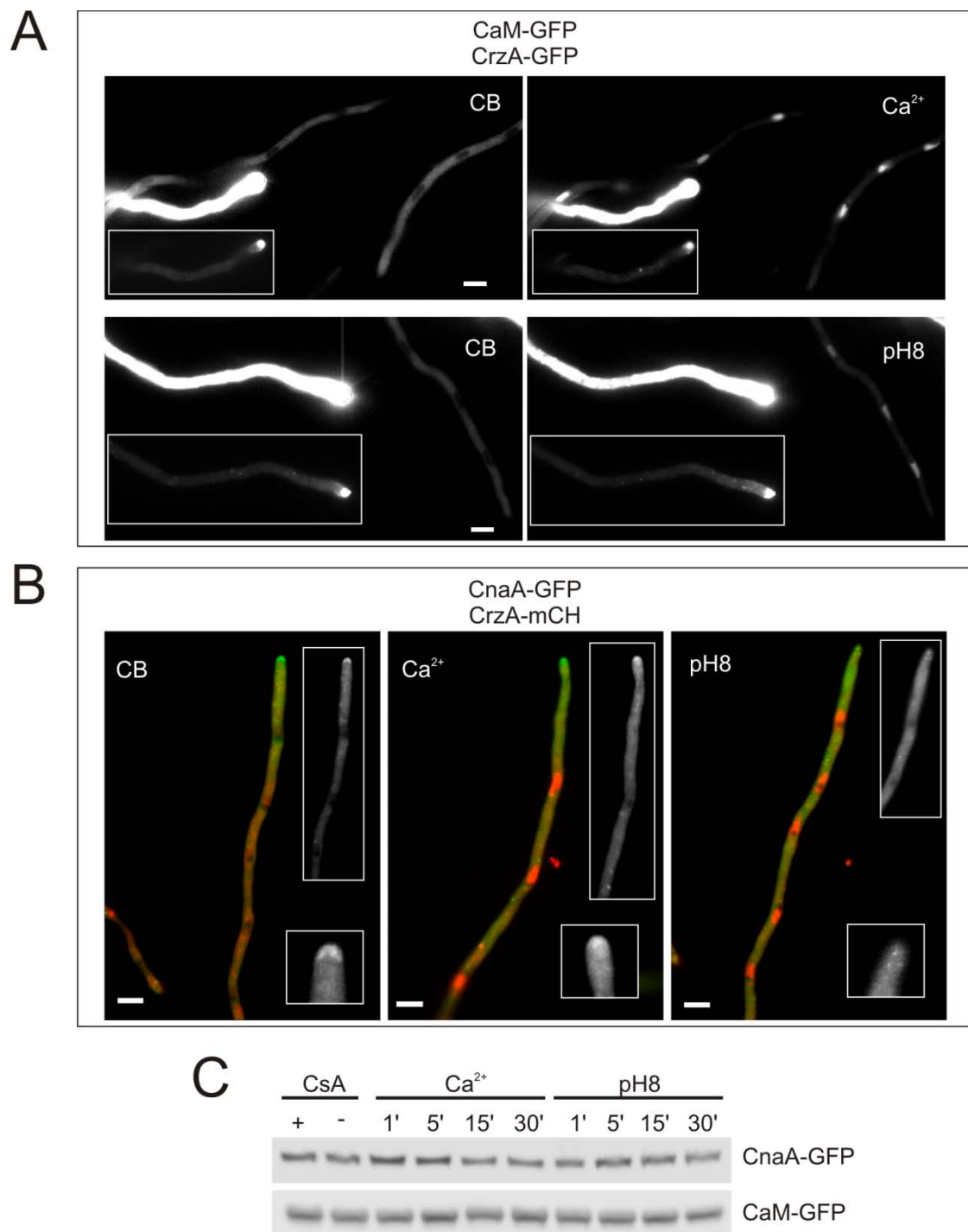
**Figura R30: Estudio de las proteínas señalizadoras calmodulina y calcineurina. A)** Análisis fenotípico de cepas portadoras de proteínas de fusión de CaM, CnaA y CrzA a epítipos fluorescentes. Se determinó la capacidad de formar colonias por las diferentes cepas sobre MMA (-), MMA alcalino (pH8; 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) o en MMA conteniendo 50mM de CaCl<sub>2</sub>. Las imágenes se tomaron a cultivos celulares de 48 horas a 37°C. **B)** Localización celular de CaM, CnaA y CrzA. Las diferentes imágenes muestran la distribución de la fluorescencia por el citoplasma la hifa. Ampliaciones de las imágenes muestran con más detalle la zona del ápice y algunos septos y núcleos. Se muestran imágenes en contraste invertido e imágenes tomadas con óptica Nomarski para facilitar la visualización de los septos. Cepas MAD1425, MAD3021, MAD4310, MAD4366 y MAD4522. Barra de escala: 5µm.

(CnaA-GFP; CrzA-mCH). Á pesar de que la cepa MAD4310 mostró una disminución del crecimiento sobre medio sólido, toleró la presencia de elevadas concentraciones de calcio y la alcalinización del medio (Figura R30-A). Tanto la quimera CnaA-GFP como CrzA-mCH conservaron la funcionalidad ya que no causaron alteraciones en el crecimiento de las cepas MAD4366 y MAD4522 en presencia de estrés por calcio y pH alcalino (Figura R30-A).

A continuación se procedió al análisis microscópico de las cepas portadoras de estas construcciones en condiciones basales de crecimiento. Como se muestra en la figura R30-B, tanto CaM-GFP como CnaA-GFP dieron lugar a una mayor acumulación de fluorescencia en la punta y en los septos de las hifas. A diferencia de la proteína CrzA-GFP, no se observó exclusión nuclear de CaM o de CnaA en las cepas MAD4310 y MAD4522, respectivamente, en ausencia de estrés (Figura R30-B).

Para estudiar si el estrés abiótico promueve alteraciones en la localización celular de la calmodulina o de la calcineurina, se analizó la respuesta de estas proteínas en presencia de calcio o pH alcalino. Con el fin de obtener un control interno en el ensayo de estrés, se visualizó la respuesta de CrzA junto con la proteína objeto de estudio. En el caso de la calmodulina, se incubaron conjuntamente células de las cepas MAD4310 y MAD3021 en el medio WMM suplementado con los requerimientos de ambas estirpes. La adición del calcio o la elevación del pH del medio no desencadenaron cambios en la distribución celular de CaM mientras que CrzA respondió a los estímulos de la forma habitual (Figura R31-A). El análisis microscópico de la cepa MAD4522 permitió visualizar simultáneamente la localización de CnaA-GFP y CrzA-mCH en las diferentes condiciones de cultivo. Mientras que el calcio no alteró la respuesta de CnaA, la alcalinización del medio causó una disminución de la fluorescencia acumulada en la punta debida a la quimera CnaA-GFP (Figura R31-B).

Dado que la visualización en el microscopio no reveló ninguna alteración en la localización de la calmodulina o de la calcineurina, se procedió a analizar la señalización de estas proteínas a nivel molecular. Así, después de la incubación del micelio de las cepas MAD4310 y MAD4366 en condiciones basales de crecimiento y con los tratamientos estandarizados de estrés y de inhibición con CsA, se siguió el método VFAL de extracción de proteínas (Figura R3 de la Sección I de Resultados). Tras la inmunodetección con el anticuerpo  $\alpha$ -GFP de los respectivos WB no se detectaron modificaciones postraduccionales de las quimeras CaM-GFP y CnaA-GFP en respuesta a los estímulos analizados (Figura R31-C). Por lo tanto, las proteínas señalizadoras, calmodulina y calcineurina, no responden al estrés ambiental mediante alteraciones a nivel molecular o celular similares a las que manifiesta CrzA.

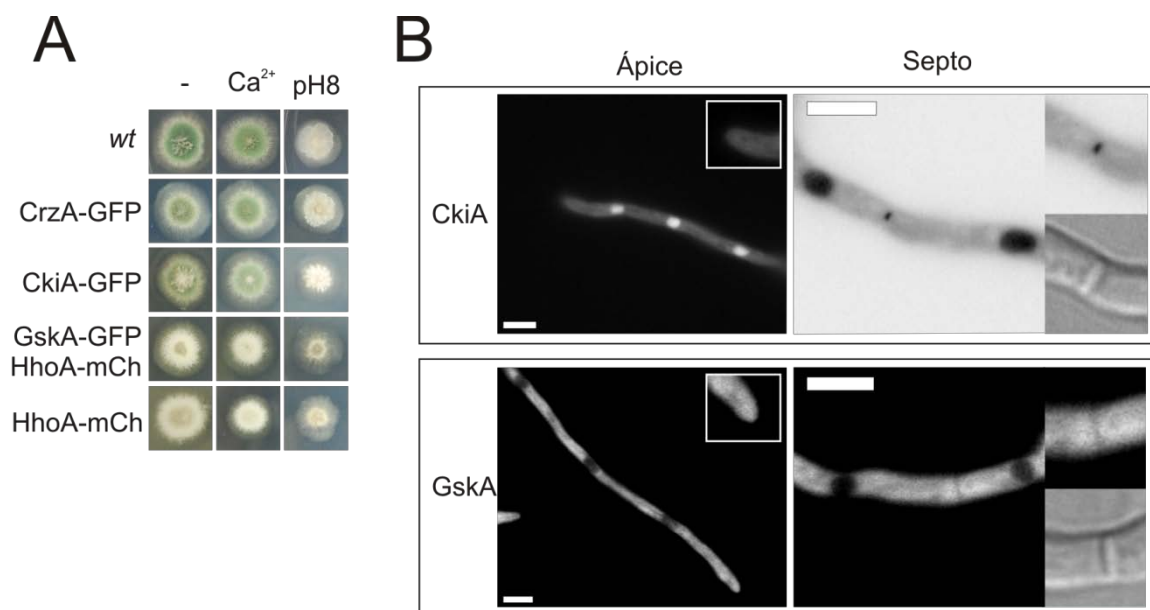


**Figura R31: Análisis de la respuesta a estrés ambiental de CaM y CnaA.** **A)** Visualización de la localización celular de las quimeras fluorescentes CaM-GFP, por la cepa MAD4310, y CrzA-GFP, por la cepa MAD3021, tras la inducción de estrés. Se muestran imágenes tomadas con sobreexposición de la distribución de la fluorescencia en las hifas que expresan la quimera CaM-GFP. En el recuadro en cada fotograma se muestra la imagen de la hifa con menor exposición. **B)** Visualización de la fluorescencia emitida por las células de la cepa MAD4522, que expresan las proteínas CnaA-GFP y CrzA-mCh, y su localización celular tras la inducción de estrés. Se muestra en la fusión de imágenes el canal GFP en verde y el canal que visualiza mCh en rojo. Los recuadros de cada fotograma corresponden a la fluorescencia emitida por CnaA-GFP a lo largo de la hifa y la ampliación que muestra en más detalle la punta de la hifa. En los paneles A) y B) CB indica condiciones basales; pH8 medio tamponado con 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Ca<sup>2+</sup>, medio al que se le ha añadido 50mM CaCl<sub>2</sub>. Barra de escala: 5µm. **C)** Análisis por WB de extractos VFAL del micelio de las cepas MAD4310 y MAD4522 tras la incubación del micelio con CsA, calcio (Ca<sup>2+</sup>) o alcalinización del medio (pH8). No se detectan cambios en la movilidad electroforética de CnaA o CaM. Se emplearon geles comerciales en gradiente de SDS-poliacrilamida 4–15% y el anticuerpo α-GFP.

## 7.2. Estudio de las quinasas CkiA y GskA en respuesta a estrés.

Dado que las quinasas CkiA y GskA juegan un papel importante en la modificación postraduccional de CrzA, se procedió a analizar la respuesta de estas proteínas al estrés ambiental. Para este estudio se visualizó en el microscopio de fluorescencia la distribución celular de las quimeras CkiA-GFP y GskA-GFP.

Recientemente se ha descrito la localización tanto citoplásmica como nuclear de CkiA en condiciones basales de crecimiento (Apostolaki *et al.* 2012). Con el fin de analizar la respuesta de esta quinasa a estrés ambiental se empleó la cepa que expresaba la proteína CkiA-GFP (MAD4633), cedida por el Dr. C. Scazzocchio. El análisis fenotípico de esta cepa mostró la tolerancia al crecimiento sobre medio sólido en presencia de calcio o pH alcalino (Figura R32-A). Como se muestra en la figura R32-B, la distribución de CkiA en condiciones basales fue la misma que había sido descrita previamente, es decir, distribuida tanto en el citoplasma como acumulada en los núcleos. No obstante, mientras que no se detectó a CkiA en el ápice de las hifas, se observó su presencia en los septos como pequeñas acumulaciones en la región central de los mismos (Figura R32-B).



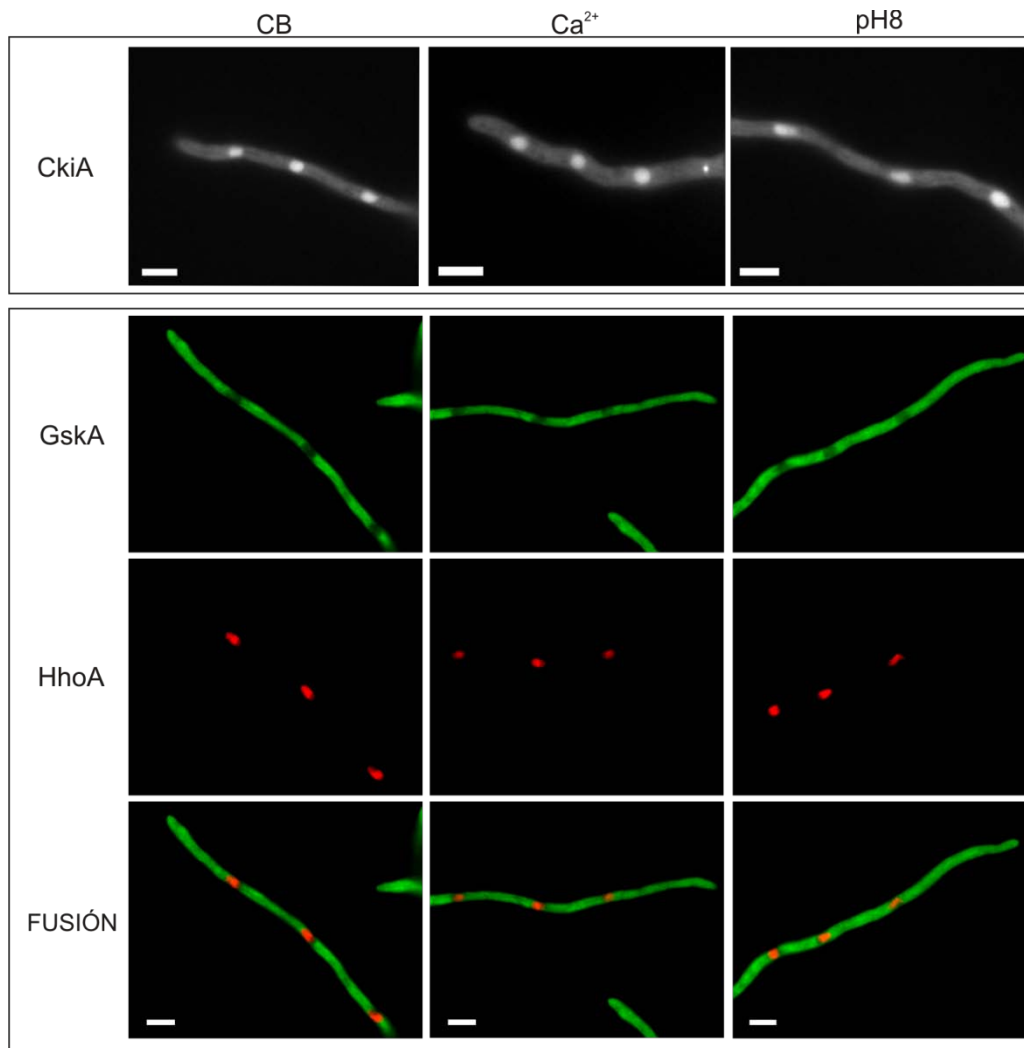
**Figura R32: Estudio de las quinasas CkiA y GskA. A)** Análisis fenotípico de cepas portadoras de proteínas de fusión de CkiA, GskA y HhoA a epítopos fluorescentes. Esporas de cada cepa analizada se inocularon puntualmente sobre MMA (-), MMA suplementado con 50mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o tamponado a pH alcalino con 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH8). Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y se fotografió la colonia formada en cada condición. **B)** Visualización de las formas etiquetadas de CkiA y GskA. Las diferentes imágenes muestran la distribución citoplásmica de la fluorescencia por la hifa y ampliaciones que muestran con más detalle el ápice, los septos y los núcleos. Se muestran imágenes en contraste invertido e imágenes tomadas con óptica Nomarski para facilitar la visualización de los septos. Cepas MAD1425, MAD3021, MAD4633, MAD4643 y MAD2446. Barra de escala: 5µm.

Por el contrario, la localización de GskA no había sido analizada por lo que se procedió a la generación de una cepa de *A. nidulans* que expresaba la quimera GskA fusionada en su extremo C-terminal a GFP, GskA-GFP. El casete de reemplazamiento génico se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito en ocasiones anteriores (apartado 4.1 de Materiales y métodos). En esta ocasión se optó por usar a la cepa MAD2446 como receptora del casete de DNA lo que permitiría la visualización de los núcleos mediante la fluorescencia emitida por la quimera histona H1-mCherry, HhoA-mCh. Tras la purificación a homocariosis de los transformantes se continuó el estudio con la cepa MAD4643.

El etiquetado de GskA con GFP permitió mantener la funcionalidad de la proteína dado que el crecimiento colonial en medio sólido de la cepa portadora de dicha construcción, MAD4643, fue similar al de la cepa parental MAD2446 (Figura R32-A). Tanto el estrés por calcio como la alcalinización del medio fueron tolerados por las cepas MAD2446 y MAD4643 (Figura R32-A). A diferencia de CkiA, el análisis microscópico de la cepa MAD4643 reveló la exclusión nuclear de GskA en condiciones basales de crecimiento (Figura R32-B). Tampoco se visualizó la acumulación de fluorescencia de esta quinasa en los septos ni en el ápice de las hifas (Figura R32-B).

Finalmente se procedió al análisis microscópico de las cepas portadoras de las quinasas fluorescentes en condiciones de estrés. La incubación de las células de la cepa VIE172 en presencia de calcio o medio alcalino no reveló una alteración en la distribución de CkiA, mostrando su localización en núcleos, citoplasma y septos como en las condiciones basales de crecimiento (Figura R33). Asimismo, no se observó una respuesta de la quinasa GskA tras la inducción de estrés alcalino o por calcio (Figura R33). En la figura R33 se muestran los paneles correspondientes a la fluorescencia emitida por la quinasa GskA en el canal verde y por la histona HhoA en el rojo, así como la imagen de la fusión de ambas imágenes en la que no se detectó colocalización de ambas proteínas en ninguna de las condiciones analizadas.

Por lo tanto, las quinasas CkiA y GskA muestran una localización en la célula prácticamente opuesta entre sí y no alteran dicha distribución en respuesta a los estreses estudiados en este trabajo y de interés para la ruta de señalización de CrzA. El conjunto de resultados pone de manifiesto que las mayores modificaciones a nivel molecular y celular en respuesta al estrés se producen en el efector final de la cascada de señalización, es decir, el FT CrzA.



**Figura R33: Análisis de la respuesta a estrés ambiental de CkiA y GskA.** Las quinasas CkiA y GskA no modifican su localización en respuesta a los estímulos analizados. Panel superior: visualización de la fluorescencia emitida por CkiA-GFP en las células de la cepa MAD4633, tras la inducción de estrés. Panel inferior: visualización de la fluorescencia emitida por las células de la cepa MAD4643, que expresan las proteínas GskA-GFP y HhoA-mCh, tras la inducción de estrés. La fusión de imágenes se muestra teñida en verde (GFP) y rojo (mCh). CB, condiciones basales; pH8, 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Ca<sup>2+</sup>, 50mM CaCl<sub>2</sub>. La fusión de imágenes se muestra teñida en verde (GFP) y rojo (mCh). Barra de escala: 5µm.

## **RESULTADOS: SECCIÓN III**

### **Regulación génica en respuesta al estrés**



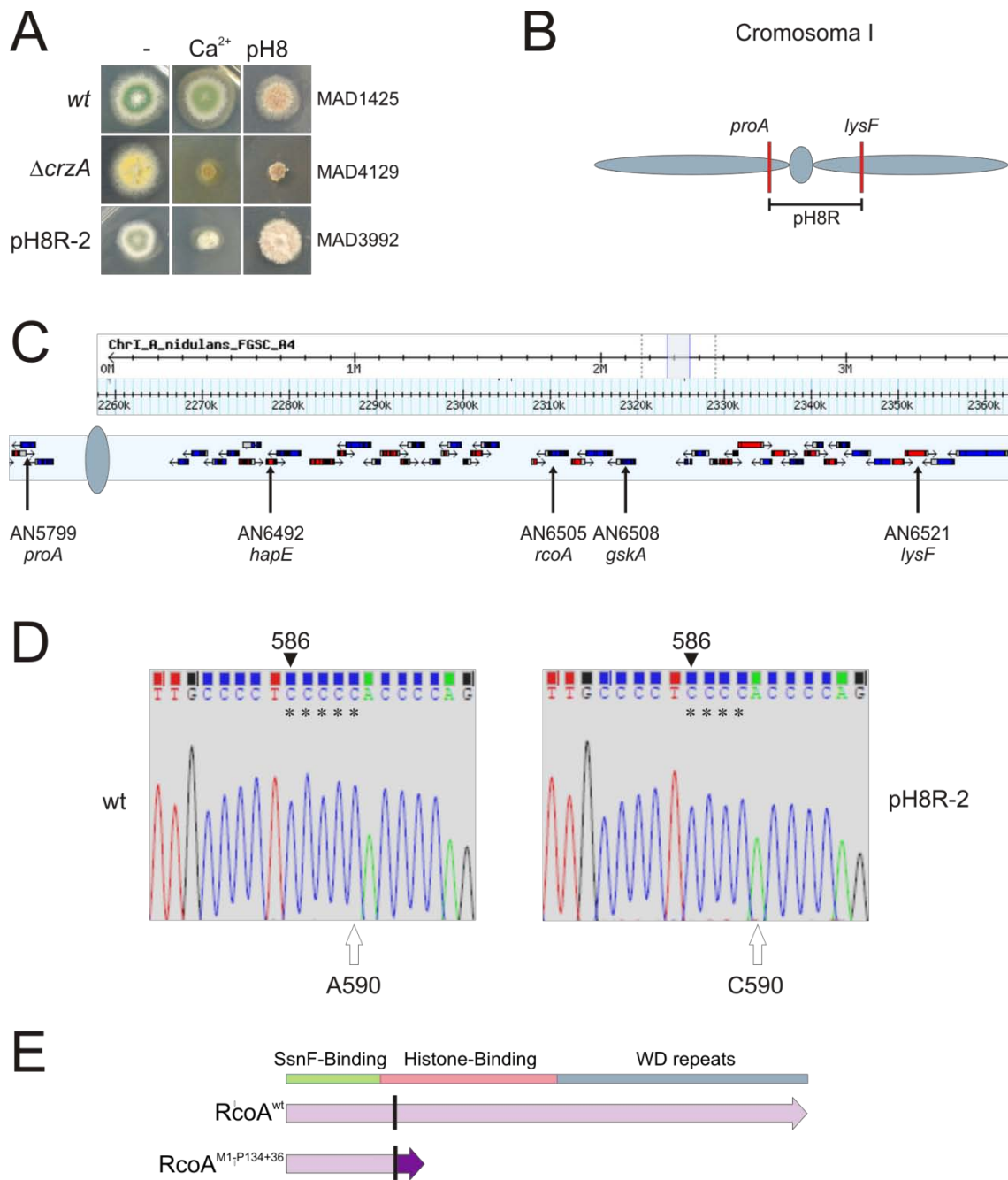
## 1. Regulación génica en la respuesta al estrés alcalino.

### 1.1. Mutaciones supresoras de resistencia a pH alcalino.

El análisis funcional de CrzA realizado en la Sección I de Resultados puso de manifiesto el fenotipo de sensibilidad al calcio o la alcalinización del medio mostrado por las cepas mutantes de pérdida de función en este factor transcripcional. El tiempo de incubación en todo estos ensayos de sensibilidad fue siempre de aproximadamente 48 horas a 37°C. La prolongación de este tiempo estándar de incubación de una cepa  $\Delta crzA$  sobre medio alcalino permitió obtener sectores a partir del inóculo inicial que mostraban una notable mejora del crecimiento radial y de conidiación. La aparición de estos sectores sugería la adaptación del hongo a las condiciones del medio a través de la selección de mutaciones supresoras en *trans* que compensaran el fenotipo de sensibilidad. Estos supresores podrían ser una herramienta útil y su estudio permitiría la identificación de elementos adicionales implicados en la respuesta de adaptación al pH alcalino por CrzA, por lo que se decidió analizar la naturaleza de las mutaciones. La caracterización de estas cepas con mutaciones supresoras de sensibilidad a pH alcalino en un fondo genético  $\Delta crzA$  se realizó en colaboración con el Prof. H. Arst.

Se realizaron una serie de inóculos puntuales de esporas de una cepa  $\Delta crzA$ , (cepa A249 de la colección de cepas del Prof. H. Arst o MAD4129 de la colección del laboratorio de Madrid), sobre medio sólido tamponado a pH8 con 100 mM de  $Na_2HPO_4$  e incubando a 37°C durante un periodo de 5 a 7 días. Los sectores de mayor crecimiento que aparecieron se purificaron a homocariosis. Seguidamente se analizó la resistencia a calcio y a pH alcalino de las nuevas cepas mutantes. Se obtuvieron mutantes de dos clases principalmente, aquellos que mostraron un fenotipo de resistencia a ambos estímulos y otros que sólo mostraron supresión a la sensibilidad a la alcalinización del medio. En este trabajo se decidió continuar sólo con aquellas mutaciones que fuesen específicas de la señalización del pH alcalino y no de mutaciones de adaptación general. Así se seleccionó para su análisis la cepa A547 de la colección de cepas del Prof. H. Arst o MAD3992 de la colección del laboratorio de Madrid, que manifestó tolerancia al pH alcalino y sensibilidad al calcio similar a la cepa parental  $\Delta crzA$  y fue designada con el nombre pH8R-2 (**pH8 Resistant, mutant 2**) (Figura R34-A).

Usando técnicas de genética clásica aprovechando los ciclos reproductivos parasexual y sexual de *A. nidulans* (Pontecorvo *et al.* 1953) se determinó en el laboratorio del Prof. H. Arst la localización cromosómica de la mutación pH8R-2. Mediante el ciclo de vida parasexual, donde existe intercambio genético entre dos cepas sin existir recombinación entre cromosomas, o con



**Figura R34: Identificación de la mutación responsable del fenotipo de resistencia a pH alcalino de una cepa *crzA* nula.** **A)** Análisis fenotípico de la cepa silvestre y cepas portadoras del alelo *crzA* nulo en un fondo genético silvestre o en combinación con la mutación pH8R-2. Esporas de cada cepa analizada se inocularon puntualmente sobre MMA (-), MMA suplementado con 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o tamponado a pH alcalino con 100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH8). Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y se fotografió la colonia formada en cada condición. **B)** Dibujo que representa el cromosoma I de *A. nidulans* y la localización de la mutación pH8R-2 entre los loci de *proA* y *lysF*. **C)** Representación gráfica de la anotación genómica en la región entre los loci AN5799 y AN6521 del cromosoma I. Se indica la localización de los loci candidatos analizados. **D)** Comparativa de los cromatogramas de secuenciación de la región genómica locus AN6505 de una cepa silvestre y una mutante pH8R-2 donde se localizó la alteración en la secuencia de nucleótidos. Los asteriscos marcan la zona rica en citosinas que está alterada, la punta de flecha indica la posible citosina delecionada (ante la imposibilidad de saber exactamente cuál ha sido eliminada se eligió la primera de ellas) y la flecha señala el cambio en la fase de lectura que se produce a partir de la posición 590 del gen *rcoA*. **E)** Representación esquemática de la CDS del gen *rcoA* expresado en una cepa silvestre,  $\text{RcoA}^{\text{wt}}$ , o del alelo *rcoA1* en la cepa pH8R-2,  $\text{RcoA}^{\text{M1-P134+36}}$ . El cambio en la intensidad de color morado representa los residuos alterados tras el cambio en la fase de lectura. En la parte superior se muestran los dominios que conforman la proteína RcoA. El rectángulo verde representa el dominio de interacción con el correpressor SsnF, el rectángulo rosa, el dominio de unión a las histonas H3 y H4, y el rectángulo azul, las repeticiones WD.

una muy baja probabilidad debido a sobrecruzamientos mitóticos, se realizó el estudio para la localización cromosómica de pH8R-2. Para ello se usaron cepas denominadas “master strains” que contenían un marcador fácilmente seleccionable en cada uno de los ocho cromosomas del hongo. El análisis de ligamiento de las cepas diploides permitió asociar la localización de la mutación pH8R-2 al cromosoma I. Con el fin de delimitar la región del cromosoma I donde se encontraba el locus con la mutación pH8R-2, se procedió al cruce de cepas que contenían diferentes marcadores genéticos en el cromosoma I. Así, mediante el ciclo reproductivo sexual del hongo se localizó la mutación pH8R-2 entre los genes *proA* (locus AN5799) y *lysF* (AN6521) situados a ambos lados del centrómero del cromosoma I (Figura R34-B).

Una vez delimitada la región en la que se encontraba la mutación, se procedió a la identificación del gen implicado en la resistencia a pH alcalino de la cepa MAD3992 mediante el análisis del mapa genético y genómico de la región comprendida entre los marcadores *proA* y *lysF*. Dado que el gen *proA* está tan próximo al centrómero se procedió al análisis del brazo derecho del cromosoma I (entre el centrómero y el locus de *lysF*). Esta zona del cromosoma I contiene 42 loci anotados en una región de aproximadamente 95kb (Figura R34-C).

Con el fin de identificar el locus donde se localiza la mutación pH8R-2, se procedió a verificar la secuencia de los genes candidatos cuya expresión alterada pudiese dar lugar a la tolerancia al estrés alcalino. Para ello se amplificó por PCR los casetes de DNA de los loci candidatos tanto de la región CDS como de las regiones 5' y 3' UTR flanqueantes a partir del DNA genómico de las cepas silvestre (MAD1427),  $\Delta$ *crzA* (MAD4129) y pH8R-2 (MAD3992). Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron utilizando diferentes oligonucleótidos complementarios a la secuencia pronosticada en la base de datos.

Entre los 42 loci situados en la zona de interés se localizó al locus AN6508, que como ya se indicó en la Sección I de resultados, codifica para la proteína homóloga de Gsk3p/Rim11p/Mds1p de *S. cerevisiae*, GskA en *A. nidulans*. Dado su demostrado papel en la señalización de CrzA, parecía un buen candidato para portar la mutación pH8R-2. Sin embargo no se encontraron diferencias en la secuencia de este locus en la cepa mutante pH8R-2 respecto a las cepas control.

El siguiente gen analizado fue el correspondiente al locus AN6492, denominado *hapE*. El producto de este gen, HapE, es el homólogo de Hap5p de *S. cerevisiae* y forma parte del complejo HAP. Su función como regulador positivo o negativo de la transcripción podría estar relacionada con la adaptación al estrés alcalino. La secuenciación de este gen no reveló ningún cambio respecto a las cepas control.

La búsqueda de un nuevo candidato nos hizo prestar la atención al locus AN6505, *rcoA*, que codifica para la proteína RcoA, perteneciente a la familia de proteínas con repeticiones WD. La formación de un tetrámero de Tup1p, homólogo en *S. cerevisiae* de RcoA, con una molécula de Ssn6p (cuyo homólogo en *A. nidulans* es SsnF) da lugar a la formación de un complejo que actúa sobre la organización de la cromatina reprimiendo la transcripción. De nuevo, la relación de RcoA con la regulación de los procesos de transcripción sugería su participación en la tolerancia al pH alcalino por lo que se procedió a verificar su secuencia. Así, el análisis de este locus permitió detectar un cambio en la secuencia nucleotídica del DNA genómico de la cepa pH8R-2 (MAD3992) respecto al DNA genómico de la cepa parental  $\Delta crzA$  (MAD4129) y de la cepa silvestre (MAD1427). La comparación de secuencia del DNA genómico de la cepa MAD3992 frente a la secuencia del genoma de *A. nidulans* disponible en la base de datos Genbank de la plataforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) permitió la identificación de la delección de la citosina en posición 586 del gen *rcoA* (Figura R34-D). Asimismo, la secuenciación de otro descendiente procedente del cruce de la cepa parental pH8R2 (cepa MAD3991 de la colección de Madrid o A477 de la colección del Prof. H. Arst) permitió la detección de la mutación en la misma posición del genoma. Por lo tanto, la mutación pH8R-2 se sitúa en el locus AN6505 correspondiente al gen *rcoA*, y se ha designado a este nuevo alelo mutante como *rcoA1*.

La mutación *rcoA1* origina un cambio en la fase de lectura de la región codificante a partir de la posición 590 del gen causando la aparición de un codón de parada temprano. La proteína mutante RcoA1 mantendría su estructura primaria hasta la prolina 134 seguida de 36 aminoácidos antes del final de la traducción, RcoA(M1-P134+36). Esta forma mutante RcoA1 conservaría íntegramente el dominio de interacción al correpresor SsnF mientras que se produciría la eliminación parcial del dominio de unión a las histonas H3 y H4 y la pérdida total de las repeticiones WD (Hicks *et al.* 2001)(Figura R34-E).

### **1.2. Segunda selección de mutantes pH8R, aislamiento de un nuevo alelo mutante *rcoA*.**

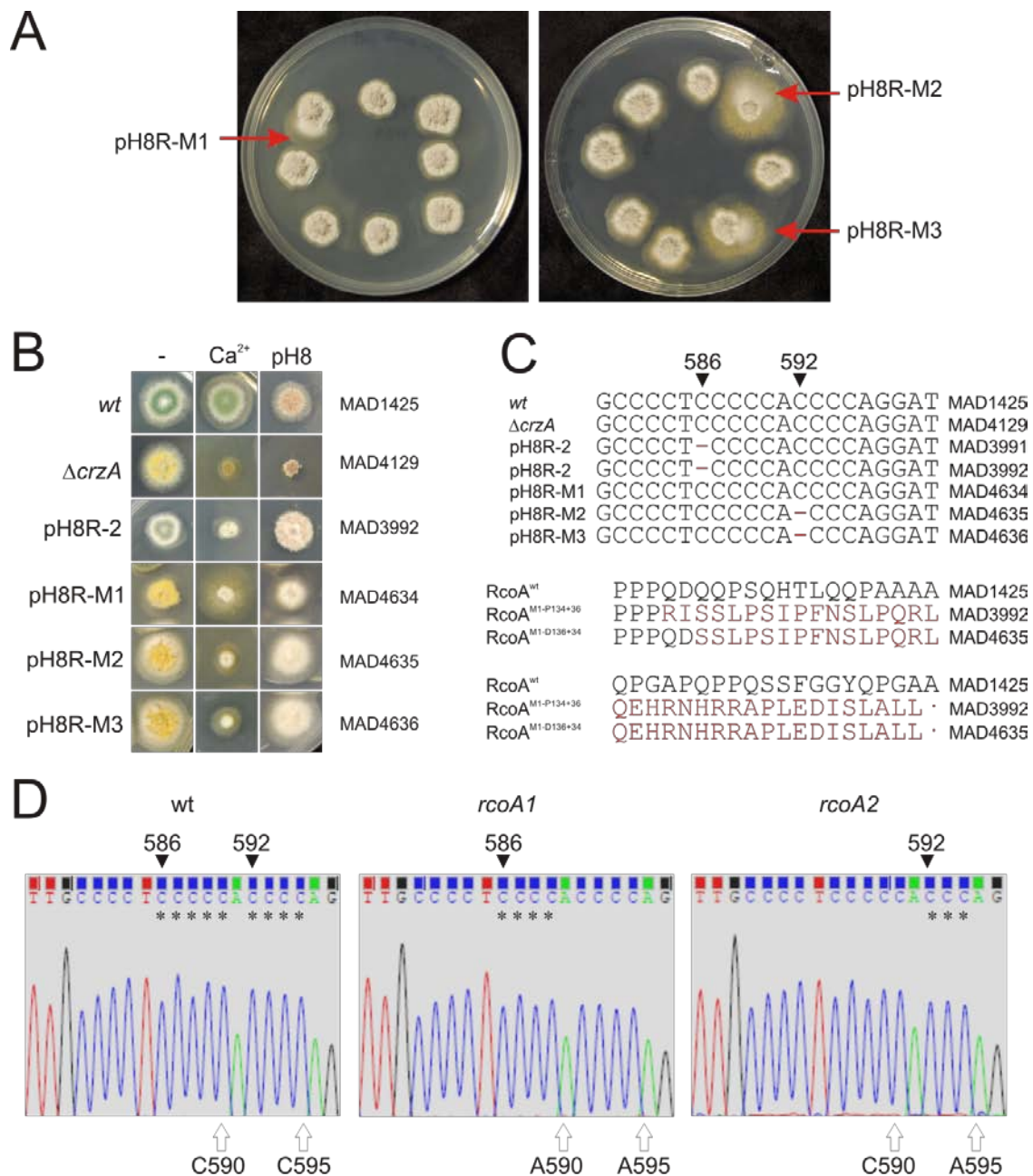
Para valorar si la mutación en *rcoA* se debía a un suceso aislado o se producía una selección a favor de esta alteración en la tolerancia a estrés alcalino de una cepa  $\Delta crzA$ , se repitió el proceso de generación de cepas supresoras a pH alcalino.

Para ello se siguió la misma estrategia de obtención de sectores de crecimiento a pH alcalino mediante el inóculo puntual de esporas de la cepa  $\Delta crzA$  MAD4129. En este experimento se obtuvieron 3 supresores con capacidad de tolerar la alcalinidad y que fueron denominados pH8R-M1, pH8R-M2 y pH8R-M3 (**pH8 Resistant, Madrid, mutante 1, 2 y 3, respectivamente**)

(Figura R35-A). Como se muestra en la Figura R35-A, los mutantes pH8R-M2 y pH8R-M3 mostraron una capacidad de esporulación profusa mientras que pH8R-M1 mostró una menor capacidad. Tras la purificación a homocariosis, se realizó el análisis fenotípico de los mutantes supresores pH8R-M1, pH8R-M2 y pH8R-M3, cepas MAD4634, MAD4635 y MAD4636 respectivamente. A pesar de que las tres cepas mostraron resistencia al pH alcalino del medio, la sensibilidad al calcio se mantuvo en las cepas pH8R-M2 y pH8R-M3 mientras que la cepa pH8R-M1 mostró una mayor tolerancia que las anteriores a este catión (Figura R35-B).

Para la caracterización de las mutaciones no se realizó el mapeo genético e identificación de loci candidatos en las cepas supresoras y se procedió directamente al análisis de la secuencia del locus AN6505, *rcoA*. Empleando los oligonucleótidos específicos diseñados previamente, se amplificó el fragmento de DNA correspondiente al gen *rcoA* a partir del DNA genómico de las cepas MAD4634, MAD4635 y MAD4636. La secuenciación de este gen en la cepa MAD4634 no reveló ningún cambio respecto a la cepa silvestre, de modo que la supresión en pH8R-M1 se debía a una mutación extragénica a *rcoA*. Sin embargo, tanto en MAD4635 como en MAD4636 se detectó la modificación de la secuencia nucleotídica de *rcoA* en una región próxima a la descrita anteriormente (Figura R35-C). A este nuevo alelo se le ha designado como *rcoA2*. Así, en ambos alelos mutantes *rcoA* se ha producido la delección de una citosina con tan solo 5 pares de bases de distancia. Ambos alelos mutantes dan lugar a un cambio de fase de lectura y terminación temprana de la traducción (Figuras R35-C y R35-D). En *rcoA2* la secuencia de aminoácidos nativa se mantiene hasta el aspártico en posición 136 y tras el cambio de fase se continuó con la misma lectura que en el mutante *rcoA1*, incorporándose en este caso una cadena de 34 aminoácidos antes del final de la traducción, RcoA(M1-D136+34).

Estos resultados ponen de manifiesto el papel de RcoA en la sensibilidad al pH alcalino de la cepa *crzA* nula y sugiere que la zona donde se han obtenido los cambios en la secuencia, rica en pares C+G, es un punto caliente para la selección de mutaciones en este gen.



**Figura R35: Análisis comparativo de cepas  $\Delta crzA$  resistentes a pH alcalino. A)** Aparición espontánea de sectores de resistencia a partir de cepas nulas de *crzA* en respuesta a la alcalinidad del medio extracelular. Las flechas señalan los sectores con capacidad de esporulación de la cepa MAD4129 sobre medio sólido tamponado a pH8 (100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Las imágenes de las colonias fueron tomadas tras su incubación a 37°C durante 6 días. **B)** Análisis fenotípico de la colección de cepas mutantes  $\Delta crzA$  nulo y resistentes al pH alcalino, pH8-R. Se determinó la capacidad de formar colonias por las diferentes cepas sobre MMA (-), MMA alcalino (pH8; 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) o en MMA conteniendo 50mM de CaCl<sub>2</sub>. Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y se fotografió la colonia formada en cada condición. **C)** Alineamiento de secuencia de bases del gen *rcoA* en la región donde se encontraron los cambios en la secuencia entre cepas silvestre y portadoras de mutaciones pH8-R. Las puntas de flecha señalan la posición de la mutación, indicada en cada caso con un guión rojo. En la parte inferior se muestra la región de interés del alineamiento de la CDS del gen *rcoA* expresado en una cepa silvestre, RcoA<sup>wt</sup>, en una cepa pH8R-2, RcoA<sup>M1-P134+36</sup>, o en una cepa pH8R-M2 o pH8R-M3, RcoA<sup>M1-D136+34</sup>. En negro se indica la predicción de la secuencia silvestre y en rojo la predicción de la secuencia alterada en cada caso. El punto rojo indica el codón de parada. **D)** Cromatogramas de secuenciación de la región genómica donde se localiza diferencia en el locus AN6505 entre las versiones alélicas *rcoA*<sup>wt</sup>, *rcoA1* y *rcoA2*. Los asteriscos marcan la zona rica en citosinas que está alterada, la punta de flecha indica la citosina delecionada y la flecha señala el cambio en la fase lectura que se produce a partir de la posición 590 o 595 del gen *rcoA* en las cepas pH8R: izquierda, secuencia *rcoA*<sup>wt</sup> de una cepa silvestre (MAD1425 o MAD4129); central, alelo mutante *rcoA1* de las cepas pH8R-2 (MAD3991 o MAD3992); derecha, alelo mutante *rcoA2* de cepas pH8R-M2 o pH8R-M3 (MAD4635 o MAD4636).

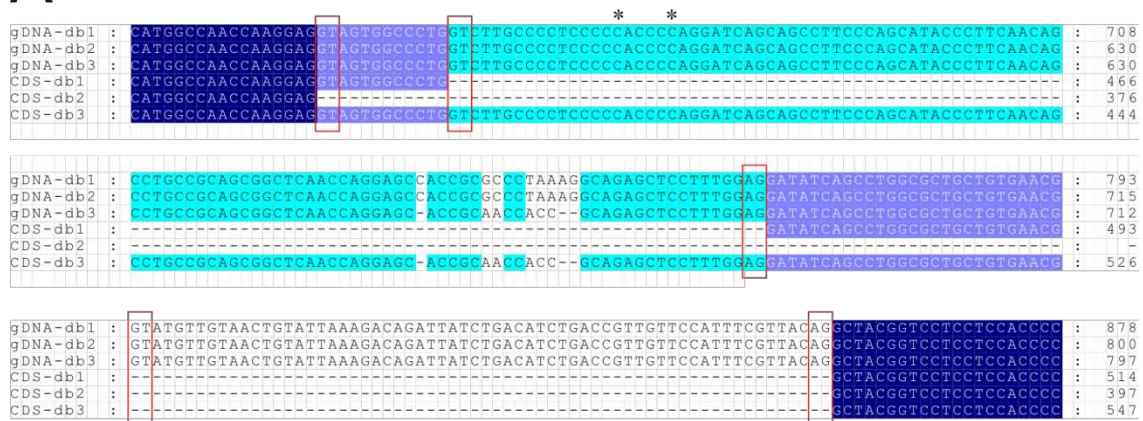
### 1.3. Caracterización del cDNA del locus AN6505.

Un análisis *in silico* en mayor profundidad de las secuencias codificantes del gen *rcoA* depositadas en las diferentes bases de datos consultadas mostró la presencia de discrepancias entre ellas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, <http://www.aspergillusgenome.org/>, [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html)). En función de la secuencia consultada, la región donde se habían identificado los cambios en los supresores había sido caracterizada en algunos casos como exónica y en otros como intrónica. Así, en el primer caso las mutaciones darían lugar a cambio de fase de lectura descrita en el apartado 1.1 (Sección III de Resultados) y en el segundo a una mutación silenciosa (Figura R36-A).

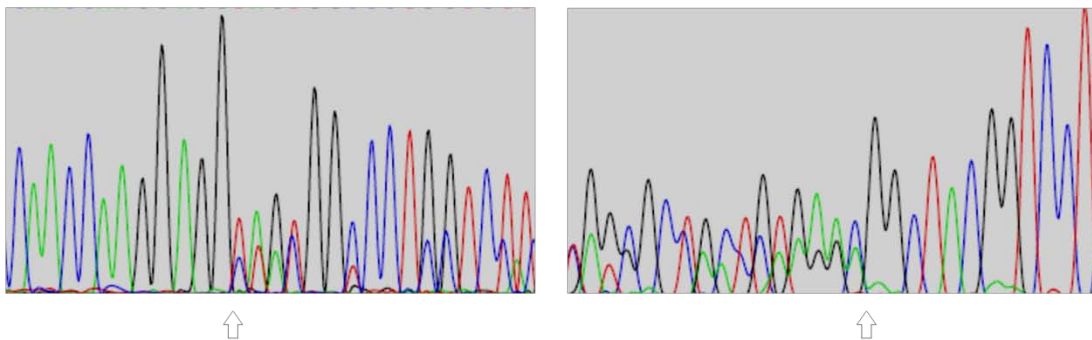
Con el fin de esclarecer cuál de estas predicciones era la correcta se procedió a la caracterización del cDNA de este locus. Para ello se aisló RNA total de una cepa silvestre, MAD1425, cultivada en condiciones basales de crecimiento, es decir, en medio mínimo suplementado con los requerimientos nutricionales de la cepa e incubada durante 18 horas a 37°C (apartados 4.5 de Materiales y métodos). A continuación se obtuvo una genoteca de cDNA según el procedimiento descrito en el apartado 4.6 de Materiales y métodos y se amplificó específicamente con técnicas estándar de PCR el cDNA de *rcoA* utilizando oligonucleótidos complementarios a secuencias 5' y 3' UTR del locus AN6505 próximas al inicio y final de traducción (ver Tabla M-3, Materiales y Métodos). El fragmento amplificado por PCR fue secuenciado mediante diferentes cebadores complementarios a regiones pronosticadas como exones para cualquiera de las bases de datos consultadas.

La interpretación de los diferentes cromatogramas tras la secuenciación del producto purificado de PCR puso de manifiesto la presencia simultánea de dos especies de cDNA en la muestra. Así, el cromatograma presentó una única lectura con picos únicos, bien separados y con poco ruido de fondo para la mayor parte de la secuencia nucleotídica. Sin embargo, en la región definida de forma contradictoria en las diferentes bases de datos consultadas se detectó un cambio en el perfil cromatográfico a consecuencia de una doble lectura de la muestra (Figura R36-B). La lectura en ambos sentidos de los picos cromatográficos permitió la interpretación de la presencia de un proceso de corte y empalme alternativo del RNA mensajero. Este procesamiento del RNA daría lugar a la eliminación de un fragmento de 213 bases (intrón I3A desde la posición 563 hasta la 776) o de un fragmento de 63 bases (intrón I3B desde la posición 713 hasta la 776, IB) Figura R36-C.

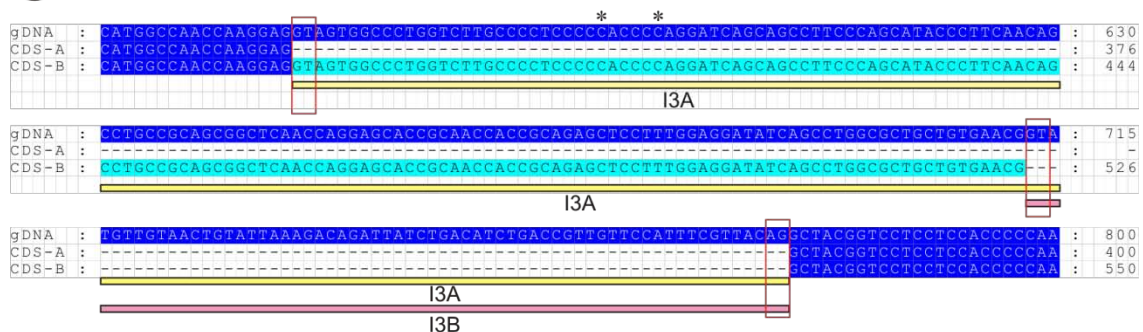
A



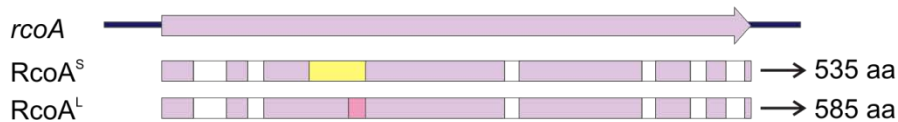
B



C



D



El análisis conjunto de los diferentes cromatogramas obtenidos tras el proceso de secuenciación y el alineamiento de secuencias del DNA genómico y cDNA de la cepa silvestre reveló la presencia de 8 exones y 7 intrones en el transcrito del gen *rcoA*, con un proceso de corte y empalme alternativo del tercer intrón (I3A e I3B) que daría lugar a la traducción de una proteína de 535 o de 585 aminoácidos (Figura R36-D). Estas dos formas de la proteína RcoA de aquí en adelante serán denominadas RcoA<sup>S</sup> y RcoA<sup>L</sup>, haciendo referencia a la versión del transcrito corta (S) que da lugar a la traducción de 535 aminoácidos o larga (L) de 585 (Figura R36-D).

**Figura R36: Procesamiento alternativo del transcrito de *rcoA*.** **A)** Alineamiento múltiple de secuencia de bases de DNA genómico y codificante depositadas en diferentes bases de datos: db1: <http://www.aspergillusgenome.org/>, db2: [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html), db3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Los rectángulos rojos marcan los sitios previstos de procesamiento de mRNA consenso GT-AG, indicándose en azul turquesa y azul claro las diferentes versiones de intrones pronosticadas. Los asteriscos señalan la posición de las citosinas ausentes en los alelos *rcoA1* y *rcoA2*. Las coordenadas se indican en la parte derecha del alineamiento. **B)** Cromatogramas de la secuenciación del cDNA de una cepa *rcoA* silvestre en la región con doble lectura. El panel de la izquierda muestra el cromatograma de la secuenciación de la región más próxima al extremo 5'UTR y el de la izquierda el de la región más próxima al extremo 3'UTR. La flecha señala el inicio de la doble lectura de la secuencia de nucleótidos. **C)** Alineamiento de secuencias de DNA genómico y especies de cDNA de una cepa *rcoA* silvestre, MAD1425. El rectángulo amarillo indica la alternativa A de procesamiento del intrón 3 del transcrito de *rcoA*, I3A, y el rectángulo rosa indica la alternativa B de procesamiento del intrón 3 del transcrito, I3B. Las citosinas ausentes en los alelos *rcoA1* y *rcoA2* se indican con asteriscos y las coordenadas de las secuencias se muestran en la parte derecha del alineamiento. **D)** Representación esquemática de las proteínas sintetizadas a partir de la traducción del transcrito con el intrón I3A, forma RcoA<sup>S</sup>, o del transcrito con el intrón I3B, forma RcoA<sup>L</sup>. El rectángulo amarillo indica el intrón I3A y el rectángulo rosa, el intrón I3B. A la derecha se muestra el número de aminoácidos de cada producto final.

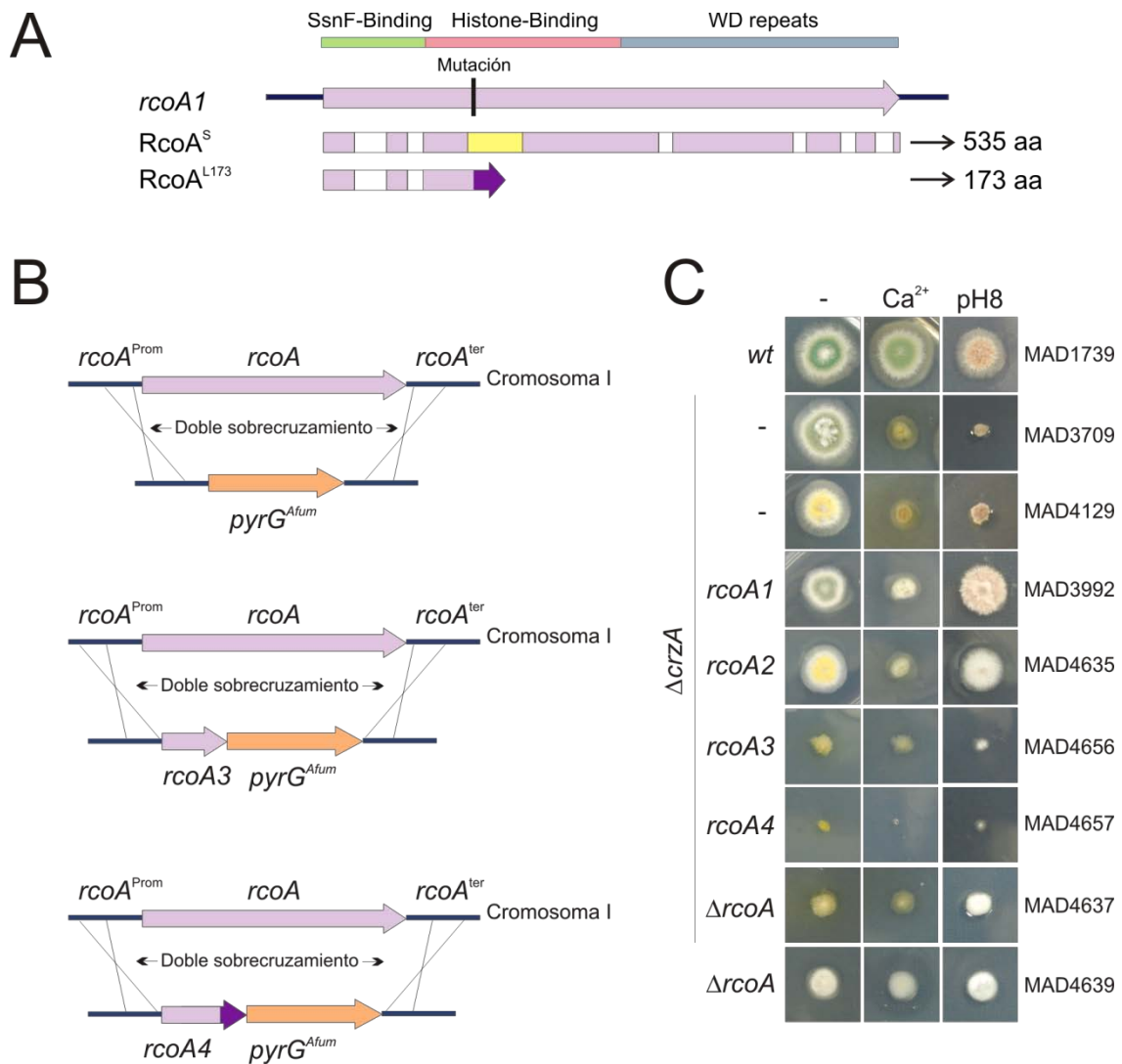
#### 1.4. Generación de cepas portadoras de alelos mutantes de *rcoA*.

Dado que las mutaciones detectadas en la secuenciación del locus AN6505 de las cepas mutantes pH8R-2, pH8R-M2 y pH8R-M3 se localizaban en la región que es susceptible de procesamiento alternativo del transcrito de *rcoA* estas estirpes mutantes podrían estar expresando simultáneamente formas truncadas, hasta el aminoácido 173 de RcoA<sup>L</sup> y formas completas de la proteína RcoA<sup>S</sup> (Figura R37-A). Dado que el truncamiento temprano de las mutaciones pH8R ocasiona la pérdida de aproximadamente el 70% de la secuencia aminoacídica de la proteína y la eliminación de los dominios funcionales de unión a las histonas y repeticiones WD (Figura R37-A), cabría esperar una pérdida de función del sistema represor basado en la regulación de la organización de la cromatina y que fuera ésta la causa de la supresión del fenotipo de sensibilidad al pH alcalino causado por la ausencia de CrzA.

Para probar esta hipótesis se procedió a generar cepas mutantes en las que se eliminó la expresión de RcoA. Para la construcción del alelo *rcoA* nulo se generó en primer lugar un casete que permitía el reemplazamiento génico de la CDS del locus *rcoA* utilizando la técnica de PCR de fusión (Figura R37-B, apartado 4.1 de Materiales y métodos). El casete de reemplazamiento génico se empleó en la transformación de una cepa *crzA* nula, MAD3709, y de una *crzA* silvestre, MAD1739. Los transformantes obtenidos para ambas cepas receptoras mostraron una importante reducción en el crecimiento colonial y defectos en su capacidad de esporulación. Tras la purificación a homocariosis y el análisis por "Southern blot" se continuó el estudio con las cepas MAD4637 ( $\Delta crzA \Delta rcoA$ ) y MAD4639 ( $\Delta rcoA$ ). Como se muestra en la figura R37-C, *rcoA* no es un gen esencial pero su delección causó una disminución del crecimiento del hongo (ej. cepa MAD4639). Sin embargo, la presencia de estrés por calcio o pH alcalino no modificó el radio de su crecimiento colonial tanto para una cepa *crzA* silvestre (MAD4639) como para la cepa nula *crzA*

(MAD4637) (Figura R37-C). Por lo tanto la pérdida de función de RcoA no es la causa de la supresión del fenotipo de sensibilidad al pH ambiental alcalino debido al alelo  $\Delta crzA$ .

Los resultados anteriores nos hicieron plantear un posible efecto supresor basado en la actividad desregulada del dominio de interacción de RcoA con su corepresor SsnF. Para estudiar esta alternativa se generaron casetes de reemplazamiento génico que permitirían expresar en la



**Figura R37: Análisis funcional de cepas *rcoA* mutantes.** **A)** Representación esquemática de los productos de expresión del alelo *rcoA1*. El rectángulo amarillo indica el intrón I3A en el transcrito que da lugar a la forma *RcoA<sup>S</sup>* y el cambio en la intensidad de color morado representa los residuos alterados tras el cambio en la fase de lectura del transcrito que tiene el intrón I3B dando lugar a la forma *RcoA<sup>L173</sup>*. A la derecha se muestra el número de aminoácidos de cada producto final. En la parte superior se indica la posición de los dominios conservados en RcoA. El rectángulo verde representa el dominio de interacción con el corepresor SsnF, el rectángulo rosa, el dominio de unión a las histonas H3 y H4, y el rectángulo azul, las repeticiones WD. **B)** Diagrama que representa la estrategia empleada en la generación de cepas *rcoA* mutantes. En la parte superior se muestra el casete de reemplazamiento génico para la generación del alelo *rcoA* nulo, en la central el casete para la generación del alelo *rcoA3* y en la inferior el casete para la generación del alelo *rcoA4*. **C)** Análisis fenotípico de las cepas que expresan los diferentes alelos de *rcoA* en fondo genético silvestre o *crzA* nulo. Conidiosporas de cada una de las cepas a analizar se inocularon puntualmente sobre MMA (-), suplementado con 50mM de CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>) o tamponado a pH alcalino con 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH8). Las imágenes de las colonias fueron tomadas tras su incubación a 37°C durante 48 horas.

célula como única fuente de RcoA a formas truncadas de este regulador con el dominio de unión a SsnF. Para ello se obtuvo mediante PCR un fragmento de DNA que codificaba para una forma que conservaba intacta la estructura primaria de RcoA hasta el aspártico 136 seguida de un codón “stop”, alelo *rcoA3*, y un segundo fragmento que conservaba la secuencia aminoacídica hasta el aspártico 136 seguida de 34 codones que codificaban para los residuos modificados detectados en RcoA(M1-D136+34), y dando lugar al alelo *rcoA4* (Figura R37-B). Ambos fragmentos se fusionaron al marcador de selección *pyrG* de *A. fumigatus* y se unieron a las regiones flanqueantes 5'UTR y 3'UTR del locus *rcoA* mediante la técnica de PCR de fusión (apartado 4.1 de Materiales y métodos). Los casetes de reemplazamiento génico se emplearon en la transformación de la cepa  $\Delta crzA$ , MAD3709 y tras la purificación a homocariosis, se continuó el estudio en las cepas MAD4656 (*rcoA3*) y MAD4657 (*rcoA4*). Como se muestra en la figura R37-C, estas cepas mostraron severos problemas en el crecimiento colonial, mayores incluso que en la ausencia total de expresión de *rcoA* (cepa MAD4637) y que fueron agravados por la presencia de estrés por calcio o pH alcalino.

Estos resultados sugieren que la supresión a pH alcalino de las cepas  $\Delta crzA$  no se debe a una pérdida total de la función de RcoA, ni, aparentemente, a la unión desregulada de RcoA a su correpresor SsnF. Los resultados parecen indicar que la supresión del fenotipo de sensibilidad a pH alcalino causada por el alelo  $\Delta crzA$  podría deberse a un efecto combinado de la presencia de ambas formas RcoA<sup>S</sup> y RcoA<sup>L173</sup> en las células, o quizás simplemente a la presencia únicamente de la forma funcional RcoA<sup>S</sup>.

## **2. Regulación de la expresión génica en respuesta a la presencia de calcio.**

### **2.1. Identificación de transportadores de calcio en *A. nidulans* como dianas de la actividad transcripcional de CrzA.**

Como se ha ido mostrando en las secciones I y II de Resultados, la presencia de calcio en el medio extracelular promueve modificaciones postraduccionales y cambios en la localización celular de CrzA. Es previsible que la localización nuclear de CrzA en exceso de calcio en el medio de lugar a una modificación a nivel transcripcional dependiente de este catión. Dado que el mantenimiento apropiado de los niveles intracelulares de iones está mediado por un amplio repertorio de proteínas transportadoras (canales y transportadores) que controlan la entrada, almacenamiento y expulsión de iones, se analizó la capacidad de CrzA de actuar sobre la expresión de los genes codificantes para estas proteínas.

### Resultados- Sección III

#### Regulación Génica en Respuesta al Estrés

En primer lugar se procedió a la identificación de genes anotados en base de datos cuyo producto de expresión interviniese potencialmente en el transporte intracelular de calcio. Para ello, se realizó una búsqueda del término “calcium” entre los descriptores de cada uno de los genes de la base de datos de *A. nidulans* (<http://www.aspergillusgenome.org>).

Esta búsqueda devolvió un resultado de 36 entradas (genes) cuya función anotada tenía relación con el calcio y de entre los cuales 15 pertenecían a genes cuyos productos tenían el potencial de participar en el transporte de calcio (Tabla R1). Las proteínas identificadas en la base

Posible función anotada		<i>A. nidulans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Canales de calcio		AN1168 ( <i>cchA</i> )	<i>CCH1</i>
		AN8842 ( <i>midA</i> )	<i>MID1</i>
		AN3155	<i>YVC1</i>
		AN0566	
Transportadores y simporters de calcio	Alta afinidad	AN1189 ( <i>pmcA</i> )	<i>PMC1</i>
		AN4920 ( <i>pmcB</i> )	
		AN2827	
		AN5088	
		AN8399	
		AN5743	<i>PMR1</i>
	Baja afinidad	AN0471 ( <i>vcxA</i> )	<i>VCX1</i>
		AN5821	
		AN7510	
		AN7173	
AN6986		<i>VNX1</i>	

**Tabla R1:** Genes anotados en la base de datos de *A. nidulans* (<http://www.aspergillusgenome.org>) cuyos posibles productos de expresión sean proteínas transportadoras o canales de calcio y genes homólogos descritos en *S. cerevisiae*.

de datos de *A. nidulans* se compararon con sus posibles homólogas descritas en *S. cerevisiae*, lo que permitió clasificar a los genes candidatos en canales o transportadores de calcio (<http://www.yeastgenome.org>). Dado que la función de los transportadores de alta afinidad PmcA y PmcB, homólogos de Pmc1p de la levadura, ya habían sido analizados en respuesta al calcio en *A. nidulans*, se continuó únicamente el estudio del transportador de alta afinidad homólogo a Pmr1p así como con los transportadores de baja afinidad y canales de calcio restantes (Findon *et al.* 2010).

## **2.2. Análisis transcripcional de genes regulados por calcio y por CrzA.**

Con el fin de determinar si la expresión génica de estos posibles transportadores y canales estuviese regulada por la presencia de calcio se decidió analizar los niveles de transcrito en células de *A. nidulans* incubadas en medio suplementado con calcio. En primer lugar se diseñó una estrategia que contemplase tanto respuestas transcripcionales de los genes a corto o medio plazo como frente a concentraciones moderadas o tóxicas de calcio. De este modo se establecieron cinco condiciones de cultivo, una primera condición en la que el micelio fue incubado en medio mínimo en ausencia de tratamiento durante 18 horas a 37°C, y cuatro condiciones en las que, tras el periodo inicial de crecimiento, se sometió al micelio a diferentes tratamientos con calcio. Estos tratamientos consistieron en la incubación del micelio a 37°C durante 10 minutos o 30 minutos tras la adición de una solución acuosa de CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 10 mM o de 100 mM. Finalmente se realizó la extracción de RNA total de cada una de las condiciones de cultivo y se analizaron los niveles de expresión de los genes seleccionados mediante la técnica de “Northern blot” (apartados 4.5 y 4.8 de Materiales y métodos). Con el fin de garantizar la fiabilidad de los resultados extraídos de cada ensayo, las muestras se analizaron por triplicado. Este método fue empleado tanto en el análisis de la expresión de los genes en un fondo genético silvestre, cepa MAD1425, como en un fondo nulo de *crzA*, MAD2448, lo que permitiría la identificación de genes regulados transcripcionalmente por CrzA.

Para la detección de los niveles de transcrito, se amplificaron fragmentos de DNA de cada uno de los genes objeto de estudio de regiones pronosticadas como exones mediante la técnica de PCR y el uso de oligonucleótidos específicos (ver Tabla M-3, Materiales y Métodos). Tras la hibridación de los triplicados de las membranas con cada una de las sondas, se procedió a la interpretación de los cambios en los niveles de transcrito detectados para dichos genes (Figura R38). En primer lugar se analizó la expresión de cada uno de los genes en condiciones basales de

crecimiento y la respuesta frente a los diferentes estímulos en las células de la cepa silvestre MAD1425.

Como se muestra en la figura R38, en ausencia de estimulación por calcio se detectan transcritos de los cuatro genes que codifican para los canales de calcio, AN1168 (CchA), AN8842 (MidA) y los homólogos a Yvc1p AN3155 y AN0566. A excepción del gen AN3155, los niveles de expresión de los canales permanecieron invariables en cualquiera de los tratamientos del cultivo llevados a cabo (Figura R38). Sin embargo, los niveles de transcrito del locus AN3155 aumentaron tras 30 minutos de incubación con concentraciones relativamente bajas de calcio (10 mM de CaCl<sub>2</sub>) mientras que esta inducción de la expresión no se observó en presencia de concentraciones diez veces superiores (100mM de CaCl<sub>2</sub>) (Figura R38).

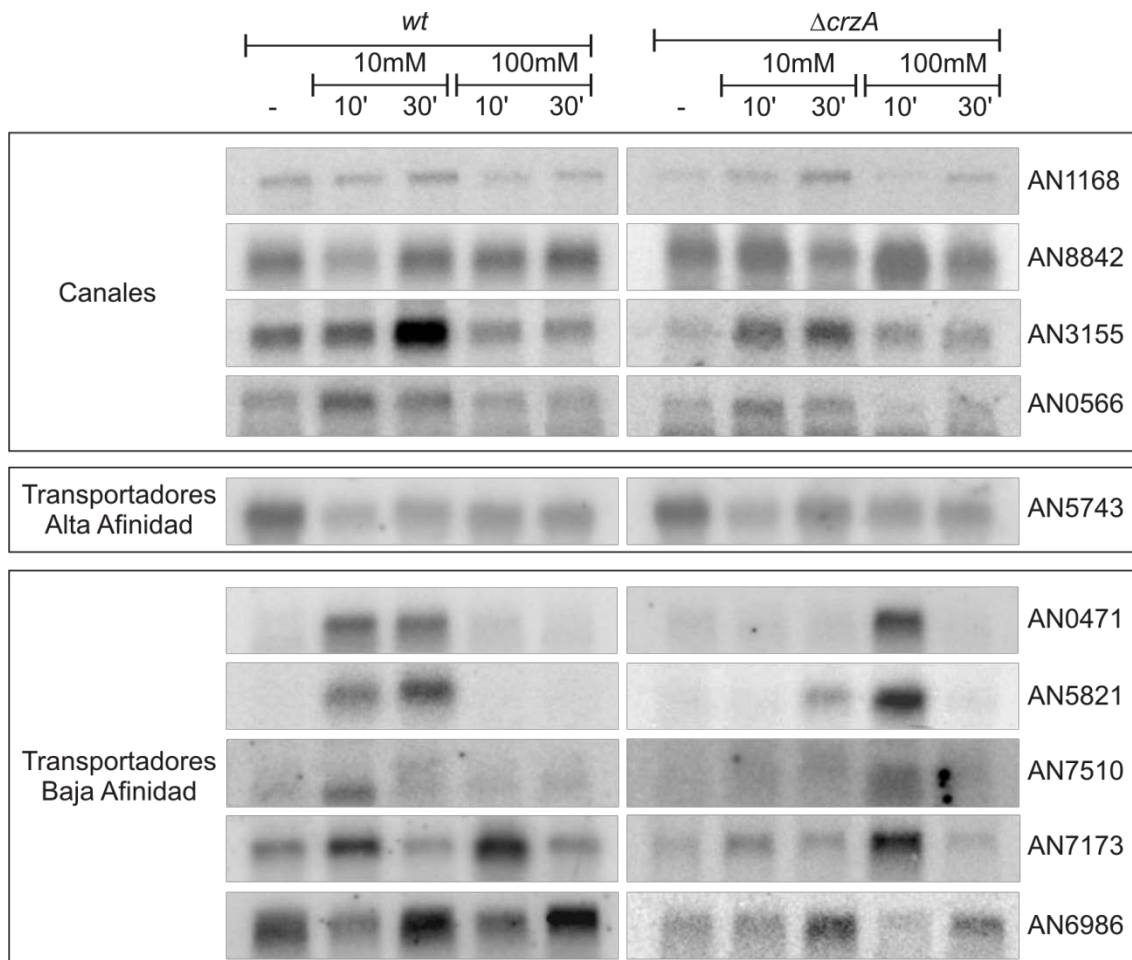
El único representante de transportadores de alta afinidad, es decir, el gen que codifica para el homólogo de Pmr1p, locus AN5743, mostró una regulación de su expresión regulada por calcio. La presencia de calcio por cualquiera de los tratamientos realizados promovió una disminución moderada en los niveles de transcrito del gen situado en el locus AN5743 (Figura R38).

Sin duda donde se observó mayor regulación de la expresión génica en respuesta al calcio fue entre los miembros de transportadores de baja afinidad. En este grupo se detectaron niveles basales de expresión en los transcritos codificados por los loci AN7173 y AN6986 mientras que la transcripción del resto de componentes estaba reprimida (Figura R38). Los transcritos de los loci AN7173 y AN6986 fueron inducidos por la presencia de calcio independientemente de la concentración de este catión suplementada al medio (10 mM o 100 mM de CaCl<sub>2</sub>) (Figura R38). La inducción del locus AN7173 se produjo de forma rápida, a los 10 minutos, y no se prolongó en el tiempo ya que a los 30 minutos se detectaron niveles basales del transcrito (Figura R38). Por el contrario la inducción del locus AN6986 fue progresiva, y los mayores niveles de transcrito se detectaron tras 30 minutos de incubación con calcio (Figura R38). Los niveles de RNA sintetizados a partir del locus AN7510 apenas variaron en las condiciones analizadas y sólo se apreció una mayor expresión del gen tras 10 minutos de incubación del micelio con concentraciones bajas de calcio (10 mM de CaCl<sub>2</sub>) (Figura R38). Los genes AN0471 y AN5821, posibles homólogos del gen *Vcx1* de *S. cerevisiae*, mostraron una respuesta común en respuesta al tratamiento del cultivo con calcio, en cuya ausencia no se detectaron sus transcritos. Independientemente del tiempo de incubación (10 o 30 minutos), el tratamiento del micelio con concentraciones bajas de calcio (10mM de CaCl<sub>2</sub>) promovió la inducción de la transcripción de los genes AN0471 y AN5821 (Figura R38). Por el contrario, el estrés catiónico generado por la presencia de una concentración elevada

de calcio en el medio (100 mM de CaCl<sub>2</sub>) no indujo la expresión de estos mismos genes a corto ni a medio plazo (Figura R38).

Estos resultados han puesto de manifiesto diferentes alternativas en la respuesta transcripcional de los genes que codifican para putativos canales y transportadores de calcio. Así, existen ciertos genes que son expresados de forma constitutiva, genes represibles y genes inducibles, en los que además la cantidad y duración del estímulo modulan la respuesta transcripcional.

Una vez establecido el sistema de control de la expresión génica en la cepa silvestre se procedió a determinar la participación de CrzA en dicha regulación, interpretando los resultados del “Northern blot” de los tratamientos realizados en la cepa  $\Delta crzA$ , MAD2448. El patrón de expresión de los canales de calcio en la cepa *crzA* nula no reveló grandes diferencias respecto al



**Figura R38: Niveles de expresión de genes candidatos a ser regulados por calcio y CrzA.** Las imágenes de la izquierda muestran los niveles de transcrito en la cepa silvestre MAD1425 y las imágenes de la derecha los de la cepa  $\Delta crzA$  MAD2448 de cada uno de los loci analizados, indicados en el margen derecho. En la parte superior de la imagen se indica el tiempo en minutos de incubación con calcio y las concentraciones milimolares de CaCl<sub>2</sub> empleadas.

detectado en la cepa silvestre (Figura R38). El único gen que mostró cierta variación fue el locus AN3155, cuyos niveles de transcrito fueron ligeramente menores que en la cepa silvestre aunque la respuesta al calcio se mantuvo del mismo modo que en el fondo *crzA* silvestre (Figura R38). En la cepa  $\Delta crzA$  la regulación transcripcional del homólogo de *PMR1*, AN5743, mostró una disminución de su expresión en presencia de calcio de manera similar a la observada en la cepa *crzA* silvestre (Figura R38).

Finalmente se determinó el papel de CrzA en el grupo de transportadores de baja afinidad, donde se había observado previamente el papel regulador del calcio en la expresión de alguno de estos genes. Los niveles de transcritos detectados para los loci AN7173 y AN6986 mostraron la misma regulación por calcio de inducción rápida o progresiva respectivamente que la descrita en la cepa silvestre (Figura R38). En la cepa silvestre, la expresión del gen AN7510 se desreprimió al cabo de 10 minutos de incubación con una concentración moderada de calcio (10 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) sin embargo en la cepa  $\Delta crzA$  este efecto se observó tras el mismo tiempo de incubación pero con una concentración de calcio diez veces superior (100 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) (Figura R38). El mayor papel de CrzA en la regulación de la expresión se detectó para los genes AN0471 y AN5821. La expresión de estos genes en condiciones basales se encontraba reprimida del mismo modo que en la cepa silvestre sin embargo su patrón de expresión génica inducida por calcio fue diferente. La transcripción del locus AN0471 no se indujo por calcio a baja concentración (10 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) si no que se observó su expresión en presencia de niveles tóxicos de calcio (100 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) para la cepa nula *crzA*. Esta elevación en la expresión de AN0471 fue transitoria ya que tras 30 minutos no se detectó la presencia del transcrito de este gen en el RNA total extraído (Figura R38). El gen AN5821 mostró una inducción retrasada a bajos niveles de calcio (30 minutos de incubación con 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) y de poca intensidad respecto a la respuesta observada en la cepa silvestre (10 minutos de incubación con 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) (Figura R38). La elevación de la concentración de calcio (100 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) promovió la expresión génica del locus AN5821 a corto plazo (10 minutos) a diferencia de la falta de inducción que se observó en estas condiciones en una cepa silvestre (Figura R38).

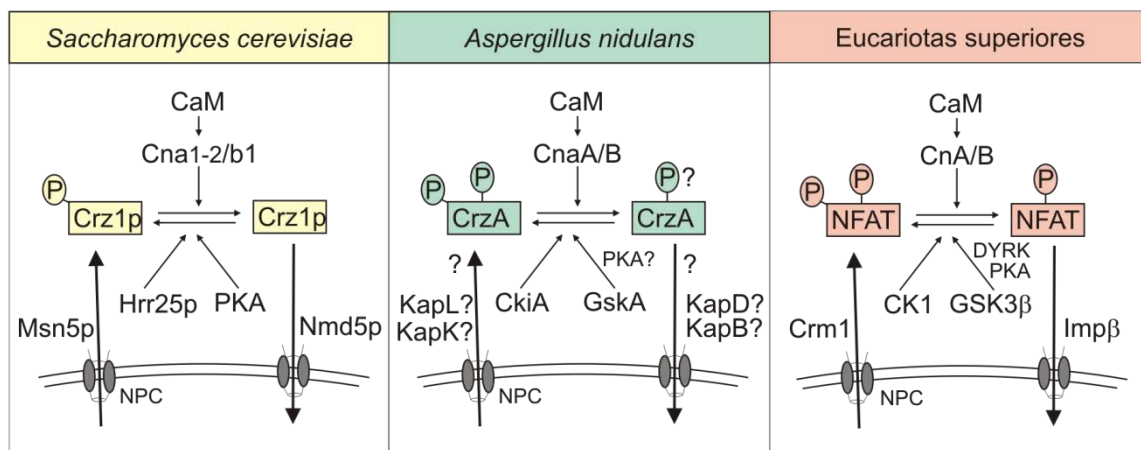
Esta sección ha identificado solamente a dos genes codificantes para transportadores de calcio de baja afinidad como genes regulados transcripcionalmente por este catión y en los que participa el factor CrzA como regulador. Sin embargo, el estudio del efecto transcripcional causado por dos concentraciones de calcio cuyo efecto sobre la cepa  $\Delta crzA$  es diferente ha revelado la existencia de un efecto activador y represor sobre la expresión de los anteriores transportadores codificados por AN0471 y AN5821. CrzA podría ser responsable de esta regulación dual, positiva y negativa, dependiente de la concentración de calcio.

## **DISCUSIÓN**



**1. Modelo de señalización de CrzA en *A. nidulans* y en otros sistemas similares.**

En esta tesis doctoral se ha tenido como objetivo primario la identificación de elementos señalizadores pertenecientes a la ruta de respuesta al calcio y el pH alcalino que es mediada en *Aspergillus nidulans* por el factor transcripcional CrzA. Para ello hemos tomado como referencia los modelos de rutas de señalización de otros factores transcripcionales similares en hongos, como Crz1p de *S. cerevisiae*, u otros pertenecientes a organismos eucariotas superiores, como los NFATs de mamíferos (Figura D1).



**Figura D1: Modelo de transducción de señales de CrzA en *A. nidulans* y los sistemas descritos en la señalización de Crz1p en *S. cerevisiae* y los NFAT en eucariotas superiores.**

La característica que une tanto a los NFATs y los Crz, y que además da nombre a los últimos, es la participación de la calcineurina como elemento señalizador clave. Los calcineurin-responsive-zinc finger factors, o Crz, descritos en hongos median en respuestas a estreses ambientales, jugando además un papel importante en procesos de infección en plantas o en animales (apartado 5 de Introducción y (Rispaill *et al.* 2009)). Una primera tarea fue determinar que CrzA, la proteína homóloga a Crz1p, que había sido identificada mediante búsquedas *in silico* y caracterizada de forma inicial por nuestro grupo (Spielvogel *et al.* 2008), era señalizada por la calcineurina. El trabajo del Prof. Goldman en *A. nidulans* con la calcineurina había permitido demostrar que esta fosfatasa no es esencial para el hongo modelo y por lo tanto se podía utilizar un mutante nulo para contestar a la anterior pregunta. Para la consecución del objetivo inicial de esta tesis ha sido de gran importancia la utilización del mutante portador del alelo nulo de la subunidad catalítica de la calcineurina, CnaA. Los resultados obtenidos a lo largo de las secciones de resultados I.3 y II.2 nos han permitido concluir sin lugar a dudas que la calcineurina juega un papel esencial en la señalización de CrzA. Nuestro modelo del mecanismo molecular de señalización CnaA-CrzA se exponen más adelante. La acción de esta fosfatasa se observa a dos

niveles, el grado de modificación postraduccional del factor CrzA y su efecto en la localización celular del mismo. Este mecanismo de acción es común a los modelos de regulación de los Crz y NFATs.

El calcio es un mensajero secundario cuya acción está mediada por proteínas que lo reconocen y unen modificando así su propia estructura y su actividad (Clapham, 2007; Niki *et al.* 1996). La calcineurina recibe este nombre puesto que es activada por este mensajero a través de su interacción con la calmodulina, CaM. Hemos añadido, por lo tanto como elementos pertenecientes a la ruta señalizadora de CrzA y que interactúan directamente con el calcio a la calmodulina y la subunidad reguladora de la calcineurina, CnaB. En el apartado 3 de esta Discusión se discute como este sistema es señalizado por el propio calcio y como se interpreta la señal de alcalinización del medio.

La actividad fosfatasa de la calcineurina es dependiente de su señalización por la calmodulina, CaM. En *A. nidulans* la CaM está codificada por un único gen, *CaM*, que al igual que en otros organismos es esencial (Rasmussen *et al.* 1990). El elevado grado de conservación existente entre la calmodulina de *A. nidulans* y las de sus homólogos en otros organismos sugiere un mecanismo molecular similar en la cascada de activación por calcio como segundo mensajero (Joseph *et al.* 2002). La interacción de la calmodulina con la calcineurina tras la elevación de los niveles intracelulares sería la responsable de la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-CN que suponemos necesario para la desfosforilación de CrzA.

Dado que CrzA es modificado postraduccionalmente mediante fosforilación debe existir, al menos, un sistema protein-quinasa responsable de dicho proceso. En *S. cerevisiae* y eucariotas superiores se ha descrito la participación de diferentes quinasas en los procesos de fosforilación de Crz1p y NFATs. Ambos tipos de FT son fosforilados por proteínas de la familia de las casein kinase I. En el caso de la levadura la quinasa Hrr25p y CK1 en los eucariotas superiores. En este trabajo nos enfocamos en determinar la participación de esta clase de quinasas en la señalización de CrzA. El genoma de *A. nidulans* codifica para dos proteínas pertenecientes a la familia casein kinase I, CkiA y CkiB. CkiA se ha propuesto como la ortóloga funcional de Hrr25p mientras que CkiB se propone como ortóloga de Yck2p (De Souza *et al.* 2013; Apostolaki *et al.* 2012). La pérdida de la función de Hrr25p reduce el grado de fosforilación de Crz1p y un tipo similar de mutaciones en CK1 tiene un efecto similar sobre los NFAT (Kafadar *et al.* 2003; Okamura *et al.* 2004). Este trabajo ha demostrado la participación de CkiA en la ruta de señalización de CrzA. La pérdida de función de la quinasa CkiA reduce los niveles de modificación postraduccional de CrzA en *A. nidulans*. No obstante, este efecto no modifica la localización subcelular de CrzA como se ha

descrito en el caso de Crz1p y de los NFATs. Por lo tanto en *A. nidulans* la señalización de CrzA mediada por CkiA debe de ser necesaria a otro nivel regulador distinto al descrito en los sistemas de levadura y eucariotas superiores.

El trabajo realizado por varios grupos ha mostrado la existencia de actividades quinasas adicionales a CKI que fosforilan tanto a Crz1p como a los NFATs. Nuestro trabajo también evidencia que debe existir más de un sistema de regulación mediante fosforilación actuando sobre CrzA. Una selección de potenciales quinasas de CrzA mediante la búsqueda *in silico* de posibles dianas de fosforilación nos condujo a estudiar específicamente el papel de la quinasa homóloga de GSK3 $\beta$  en *A. nidulans* por dos motivos. El primero es la presencia de un alto número de potenciales dianas para esta quinasa en la región de CrzA que es modificada por fosforilación (apartado 4.2 de Resultados). En segundo lugar GSK3 $\beta$  es una quinasa con una función importante en el sistema de fosforilación de los NFATs, sugiriendo la conservación en el sistema de señalización de entre estos factores de eucariotas superiores y CrzA del hongo filamentoso.

Se ha identificado el gen codificante del homólogo GSK3 $\beta$  en *A. nidulans*, *AN6508/gskA*, que también ha sido recientemente publicado por otro grupo en un estudio sistemático del "kinoma" de este hongo filamentoso (De Souza *et al.* 2013). Ambos trabajos muestran los severos defectos morfológicos de una cepa nula *gskA* lo que evidencia un papel de esta quinasa en importantes procesos de desarrollo celular tal y como se ha descrito en otros organismos (Forde *et al.* 2007). Aquí mostramos que CrzA es un posible sustrato de GskA. En ausencia de esta actividad quinasa el grado de modificación postraduccional de CrzA es mucho menor, incluso en células sin estrés. GskA juega un papel importante en el proceso de transporte de CrzA al interior nuclear, pero no así en su exclusión de los núcleos en ausencia de señalización. Este papel parece no ser similar al descrito para GSK3 $\beta$  en la señalización de los NFATs dado que la pérdida de función de esta quinasa promueve la acumulación nuclear de estos factores. Este hecho refleja de nuevo la existencia de diferencias entre los sistemas de fosforilación de eucariotas superiores e inferiores.

En la fosforilación de Crz1p y de los NFATs participan proteínas de la familia de protein-quinasas dependientes de AMP-cíclico, PKAs, mientras que en los NFAT se ha descrito también la fosforilación mediada por quinasas de la familia DYRK (Gwack *et al.* 2006). El genoma de *A. nidulans* codifica para proteínas de la subfamilia Yak de la familia DYRK (De Souza *et al.* 2013), sin embargo no se han detectado posibles homólogos de la subclase DYRK1 o DYRK2 que fosforilan a los NFATs, por lo que no es probable que CrzA sea sustrato de una quinasa perteneciente a esta familia. En cuanto a la familia PKA, se han identificado por su gran conservación en las secuencia a

PkaA y PkaB en *A. nidulans*. PkaA ha sido relacionada con la producción de metabolitos secundarios y con el desarrollo de estructuras reproductivas (Shimizu *et al.* 2001; Fillinger *et al.* 2002). En cuanto a PkaB no se le ha asignado ninguna función dado que una cepa portadora del alelo nulo carece de fenotipo hasta la fecha, pero muestra letalidad sintética con el alelo nulo de *pkaA*, indicando que ambas quinasas están relacionadas funcionalmente (Ni *et al.* 2005). Sin embargo no hay en la actualidad datos que correlacionen la actividad de PkaA y PkaB con tolerancia al pH alcalino o al estrés por calcio. La presencia de putativas dianas de fosforilación por PkaA (7) y PkaB (2) alientan líneas de investigación orientadas a determinar el papel de estas PKs en la señalización del factor CrzA.

La señalización de las proteínas Crz y NFAT en respuesta a ciertos estímulos extracelulares se traduce en cambios en sus respectivas localizaciones intracelulares. En ausencia de estrés, CrzA se localiza en el citoplasma y como se detalla en los resultados la presencia de ciertos estreses como el calcio, manganeso o el pH alcalino son "señales" que promueven la importación de este FT al núcleo. Dado el tamaño molecular de CrzA (y más en el caso de la quimera usada como reportero, CrzA-GFP) su transporte a través de la envoltura nuclear debe ser mediada por sistemas de transporte activos (Macara, 2001). Así, se definen para las proteínas Crz, e incluimos aquí a CrzA, y los NFAT sistemas o rutas de transporte nucleocitoplásmico que atraviesen el complejo del poro nuclear en ambos sentidos. Tanto del núcleo al citoplasma (exportación nuclear) como del citoplasma al núcleo (importación nuclear) (Cyert, 2003; Feske *et al.* 2007). Estas rutas o elementos son parte esencial de la maquinaria de señalización y respuesta a los estímulos ambientales.

A pesar de que tanto *A. nidulans* como *S. cerevisiae* son hongos ascomicetos, esta tesis muestra que la mera existencia de proteínas homólogas a los transportadores nucleares de Crz1p de *S. cerevisiae*, no implica que las rutas de transporte de CrzA estén conservadas. La primera evidencia surgió al observar la tolerancia a calcio o pH alcalino de una cepa mutante en el posible sistema de importación nuclear de CrzA. La exportación de Crz1p está mediada por la exportina Msn5p, cuyo homólogo en *A. nidulans* es la carioferina KapL. El proceso de importación de Crz1p al interior nuclear es mediado por la importina Nmd5p. En el hongo filamentoso el transportador nuclear más similar es KapD. Tanto en *S. cerevisiae* como en *A. nidulans*, los transportadores Nmd5/KapD y Msn5/KapL no son esenciales, sin embargo en la levadura la delección de Nmd5 causa un fenotipo de sensibilidad similar al de la ausencia de Crz1p (Polizotto *et al.* 2001), fenotipo que no se observa en la correspondiente cepa mutante en *A. nidulans* (Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011). La ausencia de un papel esencial de estos sistemas de transporte sobre CrzA quedó demostrada en el estudio de las formas etiquetadas de CrzA en los fondos nulos de

los *kapD* y *kapL*. La conservación de los transportadores celulares entre *S. cerevisiae* y *A. nidulans* no conlleva al reconocimiento de la misma proteína cargo, Crz1p o CrzA, por lo que suponemos la existencia de un sistema alternativo para el transporte celular de CrzA.

Ya que CrzA muestra semejanzas con los NFAT en el sistema de modificación postraduccional del FT podrían también existir elementos comunes o similares en la maquinaria de transporte celular. El transporte nucleocitoplásmico de los NFAT está regulado por las rutas generales de importación y exportación, es decir que es la exportina Crm1 la que mantiene la exclusión nuclear de los NFAT y la importina Imp $\beta$ 1 la ruta de importación (Ishiguro *et al.* 2007; Kehlenbach *et al.* 1998). *A. nidulans* tiene proteínas homólogas a la importina Imp $\beta$ 1, KapB, y a la exportina Crm1, KapK, que podrían realizar el transporte nucleocitoplásmico de CrzA (Markina-Inarrairaegui *et al.* 2011). Los transportadores de la ruta general reconocen señales de transporte clásicas en sus proteínas cargo. CrzA porta una señal NLS clásica, por lo que sería posible que la ruta general de importación estuviese implicada en el transporte de CrzA. La presencia de, al menos, dos NLSs en CrzA sugiere como alternativa la existencia de varios sistemas de transporte actuando sobre este TF en *A. nidulans* (ver apartado 2.3.1 de Discusión).

## **2. Señalización de CrzA.**

### **2.1. Modificaciones postraduccionales de CrzA.**

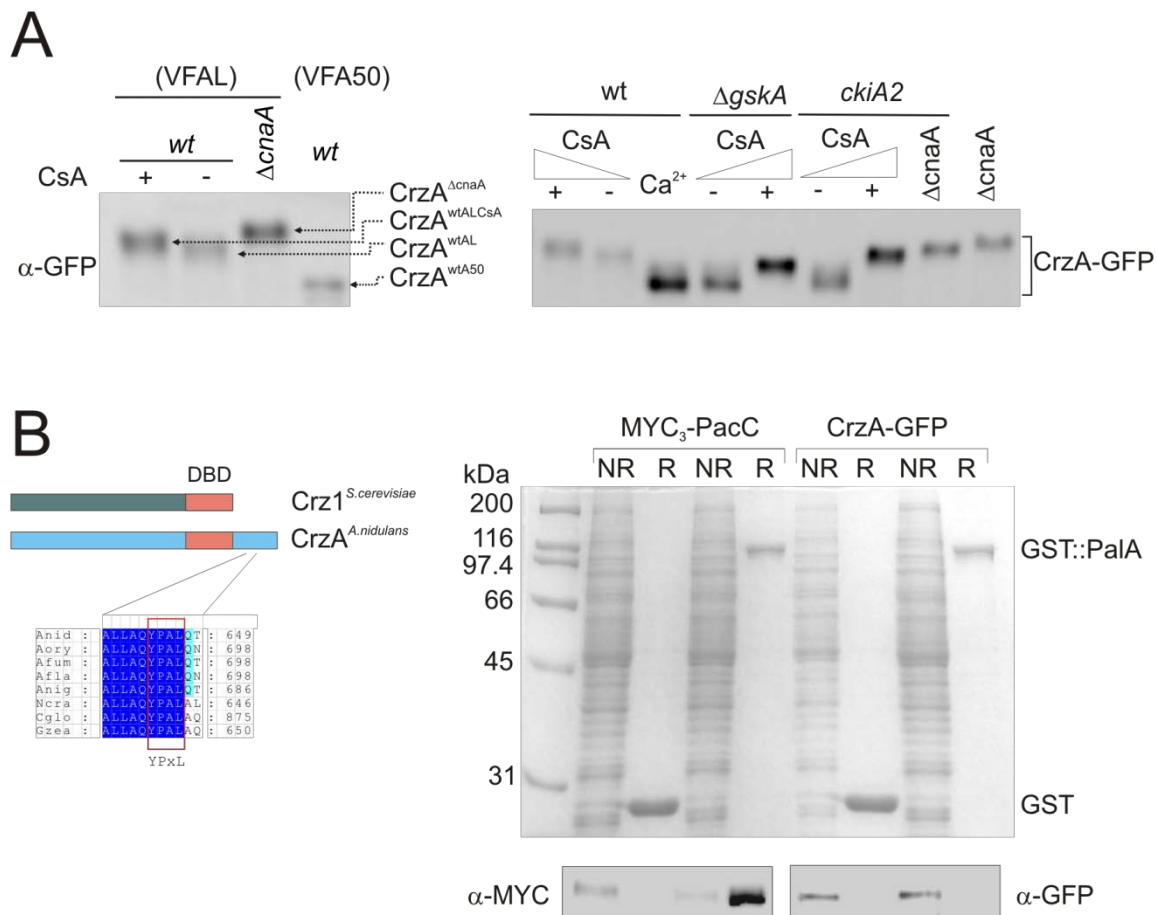
En esta tesis se demuestra que el factor CrzA está sometido a regulación por modificación postraduccional. Se han definido varias formas modificadas de CrzA (Figura D2) que se enmarcan entre dos límites, el correspondiente a CrzA<sup>wtA50</sup> que es la forma con mayor movilidad electroforética y la de menor movilidad, la forma CrzA <sup>$\Delta$ cnaA</sup>, que se detecta en los extractos proteicos una cepa nula *cnaA*. Hemos concluido que ambas formas reflejan los estados de menor y mayor modificación postraduccional de CrzA, formas CrzA<sup>wtA50</sup> y CrzA <sup>$\Delta$ cnaA</sup> respectivamente. Estas diferencias son debidas tanto a la metodología empleada como al genotipo de las cepas de donde se extraen los extractos proteicos como se comenta a continuación. Así, el método VFAL de extracción de proteínas (ver Figura R3) produce la desnaturalización e inactivación de la actividad enzimática de las proteínas del extracto, lo que permite mantener el estado de modificación de CrzA presente en el momento de recolección (e.g., la forma CrzA <sup>$\Delta$ cnaA</sup> extraída de una cepa  $\Delta$ *cnaA* por este método). El método VFA50 permite preservar el estado nativo de las proteínas pero, muy probablemente, no impide CrzA sea defosforilado durante el proceso de extracción.

Son varios los abordajes experimentales que han demostrado que la diferencia de movilidad entre CrzA<sup>wtA50</sup> y CrzA<sup>ΔcnaA</sup> es consecuencia del diferente grado de fosforilación entre ambas formas. Entre las estrategias empleadas están el uso de CsA, inhibidor de la calcineurina, así como ensayos de desfosforilación *in vitro*, que han permitido revertir el estado de fosforilación de CrzA y así estudiar la señalización del FT. De este modo, el tratamiento del cultivo con CsA de una cepa *cnaA* silvestre reduce la movilidad electroforética de CrzA. El experimento acoplado CsA/desfosforilación *in vitro* demostró que CrzA estaba modificado postraduccionalmente por fosforilación y que la calcineurina mediaba esta regulación.

La detección de CrzA en extractos VFAL del micelio de una cepa *cnaA* silvestre da lugar a una forma de CrzA con una movilidad electroforética menor que la detectada en extractos VFA50, formas CrzA<sup>wtAL</sup> y CrzA<sup>wtA50</sup>, respectivamente (ver Figura D2). La diferencia de movilidad entre CrzA<sup>wtAL</sup> y CrzA<sup>wtA50</sup> muestra que CrzA se encuentra fosforilado en ausencia de estrés y está de acuerdo con la previsible inactivación de la fosfatasa calcineurina en dichas condiciones ambientales, como se ha demostrado para Crz1p en *S. cerevisiae* (Stathopoulos-Gerontides *et al.* 1999). De acuerdo con un modelo en el que la activación de la calcineurina desencadena la señalización del FT, el estado de menor fosforilación de CrzA fue visualizado en extractos VFAL obtenido a partir del micelio de una cepa silvestre sometido a estrés por calcio o pH alcalino y dicho efecto no pudo observarse en extractos procedentes de una cepa *ΔcnaA*. En estas condiciones de estrés, la movilidad electroforética del FT fue de nuevo la de mayor movilidad electroforética, correspondiente a la forma CrzA<sup>wtA50</sup>. Sin embargo, el tratamiento del micelio de una cepa silvestre con CsA permite visualizar la forma CrzA<sup>wtALCsA</sup> que muestra una movilidad electroforética inferior a la de CrzA<sup>wtAL</sup>. Por lo tanto, en condiciones basales la actividad de la calcineurina no debe estar completamente bloqueada. Pronosticamos la existencia de un equilibrio entre ciertas formas fosforiladas y defosforiladas en la célula, el cual puede tener la función de evaluar de forma continuada una posible situación de estrés extracelular.

Las actividades GskA y CkiA pueden ser responsables de la anterior situación de equilibrio en las formas de CrzA. La ausencia de GskA o la pérdida de función en CkiA promueven la detección de formas de CrzA de elevada movilidad electroforética en extractos VFAL similar a la de la forma CrzA<sup>wtA50</sup>. Estos resultados indican que CrzA está completamente desfosforilado en los fondos genéticos mutantes de las quinasas CkiA y GskA. El hecho de que el inhibidor CsA promovió una disminución en la movilidad electroforética de CrzA en ausencia de las anteriores actividades quinasa demuestra que dichas formas menos modificadas de CrzA sigue siendo sustrato de la calcineurina y por otro lado que son sustratos de otras actividades quinasa. En principio podría explicarse por la actividad independiente de CkiA o de GskA dado que el doble

mutante no ha sido generado para su estudio. Como se muestra en la figura D2, la incubación del micelio con CsA en las cepa  $\Delta gskA$  tiene un efecto menor en la reducción de la movilidad electroforética de CrzA que en la de la cepa portadora del alelo *ckiA2*. Esta discordancia podría estar reflejando el grado de modificación (número de residuos fosforilados) por parte de cada actividad quinasa CkiA y GskA, es decir 4 dianas de la primera frente a 18 posibles de la segunda.



**Figura D2: Análisis comparativo de modificaciones postraduccionales de CrzA.** **A)** Diferentes movilidades electroforéticas de CrzA detectadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral (ver texto). **B)** Ensayo de PD que demuestra la ausencia de interacción entre la proteína PaIA expresada en *E. coli* y CrzA de *A. nidulans*. La metodología fue similar a la empleada en ensayos de este tipo como se describe en el apartado 2.2 de resultados. A la izquierda se muestra el alineamiento múltiple de secuencia de homólogos en hongos filamentosos de la región con la secuencia YPxL.

Parte de esta tesis ha consistido en la optimización de la metodología de manipulación de proteínas con el fin de identificar las modificaciones postraduccionales de CrzA *in vivo*. Así, en este trabajo se demuestra que la calcineurina mantiene la actividad fosfatasa a bajos niveles en condiciones basales, al menos sobre CrzA, y que el máximo de su actividad se consigue en presencia de agentes inductores de estrés. Crz1p también es fosforilado por más de una quinasa mientras que la calcineurina es la única responsable de la desfosforilación del FT. Sin embargo en

el modelo de la levadura no se ha definido la existencia de diferentes grados de fosforilación de Crz1p. Esta tesis demuestra la existencia de al menos cinco formas de CrzA con diferente movilidad electroforética como consecuencia de la variedad de estados de fosforilación del FT. Dado que los cambios de movilidad de CrzA son sólo detectables en unas condiciones de ensayo concretas, no se puede descartar que Crz1p también presente diferentes grados de fosforilación y que éstos no han sido identificados al no haberse prestado atención a las condiciones de extracción de proteínas.

También se dedicó un gran esfuerzo para determinar si CrzA estaba sujeto a un proceso de modificación por proteólisis regulada como es el caso de PacC o SltA (ver apartado 1 de Introducción). La detección de bandas de mayor movilidad electroforética de CrzA en los extractos A50 sugería la existencia formas truncadas de este FT. Con el fin de comprobar si en *A. nidulans* CrzA estaba sujeto a una señalización similar a la de estos otros FT se estudió el patrón electroforético de una forma de CrzA etiquetada en ambos extremos, Myc<sub>3x</sub>-CrzA-HA<sub>3x</sub>. Utilizando diferentes métodos de extracción de proteínas se pudo verificar que la banda principal que detectábamos mediante inmunoensayos era la forma doblemente etiquetada, por lo tanto descartamos la existencia de un proceso proteolítico de CrzA de forma constitutiva o inducida por factores ambientales. El conjunto de los resultados demuestra que a diferencia de los otros FT de respuesta a estrés ambiental, PacC y SltA, en la señalización de CrzA no se produce el truncamiento de la proteína si no que la modificación postraduccional principal es la fosforilación. Si el truncamiento de PacC y SltA determina la activación de los FT, la conversión de formas activas e inactivas implica la degradación de las formas activas una vez realizada su función y la síntesis proteica *de novo* para regenerar el circuito de activación. Por el contrario, la activación/desactivación de CrzA es más versátil y parece estar realizada mediante la transición de formas con múltiples grados de fosforilación de forma reversible que no requiere de síntesis proteica *de novo*.

Finalmente indicar que no se ha encontrado un nexo entre la señalización por pH alcalino entre la ruta Pal y CrzA. PalA une a PacC a través de dos motivos YPxL/I reclutando así al complejo proteolítico que señala a este factor transcripcional ante la alcalinización del medio (Vincent *et al.* 2003). A pesar de los anteriores resultados, la presencia de un motivo YPxL/I en el extremo C-terminal de CrzA, conservado entre otros posibles homólogos en hongos filamentosos, sugirió la posibilidad de que PalA estuviese reconociendo a este FT y participase así en su señalización. Para verificar esta hipótesis se realizó un experimento de interacción entre una quimera GST-PalA, expresada en bacteria, y la proteína endógena etiquetada. Como control del experimento se verificó la interacción entre dicha quimera y una forma etiquetada de PacC expresada por el

hongo. Frente la demostrada interacción entre PalA y PacC no se pudo observar interacción entre PalA y CrzA (Figura D2). Este resultado, aunque negativo, sugiere que la ruta que media la señalización de PacC no reconoce a CrzA como una posible diana frente a la alcalinización del medio extracelular. La ruta Pal debe transmitir la señal de alcalinización del medio exclusivamente a PacC y, según se muestra en este trabajo, en el caso de CrzA esta señal debe ser transducida por la fosfatasa calcineurina de forma exclusiva.

## 2.2. Elementos en *cis* y en *trans* que median en la señalización de CrzA.

Para que tenga lugar una correcta señalización de CrzA será necesaria la presencia de elementos reguladores en *cis*, aquellos localizados en la secuencia primaria de CrzA, que habrán de ser reconocidos por elementos reguladores en *trans*, aquellos pertenecientes a los sistemas de señalización y de transporte celular.

### 2.2.1. Elementos en *cis*.

Con el fin de identificar regiones funcionales en CrzA se generó una colección de cepas que expresaban diferentes formas truncadas de este regulador transcripcional. Un dominio funcional característico e indispensable para un factor transcripcional es el dominio de unión al DNA (DBD, de sus siglas en inglés). Habitualmente se utiliza la estructura primaria de estos dominios para identificar a nuevos miembros de una misma familia de factores transcripcionales, y éste ha sido el caso por ejemplo para PacC y el objeto de esta tesis, CrzA (Penalva *et al.* 2002; Spielvogel *et al.* 2008). Este procedimiento de búsqueda en bases de datos asegura encontrar posibles homólogos funcionales aunque las secuencias en los flancos del DBD no estén muy conservadas, como es el caso de CrzA frente a sus homólogos en hongos levaduriformes como Crz1p.

El DBD de CrzA, que consta de dos dedos de zinc clásicos C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y un tercero del tipo CCCH, se decidió analizar la función situada a ambos lados de este dominio. Este estudio nos parecía importante dado que los factores de hongos filamentosos similares a CrzA de *A. nidulans* presentan una región adicional en el extremo C-terminal del DBD (coordenadas 613-730), en la que grupos de residuos conservados entre estas proteínas y que han sido estudiados en mayor detalle como se discute más adelante. Así, se estudiaron dos quimeras, CrzA(1-612) y CrzA (448-730) eliminando las regiones situadas en los extremos C- o N- terminal de respecto al DBD y que corroboraron que el DBD es un elemento en *cis* esencial para la funcionalidad de CrzA. Los problemas de crecimiento colonial que presenta una cepa que expresa bajo el promotor de *gpdA<sup>mini</sup>* exclusivamente el DBD pusieron de manifiesto que la expresión desregulada de este

dominio debe interferir en la normal regulación génica. La presencia de las regiones tanto N- o C-terminal al DBD parecen estar modulando dicha actividad de unión al DNA. Por lo tanto consideramos a este efecto como una primera función reguladora para ambas regiones del factor CrzA.

La expresión bajo el promotor de *gpdA<sup>mini</sup>* de las formas truncadas CrzA(1-612) o CrzA (448-730), permite la supresión del fenotipo de sensibilidad a elevadas concentraciones de calcio y alcalinidad del medio que muestra una cepa *crzA* nula. Inicialmente se consideró que cada extremo por separado fuese suficiente para regular la función de CrzA. Sin embargo las mismas construcciones expresadas bajo el control del promotor de *crzA* revelaron una diferente participación de cada extremo en la funcionalidad del FT. Sólo la cepa que expresaba CrzA(1-612) bajo el promotor de *crzA* mantuvo la tolerancia al estrés por calcio o pH alcalino mientras que CrzA (448-730) dio lugar a una pérdida parcial de función de CrzA. Considerando que las regiones flanqueantes del DBD son necesarias para regular la actividad de unión a DNA, parece que el extremo C-terminal actúa como un factor limitante en la disponibilidad de CrzA. Por lo tanto, la supresión del fenotipo nulo *crzA* por los elevados niveles de expresión de CrzA (448-710) empleando el promotor de *gpdA<sup>mini</sup>*, pueden ser debidos a un fenómeno de compensación mediante dosis. Concluimos que el extremo N-terminal de CrzA (residuos 1-445+DBD) contribuye en mayor medida en la funcionalidad de CrzA a niveles fisiológicos por lo que es probable que en esta región se localicen los elementos imprescindibles que regulen la actividad del FT.

Demostrado que la calcineurina es capaz de desfosforilar a CrzA, nos planteamos analizar si la fosfatasa podía actuar del mismo modo sobre las regiones situadas a ambos extremos del DBD. Para ello se generaron cepas que expresaban la región N- o C-terminal de CrzA en un fondo nulo de la calcineurina que permitirían determinar el estado de fosforilación de los extremos de CrzA. Los ensayos de desfosforilación *in vitro* demostraron que en la región N-terminal se localizan residuos desfosforilables por la calcineurina mientras que no se detectó fosforilación en el extremo C-terminal. Estos resultados indican que el extremo N-terminal mantiene dos tipos de modificaciones, la fosforilación por las quinasas y la desfosforilación por la calcineurina. El hecho de que el extremo C-terminal no se detectase fosforilado puede indicar que no tenga residuos fosforilables o que aún teniéndolos no sean reconocibles por las quinasas dada la falta de la región N-terminal. Por lo tanto, en el extremo N-terminal recae la mayor regulación de la modificación postraduccional de CrzA.

Posteriormente el análisis de la localización de las fusiones de fragmentos de CrzA a GFP en cepas silvestres o nulas de la calcineurina permitió relacionar el estado de fosforilación del FT con

su distribución en la célula. En un fondo silvestre, la región N-terminal de CrzA conservó la capacidad de ser señalizada del mismo modo que el FT en su forma entera, es decir, localizada en el citoplasma en ausencia de estrés y acumulada en los núcleos en respuesta a los estímulos y de forma dependiente de calcineurina. Por el contrario la región C-terminal mostró una acumulación nuclear de CrzA sin necesidad de estimulación ni de la actividad CnaA. Por lo tanto, la regulación calcio/pH-alcalino/calcineurina-dependiente de la localización celular de CrzA es mediada por motivos presentes en la región entre los residuos 1-445 de este FT.

Los elementos reguladores de la señalización de Crz1p y de NFAT también se localizan en la región N-terminal por delante del DBD (Feske *et al.* 2007). Dado que CrzA muestra un patrón similar de señalización similar al de estos dos FT, parecía lógico pensar que las señales presentes en CrzA fuesen de una naturaleza similar a las descritas en estas proteínas modelo. Para explorar esta posibilidad, en primer lugar se realizaron análisis bioinformáticos para la identificación de dominios conservados y algunos de ellos fueron posteriormente caracterizados mediante diferentes abordajes experimentales. A continuación se detallan los elementos en *cis* que han sido analizados y que se representan en la figura D3.

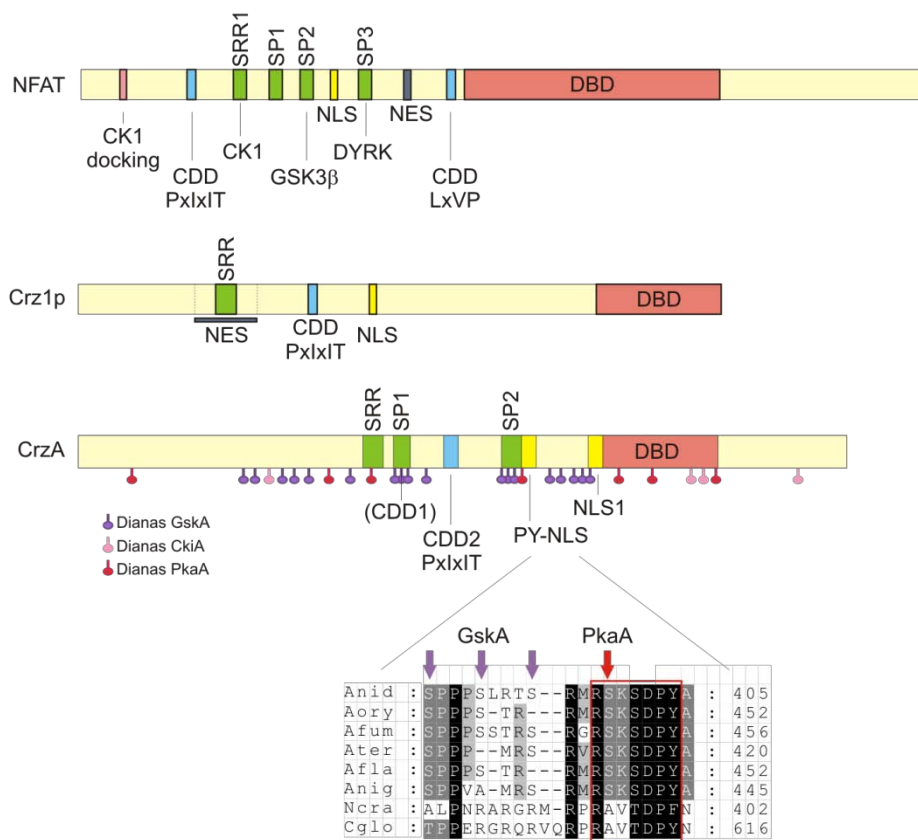


Figura D3: Representación esquemática de los elementos en *cis* que regulan la señalización de los NFAT y Crz1p y los elementos propuestos para CrzA.

### Dominio de unión a la calcineurina, CDD.

La calcineurina reconoce un grupo de aminoácidos en sus sustratos que además le sirven como punto de anclaje para posteriormente realizar su función como fosfatasa. Diferentes trabajos han profundizado en la composición aminoacídica y la funcionalidad de estas secuencias, que se denominan CDD. La búsqueda de CDDs en posibles sustratos de la calcineurina ha sido siempre una primera aproximación para comprender como ocurre dicha señalización.

En el caso de CrzA, una primera búsqueda *in silico* realizada permitió la identificación de dos sitios en la estructura primaria de CrzA con similitud a la secuencia consenso PxlIT establecida para los NFAT y otros miembros de la familia de factores CRZ (Li *et al.* 2011). Estos dos sitios eran solapantes ya que los dos últimos residuos del sitio 1 (PYISPQ) formaban parte del sitio 2 (PQLMPQ). Ambas mostraban un relativo parecido con la secuencia consenso PxlIT pero mayor con la secuencia CDD descrita en Crz1p, PIISIQ, debido principalmente al último residuo de glutamina. Por la similitud de estas secuencias con los CDDs y su disposición en tándem conservada en los Crz de hongos filamentosos, pareció razonable analizar su funcionalidad. Para ello se generó una forma de CrzA carente de ambas secuencias, designadas en conjunto como CDD1, proteína CrzA<sup>ΔCDD1</sup>. La forma CrzA<sup>ΔCDD1</sup> mantuvo la misma señalización que la proteína silvestre CrzA, y de acuerdo con ello, la cepa que expresaba la proteína mutante CrzA<sup>ΔCDD1</sup> toleró la presencia de elevadas concentraciones de calcio y la alcalinidad del medio de la misma manera que una cepa silvestre. Además, la distribución celular dependiente de las condiciones del medio de la proteína CrzA<sup>ΔCDD1</sup> fue idéntica a la de la proteína CrzA silvestre, es decir, que desde el citoplasma en condiciones basales fue importada a los núcleos en presencia de calcio o pH alcalino. Para explicar la evidente ausencia de función del dominio CDD1 en la señalización de CrzA se analizó mediante comparación la composición aminoacídica de las señales CDD funcionales que han sido analizadas en otros sustratos de la calcineurina (Li *et al.* 2007) con las identificadas en nuestra proteína de estudio. Cada uno de los residuos que integran el dominio participa en la conformación espacial que adopta el CDD y lo hace accesible a la superficie de anclaje de la calcineurina (Grigoriu *et al.* 2013). Consideramos que la presencia de un residuo de prolina en la quinta posición debe alterar la estructura de este dominio y dando lugar así a una conformación del CDD1 no reconocible por la calcineurina. No ha sido verificado experimentalmente, pero proponemos que incluir una prolina en posición 5 debe dar lugar a la pérdida de función de una secuencia CDD reconocida por la calcineurina.

Puesto que la diana doble CDD1 no era funcional, en una segunda búsqueda se localizó un tercer sitio con similitud a secuencias alternativas al consenso PxlIT y estudiadas en (Li *et al.*

2011). La secuencia PSINVE identificada en CrzA mostraba mayor similitud con el CDD presente en otra proteína reconocida por la calcineurina, Rcn2, y cuya secuencia es PSITVN (Li *et al.* 2011). La funcionalidad de la secuencia PSINVE, que hemos denominado CDD2, en el reconocimiento de CrzA por la calcineurina se ha demostrado mediante diferentes abordajes experimentales.

En primer lugar se generó una cepa que expresaba una forma de CrzA que carecía del CDD2, CrzA<sup>ΔCDD2</sup>. Esta cepa nos permitió asignar un papel parcial del sitio CDD2 en la funcionalidad de CrzA ya que se produjo una pérdida parcial de función de CrzA en la resistencia al estrés por calcio o pH alcalino. A pesar de que el CDD1 no parecía estar participando inicialmente en la señalización por la calcineurina, podría suceder que funcionase como diana alternativa en ausencia del sitio CDD2. Para comprobar si CDD1 y CDD2 actuaban coordinadamente en la funcionalidad de CrzA se generó una proteína mutante de CrzA que carecía de ambos motivos, CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>. No se observó un efecto adicional en el crecimiento colonial de la cepa portadora de la forma CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> respecto al de la cepa que expresaba CrzA<sup>ΔCDD2</sup>. Por lo tanto, el sitio CDD1 es dispensable para la funcionalidad de CrzA mientras que el sitio CDD2 es necesario para la completa tolerancia a estrés mediada por CrzA. Este resultado muestra que el sitio CDD2 es necesario para la funcionalidad de CrzA y descarta nuevamente que CDD1 sea un motivo funcional. Para determinar el papel de los sitios CDD1 y CDD2 en la señalización de CrzA se analizó el patrón electroforético de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>. La ausencia de estos dos motivos alteró la modificación postraduccional de CrzA en respuesta al estrés. Así, el estrés inducido por calcio promovió la modificación postraduccional de CrzA a tiempos tardíos mientras que la alcalinización del medio no aumentó la movilidad electroforética del FT. Este resultado puso en evidencia que se requiere la presencia de estos motivos para la correcta señalización del FT y sugería que la existencia de una respuesta diferente ante el estrés por calcio o pH alcalino, como se discute más adelante.

La visualización microscópica de la cepa que expresaba la forma CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> también reveló una alteración en la señalización celular dependiente del estímulo, ya que el calcio permitió la importación nuclear del FT con un patrón alterado y permaneció en el citoplasma en un medio alcalino. Dado que la forma CrzA<sup>ΔCDD1</sup> mantenía el control del transporte nucleocitoplásmico característico de la forma silvestre del FT, la alteración en la señalización de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> podría ser consecuencia de la ausencia del dominio CDD2. Cuando se analizó la respuesta a los estímulos de la forma CrzA<sup>ΔCDD2</sup>, se observó la alteración en la importación nuclear similar a la mostrada por la forma CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>. Finalmente los ensayos de interacción proteína-proteína demostraron *in vitro* que la subunidad catalítica de la calcineurina se une al dominio CDD2 presente en CrzA, quedando demostrado que la secuencia PSINVE es un dominio reconocido por la calcineurina y necesario

para la correcta señalización de CrzA. El sitio CDD2 añade una nueva secuencia en la lista de dianas reconocidas por la calcineurina que sugiere la posibilidad de modificar la secuencia establecida hasta la fecha como consenso PxlIT. Mientras que la prolina inicial parece un residuo invariable, las isoleucinas de la tercera y quinta posición en muchos de las dianas descritas son sustituidas por valinas. Además en la mayoría de los casos la treonina final no está tan conservada si no que aparecen diferentes aminoácidos polares. Según esta observación, las secuencias reconocidas por la calcineurina se ajustan a un consenso P x I/V x I/V ζ, donde el último símbolo representa un residuo polar (e.g., Q o E).

El tratamiento del hongo con CsA, el inhibidor de la calcineurina, permitió detectar una disminución en la movilidad electroforética de CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup>. Además, la desfosforilación *in vitro* de los extractos de la cepa que expresa CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> demostraron que la eliminación del sitio CDD2 no impide que la calcineurina pueda continuar actuando sobre CrzA. La existencia de dianas CDD alternativas o la detección de la actividad calcineurina sobre el FT en ausencia de una diana de unión podrían explicar las anteriores observaciones. Para explorar la primera posibilidad se realizó una búsqueda *in silico* de motivos CDD en CrzA. En esta ocasión se buscaron secuencias tanto similares al consenso Pxl/Vxl/Vζ, ya que permitiría encontrar sitios descartados anteriormente por no parecerse a la secuencia PxlIT, como a las del tipo φLxVP (Rodríguez *et al.* 2009). Sin embargo, ninguna de estas búsquedas dio resultados positivos, por lo tanto de existir un tercer CDD, CDD3, su secuencia no es parecida a las definidas hasta la fecha. Este resultado negativo junto con la deficiente interacción entre la calcineurina y la proteína CrzA<sup>ΔCDD2</sup> sugiere que la desfosforilación que se detecta en la proteína CrzA<sup>ΔCDD1+2</sup> no dependería de la existencia de una interacción física entre la calcineurina y CrzA mediada por un tercer CDD. Mientras que la interacción de la calcineurina con sus sustratos mejora la eficiencia de la fosfatasa, ésta no es esencial para el mecanismo de desfosforilación (Grigoriu *et al.* 2013). El anclaje de la calcineurina permite una actividad enzimática más rápida y eficiente, de modo que sin esta interacción la desfosforilación de los sustratos se ve reducida. Al eliminar el sitio CDD2, la señalización de CrzA a nivel molecular y su respuesta celular podrían estar ralentizadas. El hecho de que se detecte señalización en presencia de calcio pero no por la alcalinización del medio estaría de acuerdo, como se discute más adelante, con la intensidad de la señal producida por cada estímulo. Elevadas concentraciones de calcio extracelular podrían estar generando una fuerte señal citoplásmica de calcio como mensajero secundario. Por ello los niveles de calcineurina en su forma activa podrían ser muy elevados y dar lugar a la defosforilación de CrzA incluso en ausencia de un CDD funcional en este FT (ver también sección 3 de Discusión).

**Búsqueda en CrzA de un dominio de unión para la quinasa CkiA.**

La predicción de secuencias diana de ciertas proteína quinasas es relativamente sencillo y para ello se han generado herramientas de búsqueda en la red como la utilizada en esta tesis. Sin embargo, para algunas quinasas se han definido también dianas de anclaje a sus sustratos. En los NFATs se ha demostrado que la secuencia FxxxF actúa como un dominio de unión a la quinasa CK1 (Cheong *et al.* 2011). Esto hizo que nos planteásemos la posibilidad que CrzA también tuviese un sitio de unión a CkiA. Para ello se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de Crz de hongos levaduriformes y filamentosos, el cual no reveló la presencia de residuos conservados con semejanza al consenso FxxxF. Dado que no todos los sustratos de CK1 poseen el dominio FxxxF (como por ejemplo la axina), podría ser que en los hongos la diana de anclaje de la quinasa fuese diferente a la presente en los NFAT (Cheong *et al.* 2011). En *S. cerevisiae* se ha demostrado la unión de Hrr25p con Crz1p aunque el motivo implicado en la interacción no ha sido definido (Kafadar *et al.* 2003). En esta tesis no se ha profundizado más en esta tema sin embargo sería interesante determinar si en *A. nidulans* existe interacción física entre CkiA y CrzA y en caso afirmativo cuál es la secuencia involucrada.

**Regiones o dominios susceptibles de ser fosforilados.**

Los residuos de serina susceptibles de ser fosforilados pueden agruparse en dominios denominados SRR, (*serine rich regions*), y SP (*serine/proline motifs*) y constituyendo así dianas para las actividades de la calcineurina y las quinasas (Feske *et al.* 2007). En este trabajo no se ha abordado experimentalmente la identificación de residuos fosforilados en CrzA. No obstante, se ha podido hacer una aproximación informática que muestra regiones conservadas entre los Crz de hongos filamentosos que pudieran formar parte de dominios SRR y SP (Figura D3). Así hemos encontrado una región rica en serinas entre los aminoácidos 237 y 265 de CrzA que se encuentran conservados entre los hongos filamentosos que podrían formar parte del denominado SRR. Por otra parte, se han identificado dos regiones conservadas con repeticiones serina-prolina que podrían estar indicando los sitios SP, el primero de ellos, SP1, localizado entre los residuos 301 y 310 y el segundo, SP2, entre los residuos 385 y 391.

Proponemos que las regiones SRR y SP contienen los aminoácidos modificados por las quinasas y cuyo estado fosforilado se ha detectado tras los ensayos de desfosforilación *in vitro* de la forma CrzA(1-612). El dominio SP1 está incluido en la región que hemos denominado en esta tesis CDD1 y como ya se ha descrito dicho motivo no participa en la función, señalización o

regulación del transporte nuclear de CrzA. El dominio SP2 contiene tres posibles dianas de GskA y una de PkaA por lo que se vislumbra como el dominio funcional más probable.

### 2.2.2. Elementos reguladores que actúan en *trans*

Hemos denominado como factores en *trans* a aquellos elementos del sistema de señalización y regulación que reconocen específicamente las señales que porta CrzA y actúan modulando la actividad de este factor transcripcional. Este apartado se centra en analizar las principales proteínas del sistema de señalización que puedan estar regulando la modificación postraducciona de CrzA.

### Calcineurina

Dado el alto grado de conservación de la calcineurina es previsible que el mecanismo de actuación sobre sus sustratos sea similar en los diferentes sistemas descritos. Nuestros resultados muestran que en *A. nidulans* la calcineurina se une a dominios específicos que son necesarios para el reconocimiento y anclaje a sus sustratos. Además, la actividad fosfatasa de la calcineurina de este hongo filamentoso es susceptible de regulación por activadores e inhibidores de su función. Por un lado el calcio es imprescindible para promover cambios conformacionales que den lugar a la activación de la calcineurina. La presencia de calcio en el medio promueve la detección de formas desfosforiladas de CrzA. Dado que la desfosforilación de CrzA es dependiente de la calcineurina, el calcio debe ser el responsable de inducir la actividad fosfatasa de la calcineurina. La ciclosporina A es un compuesto natural que tras su unión a las inmunofilinas presentes en la célula da lugar a un complejo que inhibe la actividad de la calcineurina (Liu *et al.* 1991; Wang *et al.* 2005). En *A. nidulans* existen 8 inmunofilinas citoplásmicas (Pemberton, 2006) que podrían formar un complejo con la CsA y así bloquear o modular la actividad fosfatasa de la calcineurina. La incubación del hongo con CsA permitió preservar el estado fosforilado de CrzA lo que indica que la calcineurina no está actuando sobre el FT en presencia de dicho compuesto. Estos resultados muestran que tanto el calcio como la CsA modulan la actividad catalítica de la calcineurina. CrzA es el primer sustrato asignado a la calcineurina en *A. nidulans* y ha contribuido a demostrar la conservación del mecanismo de regulación de esta fosfatasa en un hongo filamentoso.

La fosforilación de los FT Crz1p y NFATs determina su disponibilidad en el núcleo para mediar la respuesta transcripcional. En *A. nidulans* CrzA se acumula en los núcleos en presencia de ciertos estímulos como el calcio o el pH. En ausencia de CnaA, CrzA pierde por completo la

capacidad de ser transportado al interior nuclear frente a las mismas señales inductoras. Dado que en un fondo  $\Delta cnaA$ , CrzA permanece en un estado fosforilado constante, la desfosforilación de CrzA debe estar detrás del proceso de entrada en el núcleo. El estudio de la localización celular de las formas truncadas de CrzA en cepas nulas de la calcineurina apoya esta hipótesis. Como ya se indicó previamente, la región N-terminal de CrzA mantiene las señales *cis* que son reguladas por la calcineurina. Así se explica que la forma CrzA(1-612), que mantiene la señalización por la calcineurina, en la cepa  $\Delta cnaA$  no pueda ser desfosforilado y por ello esté excluido de los núcleos. La acumulación nuclear de la forma CrzA(445-730) es independiente de la calcineurina dado que se encuentra siempre desfosforilada. En resumen, es imprescindible que tenga lugar un proceso de desfosforilación de CrzA mediado por la calcineurina para que pueda ser transportado al interior de los núcleos en respuesta al estrés.

La sobreexpresión de CrzA(445-730) permite la tolerancia al estrés ambiental de una cepa  $\Delta crzA$ . La localización constitutiva de esta forma en los núcleos podría asegurar la respuesta transcripcional de CrzA en ausencia de regulación por la calcineurina. No obstante, la forma CrzA(445-730) no suprime el fenotipo de sensibilidad al estrés por calcio o pH alcalino de una cepa nula de la calcineurina. Este resultado pone de manifiesto que el fenotipo de sensibilidad que muestra la cepa  $\Delta cnaA$  no se debe exclusivamente a la falta de señalización de CrzA en respuesta al estrés por calcio o pH alcalino. De hecho, las cepas  $\Delta crzA$  y  $\Delta cnaA$  muestran diferente grado en la tolerancia al calcio o la alcalinización del medio. En *S. cerevisiae* la cepa nula de la calcineurina y de *CRZ1* muestran el mismo fenotipo de sensibilidad frente a ciertos estreses y la sobreexpresión de *CRZ1* suprime el fenotipo de la cepa nula de calcineurina (Stathopoulos *et al.* 1997). En la levadura, a pesar de que la calcineurina tiene más sustratos aparte de Crz1p, este FT es el principal responsable de la tolerancia a cationes y pH alcalino. Sin embargo en *A. nidulans* existen dos FT que parecen repartirse la función que desempeña Crz1p en la levadura, las proteínas CrzA y SlTA. Además, la alcalinidad del medio es tolerada mediante la actividad de PacC, aparte de por SlTA y CrzA. Por lo tanto, cuando se altera a CrzA sólo se observan su papel en las rutas que regula directamente este FT, como en un medio alcalino o en presencia de elevadas concentraciones de los cationes calcio o manganeso. Por el contrario, la cepa nula de calcineurina muestra severos defectos de crecimiento incluso en ausencia de estrés por lo que su papel en *A. nidulans* no está limitado a la tolerancia al estrés si no que otras rutas son dependientes de su señalización.

La CaM es una proteína con un amplio espectro de actividades, tanto dependientes como independientes de la transducción de señales de calcio como segundo mensajero (Chin *et al.*

## Discusión

---

2000; Cyert, 2001). Su alteración además de interrumpir la señalización de la calcineurina y sus sustratos, afectaría a varias rutas dependientes de CaM e independientes de la fosfatasa. CrzA es uno de los efectores finales de una ruta en la que los elementos señalizadores desempeñan actividades adicionales a la respuesta al estrés ambiental. Así, existe un efecto de propagación de los estímulos que inducen la cascada de señalización, que desencadenan respuestas celulares adicionales al estrés ambiental, y en la que CrzA se ha especializado en la tolerancia a los cationes calcio y manganeso y a la alcalinización del medio extracelular.

## Quinasas

El genoma de *A. nidulans* codifica para 131 quinasas de las cuales algunas son esenciales y otras muestran fenotipos que han sido asociados en mayor o menor medida a diferentes procesos celulares (De Souza *et al.* 2013). El estudio sistemático del kinoma de nuestro hongo modelo no ha proporcionado directamente de resultados útiles para comprender la señalización de CrzA dado que entre los estreses analizados no han sido incluidos el calcio o el pH alcalino. Sería esperable que de existir una actividad quinasa tras la activación de CrzA se observase un fenotipo similar al del nulo de *crzA*.

En esta tesis hemos abordado este estudio mediante genética en reverso. La identificación de las quinasas de CrzA se ha realizado mediante aproximaciones bioinformáticas y por comparación con las rutas de señalización de los FT Crz1p y NFAT. La posterior verificación mediante técnicas de genética en reverso ha demostrado que la predicción de las quinasas CkiA y GskA en la fosforilación de CrzA ha sido acertada. Sin embargo no hemos observado el fenotipo previsto anteriormente y más concretamente se ha observado que tras demostrar el papel de GskA en la fosforilación de CrzA y su transporte nuclear, la cepa nula *gskA* no muestra mayores defectos en el crecimiento en presencia de estrés que el que muestra de por sí en ausencia de estímulos.

Estas quinasas podrían estar actuando de forma indirecta en la señalización de CrzA sin embargo cabe pensar que su actividad recaiga directamente sobre la fosforilación del FT. Esta hipótesis se sustenta en que la predicción de sitios fosforilables en la secuencia de CrzA muestra la presencia de 4 dianas potencialmente reconocibles por CkiA y 18 para GskA. Dado que la región N-terminal de CrzA es la que se modifica por fosforilación, la serina localizada en la posición 173 es la que con mayor probabilidad puede ser modificada por CkiA. Los posibles residuos de GskA se sitúan en el extremo N-terminal de CrzA, sin embargo 3 de estas dianas se localizan en el dominio SP2, conservado entre hongos filamentosos, por lo que podrían ser las mejores candidatas para

ser modificadas. Estos resultados indican que CrzA podría ser un sustrato de las quinasas CkiA y GskA.

En este trabajo no se ha estudiado la señalización de CrzA en un fondo doble mutante para ambas quinasas, lo que podría ser suficiente para anular por completo la fosforilación de CrzA. Las quinasas de la familia GSK3 $\beta$  actúan sobre sustratos previamente fosforilados (Grimes *et al.* 2001). La elevada conservación en la secuencia de GskA con los homólogos eucariotas sugiere la conservación de su mecanismo de acción por lo que muy probablemente este requisito se mantenga en el hongo. CkiA podría realizar la actividad cebadora sobre CrzA que requiere GskA. En ese caso, la ausencia de fosforilación por CkiA bloquearía la consiguiente actividad quinasa de GskA. Dado que en las cepas *ckiA* mutantes CrzA sigue siendo fosforilada, GskA debe actuar de forma independiente a CkiA. Por lo tanto, la actividad cebadora para GskA implica una quinasa alternativa. Las dianas reconocidas por las quinasas GSK3 $\beta$  muestran la secuencia consenso S/TxxxS/T<sup>P</sup>, siendo el quinto residuo un fosfoaminoácido. La presencia de un residuo fosforilable por una actividad PKA en la quinta posición de una diana de GskA del dominio SP sugiere que PkaA sea la quinasa con actividad cebadora. La fosforilación de este residuo podría desencadenar además la fosforilación sucesiva de las tres dianas de GskA adyacentes. Este modelo involucraría a las proteínas de la familia PKA en la señalización de CrzA, lo que guarda relación con el sistema de señalización descrito en los NFAT y Crz1p (ver apartado 1 de discusión).

### **2.3. Dónde y cómo ocurre la señalización de CrzA.**

#### 2.3.1. Señales de localización celular.

La fosforilación es un mecanismo ampliamente utilizado por las células para regular el transporte nucleocitoplásmico de las moléculas, incluyendo el control de la localización nuclear de los FT (Nardozi *et al.* 2010). Esta es la estrategia por la que tanto los NFAT como Crz1p modifican su distribución en la célula en un sistema coordinado en el que la calcineurina y las distintas quinasas añaden o eliminan grupos fosfato a los residuos localizados en señales de tipo NLS y NES (Cyert, 2003; Feske *et al.* 2007). El estudio de las formas truncadas de CrzA ha demostrado la presencia de al menos una NES y dos NLS implicadas en la localización celular de CrzA. La visualización de CrzA(445-730) en los núcleos sugería la presencia de una NLS, que fue posteriormente identificada. La proteína CrzA(445-730) es dirigida al interior de los núcleos de forma constitutiva e independiente de la actividad calcineurina. Por el contrario, la forma CrzA(1-612) mostró una localización celular similar a la de la forma completa, siendo dependiente de estimulación, fosforilación y defosforilación dependiente de calcineurina.

Según los modelos descritos en Crz1p y NFAT, suponemos que la NES de CrzA está expuesta y activa en condiciones basales y que por lo tanto las NLSs deben ser inaccesibles para las carioferinas que median la importación nuclear (Holmberg *et al.* 2002). Suponemos entonces que tras la cascada de activación de la calcineurina, se produce un estado de desfosforilación en CrzA que habrá de conducir a la activación y/o exposición de las NLSs quedando inactivada la NES. En CrzA deben de existir al menos dos NLS, una localizada en las proximidades de los dedos de zinc, NLS1, y otra corriente arriba de ésta en la región N-terminal, que aquí denominamos NLS2. En este trabajo se ha identificado la NLS1, localizada en la región N-terminal adyacente al primer dedo de zinc. La delección de la NLS1 suprimió la acumulación nuclear de forma constitutiva de la proteína CrzA(445-730) y causó la distribución de la proteína por el sincitio esperable de una proteína que carece de señales de localización, lo que además confirma que en esta región de CrzA no hay una NES. El hecho de que el aumento de número de copias de proteínas que carecen de la NLS se visualicen en el núcleo puede deberse a un efecto de compensación de dosis por proteínas con capacidad de unión al DNA que quedan retenidas en los núcleos.

La forma truncada CrzA(1-448), que carece del DBD y de la NLS1, sigue manteniendo una localización citoplásmica en condiciones basales y se transporta a los núcleos tras la inducción de estrés por calcio o alcalino. Esta proteína por tanto, posee una NES que actúa de forma eficiente y una NLS2 que parece tener un papel menor en la importación que la NLS1. Mientras que la NLS1 muestra semejanza a la secuencia consenso NLS clásica, no se identificó una secuencia similar atribuible a la NLS2. Una alternativa a las NLS clásicas son las PY-NLS, que poseen la secuencia consenso  $Rx_{2-5}PY$  y son reconocidas por la importina  $\beta 2$  (Marfori *et al.* 2011; Xu *et al.* 2010). Una búsqueda de este tipo de NLSs en CrzA dio como resultado una posible diana en la región próxima al dominio SP2 donde se localizan varios residuos de serina susceptibles de ser fosforilados por GskA y una diana de PkaA. Futuros análisis funcionales de dicha región permitirán demostrar si CrzA posee una PY-NLS cuya actividad podría estar modulada por los mecanismos de fosforilación propuestos en esta tesis doctoral.

### 2.3.2. El proceso de la transducción de la señal.

Los factores ambientales que promueven la señalización de CrzA determinan un cambio en su distribución celular así como en su estado de modificación postraduccional. Es lógico pensar que para que los elementos señalizadores puedan actuar sobre el sustrato, CrzA, compartan la misma distribución en la célula. La localización de algunos de estos elementos ya ha sido descrita previamente en organismos del género *Aspergillus*. En este trabajo se ha querido ahondar en la

distribución de los componentes de la cascada de señalización de CrzA con el fin de relacionar su función en la respuesta al estrés ambiental.

A pesar de que varios estudios demuestran que el calcio es un estímulo que induce cambios estructurales en las proteínas CaM y calcineurina, la respuesta a nivel celular de estos elementos a altas concentraciones de calcio o alcalinidad no había sido analizada en ningún organismo. Aquí se ha estudiado la respuesta de la calmodulina y la calcineurina frente a los estímulos de estrés que desencadenan la señalización del efector final de la ruta CrzA. La observación de la forma etiquetada de la calmodulina en la cepa generada en este estudio confirmó la distribución polarizada, acumulada en el ápice y septos de las células, previamente descrita en *A. nidulans* (Chen *et al.* 2010; Wang *et al.* 2006). También se ha demostrado que en *A. nidulans* CnaA se acumula en los septos y en el ápice además de presentar una distribución polarizada similar a la descrita en *A. fumigatus* (Juvvadi *et al.* 2008).

CrzA y los elementos de la ruta de transducción CaM y CnaA pueden observarse dispersos en el citoplasma. Dada la necesidad de la actividad calcineurina para la importación nuclear de CrzA es de esperar que la señalización inicial se produzca en el citoplasma. La inducción de estrés por calcio o pH alcalino no reveló cambios en la distribución de CaM o CnaA que mostrasen una acumulación nuclear de estos elementos en respuesta al estrés. Por lo tanto, el heterocomplejo CaM-CnaA-CrzA que habrá de formarse para señalar al FT deberá ser transitorio o desensamblarse durante el proceso de importación nuclear de CrzA. No obstante resaltar que CaM y CnaA no muestran una estricta exclusión nuclear y proponemos que su presencia en el núcleo podría estar relacionada con el mantenimiento de la señalización de CrzA y así impedir su retorno al citoplasma mientras dure la situación de estrés.

El exceso de calcio o la alcalinización del medio tampoco modificaron las acumulaciones en los septos o en el ápice de las hifas tanto de CaM como CnaA. Además, tampoco se observó cambio en la movilidad electroforética de estas proteínas por lo que suponemos que no son modificadas postraduccionalmente por estos estreses. Por lo tanto, los estímulos ambientales desencadenan la transducción de señales que promueven la señalización celular y molecular del efector final, el FT CrzA, pero no de los elementos señalizadores de la ruta.

Del mismo modo, se procedió al análisis de la distribución celular de las quinasas CkiA y GskA. En este trabajo además de verificar la localización de CkiA descrita previamente, es decir, presente en el citoplasma y acumulada en los núcleos (Apostolaki *et al.* 2012), se detectó también en los septos. La localización de la quinasa GskA se describe en este trabajo por primera vez en un hongo filamentoso. GskA reveló una localización celular opuesta a la de CkiA, distribuida

regularmente en el citoplasma, excluida de los núcleos y no acumulada en los septos. La inducción de estrés por calcio o por pH alcalino tampoco promovió cambios en la distribución de las quinasas CkiA y GskA. La distribución antagónica de las quinasas en la célula podría indicar un papel opuesto de estas quinasas en la señalización de CrzA.

En los fondos genéticos *ckiA* mutantes, CrzA se localiza en el citoplasma y es transportado a los núcleos en respuesta al estrés ambiental. La función de CkiA no es necesaria para promover la importación nuclear de CrzA. Dado que se detectan mayores niveles de CkiA en los núcleos, cabría pensar que sea en este compartimento donde se produzca preferentemente la señalización de CrzA. Por lo tanto, CkiA actuaría sobre el FT que ha sido previamente importado a los núcleos en respuesta al estrés. En ese caso, el papel de CkiA podría ser el de promover la fosforilación de CrzA y así favorecer su exportación nuclear finalizado el estrés ambiental. La alteración de la fosforilación de CrzA por CkiA podría detectarse como una ralentización en el proceso de exportación de CrzA. Sin embargo, la observación de CrzA en las cepas que portan mutaciones de pérdida parcial de función de *ckiA* no reveló cambios en la dinámica de exportación del FT. Por lo tanto suponemos que la fosforilación de CrzA por CkiA debe tener un papel menor en el control del transporte nucleocitoplásmico de CrzA.

GSK3 $\beta$  es una quinasa permanentemente activa en el citoplasma en ausencia de estrés (Doble *et al.* 2003) y nuestros datos son congruentes con un modelo en el que GskA esté regulada de forma similar. Además, GskA muestra una exclusión nuclear como sus homólogos en otros organismos (Jope *et al.* 2004) quizás mediado por una NES que la mantenga en el citoplasma. El papel de GskA en el citoplasma podría ser el de mantener a CrzA en su estado fosforilado y excluido de los núcleos en condiciones de ausencia de estrés. Según esta hipótesis, la delección de *gskA* promovería la acumulación de CrzA en los núcleos en condiciones basales y los estímulos potenciarían aún más el importe nuclear. Sin embargo, cuando se visualizó el FT CrzA en el fondo nulo de *gskA* se mantuvo la exclusión nuclear del FT en condiciones basales. Además, en lugar de acelerarse la importación nuclear de CrzA en respuesta al estrés, se observó un retraso en su transporte. Si GskA señala a CrzA en el citoplasma, su función es necesaria para el correcto transporte nucleocitoplásmico del FT.

Estos resultados de nuevo ponen de manifiesto la complejidad del sistema de señalización de CrzA. La desfosforilación de CrzA es realizada por la calcineurina y la ausencia de esta fosfatasa bloquea por completo la importación nuclear del FT. En la fosforilación de CrzA participan las quinasas CkiA y GskA, aunque como ya se ha indicado anteriormente es probable que haya más quinasas implicadas.

### **3. Señales que activan la respuesta de CrzA.**

#### **3.1. Posible papel del calcio citosólico en la señalización de CrzA.**

En *S. cerevisiae*, la activación de la ruta de señalización calmodulina-calcineurina responsable de la importación nuclear de Crz1p se produce tras la elevación de los niveles intracelulares de calcio (Cyert, 2003). La elevación del calcio citoplásmico se puede producir por la entrada del calcio presente en el medio extracelular o por la liberación del calcio acumulado en reservorios intracelulares (Cyert *et al.* 2013). Como ya se ha indicado previamente, CrzA que se localiza en el citoplasma en condiciones basales, es transportado al núcleo en presencia de calcio. Dado que en *A. nidulans* el calcio extracelular puede ser transportado al interior celular de forma muy eficiente (Findon *et al.* 2010), la elevación de los niveles extracelulares de calcio podría dar lugar a la inmediata elevación de los niveles citosólicos de calcio en el hongo. En esta tesis hemos demostrado que la señalización de CrzA se produce mediante la ruta calmodulina-calcineurina. Por lo tanto cabe esperar que cuando añadimos calcio al medio extracelular, sea su transporte y altos niveles intracelulares los que activen la señalización de CrzA.

Al igual que el calcio, la alcalinización del medio desencadena la importación nuclear de CrzA. Cuando se eliminó la expresión de la subunidad catalítica de la calcineurina *cnaA*, CrzA perdió la capacidad de ser transportado a los núcleos en un medio alcalino. Este resultado demostró que la señal del pH es transmitida a CrzA por la calcineurina. Dado que la activación de la calcineurina se produce por calcio, es posible la existencia de una relación entre el pH ambiental y la señalización por calcio. En la levadura *Candida albicans*, la elevación del pH favorece la entrada del calcio presente en el medio extracelular que incrementa la concentración de calcio en el citosol y activa la señalización de Crz1p (Wang *et al.* 2011). De forma análoga, en *A. nidulans* la activación de CrzA en un medio alcalino podría producirse por la elevación del calcio citosólico.

El manganeso también desencadenó la importación nuclear de CrzA. En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la señalización de CrzA por estrés alcalino o por calcio, aunque podemos hacer una interpretación del mecanismo de señalización de CrzA por el manganeso. La calcineurina es un elemento clave en la activación de CrzA, por lo que es probable que la importación de CrzA por manganeso sea controlada por la ruta calmodulina-calcineurina. El catión manganeso tiene la capacidad de unirse a la calmodulina estabilizando la conformación cerrada o apocalmodulina (Senguen *et al.* 2012). La apocalmodulina no puede unirse a la calcineurina para activarla, por lo que si el manganeso señala a CrzA mediante la calcineurina, debe existir una

alternativa en la activación de la ruta. En *S. cerevisiae* las señales de estrés, como la producida por niveles elevados de manganeso, también promueven la elevación de los niveles intracelulares de calcio que activan la señalización de Crz1p (Cyert *et al.* 2013). Es probable que en *A. nidulans* también esté conservado el sistema de adaptación a los diferentes estreses ambientales que son regulados por CrzA mediante la elevación de los niveles intracelulares de calcio. Así, tanto un pH alcalino como la presencia de manganeso en el medio extracelular podrían aumentar los niveles intracelulares de calcio que activen la ruta de señalización de CrzA.

CrzA desempeña un papel esencial en la tolerancia del hongo al estrés por elevadas concentraciones de calcio, manganeso o la alcalinización del medio. Los resultados obtenidos por microscopía demostraron que estos estímulos desencadenan la señalización celular de CrzA. Por el contrario, CrzA no es necesario en la respuesta al estrés por otros cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ) o monovalentes ( $Na^+$  o  $K^+$ ) o por la acidificación del medio. Así, en este trabajo demostramos que ninguno de estos estímulos desencadena la importación nuclear de CrzA. Suponemos que estas señales no deben de inducir la elevación de los niveles intracelulares de calcio que promuevan la transducción de señales para activar a CrzA. Por lo tanto, sólo se debe producir la liberación de calcio y señalización de CrzA para aquellos estímulos que sea necesaria la función de CrzA en la tolerancia al estrés.

### 3.2. Dinámica en la señalización de CrzA.

La concentración de calcio en el citosol de las células eucariotas en condiciones basales es del orden de 0,1  $\mu M$  y un incremento de estos niveles 10 veces por encima, 1  $\mu M$ , produce la activación de respuestas mediadas por el calcio como segundo mensajero. Una vez que el calcio ha desempeñado su papel en la señalización, el calcio es eliminado del citoplasma finalizando así la respuesta celular (Berridge *et al.* 2000). La respuesta al estrés que muestra CrzA en las células de *A. nidulans* podría indicar mecanismos de activación y desactivación de la señal por calcio similares. La naturaleza del estímulo inductor de estrés (adición de calcio o alcalinización del medio extracelular) reveló una diferente respuesta en la señalización de CrzA. Estos resultados nos han permitido hacer una interpretación del mecanismo de activación y desactivación de la señalización por calcio presente en el hongo.

La inducción de estrés por elevadas concentraciones de calcio (50 mM  $CaCl_2$ ), desencadenó la importación de CrzA simultáneamente en todos los núcleos del sincitio donde permaneció al menos 30 minutos. La duración prolongada de la señal sugiere la presencia de una concentración elevada de calcio en el citosol que active la respuesta celular de forma duradera. Así, el calcio

mantendría activada la ruta de la calmodulina-calcineurina que permite la localización nuclear de CrzA donde desencadena la respuesta transcripcional. Una vez restablecidos los niveles citosólicos basales de calcio, se produciría la desactivación de la señal y CrzA sería exportado de nuevo al citoplasma. Dado que no se observó la exportación nuclear del FT en el tiempo analizado (30 minutos), es posible que su presencia en los núcleos sea necesaria para mantener la regulación de la expresión génica. Así, niveles elevados de calcio no permiten la desactivación de la señal por calcio y la ruta de transducción de señales que mantienen a CrzA en el interior de los núcleos permanece activa.

La alcalinización del medio extracelular nos permitió observar la importación nuclear de CrzA así como su exportación en un tiempo menor. Todos los núcleos de la célula mostraron simultáneamente la acumulación de CrzA sin embargo en esta ocasión la duración de esta señal fue temporal ya que al cabo de 10 minutos el FT se localizó en el citoplasma. Dado que CrzA permanece menos tiempo en el interior de los núcleos, el estrés que induce el pH alcalino debe ser menor que el que produce una concentración de calcio elevada ( $\text{CaCl}_2$  50 mM). Por tanto, tras la elevación inicial de los niveles citosólicos de calcio se desencadena la importación nuclear de CrzA y se produce la respuesta transcripcional que permite la adaptación al estrés alcalino. Una vez generada esta respuesta, CrzA es exportado de los núcleos a consecuencia de la desactivación de la señalización por calcio.

### 3.3. Respuesta espacio-temporal de la señal de calcio.

La temporalidad en la importación nuclear de CrzA en un medio alcalino respecto a la respuesta en presencia de elevadas concentraciones de calcio sugería que la duración de la respuesta dependía de la naturaleza o intensidad de la señal. Por ello nos planteamos analizar si niveles inferiores de calcio podrían llegar a mostrar la activación y desactivación de la respuesta de CrzA que se producen en un medio alcalino. Con este fin, se redujo de forma progresiva la concentración del calcio suplementado en el medio. Así, concentraciones finales de 10  $\mu\text{M}$  o 10 nM de  $\text{CaCl}_2$  revelaron una respuesta transitoria en la acumulación de CrzA. Además, el hecho de que *A. nidulans* sea un organismo multinucleado ha permitido detectar una respuesta espaciotemporal en la señalización de CrzA. En vez de producirse la importación de CrzA en todos los núcleos simultáneamente, se observó la importación del FT desde el núcleo más apical y sucesivamente en el resto de núcleos de forma basipeta. Este resultado sugiere la propagación de la señal de forma polarizada e iniciada en la punta de la hifa. Los elementos de la ruta de activación, calmodulina y calcineurina, se localizan por toda la hifa sin embargo muestran una

mayor acumulación en el extremo apical. La calmodulina localizada en la punta podría iniciar la señalización tras la elevación de los niveles citosólicos de calcio que promoverían la importación de CrzA en el núcleo apical. Esta respuesta es transitoria y una vez desencadenada la respuesta transcripcional de CrzA, el FT vuelve a ser transportado al citoplasma. En las células eucariotas los impulsos de calcio se pueden propagar mediante ondas de calcio que permiten la transmisión de la señal en la célula (Berridge *et al.* 2000). Estas ondas de calcio son las que permitirían que la señal llegase hasta los núcleos más alejados de la hifa, donde también se encuentran localizados los elementos de la ruta calmodulina y calcineurina que desencadenarían la importación nuclear de CrzA.

### **4. Respuesta transcripcional de CrzA.**

En este trabajo también se han explorado diferentes aspectos de la función transcripcional de CrzA. Independientemente del tipo de señal que desencadene la señalización de este FT, CrzA es finalmente importado al núcleo donde modulará la expresión de aquellos genes cuyos productos sean necesarios para la adecuada respuesta al estímulo que ha originado dicha señal.

#### **4.1. La respuesta transcripcional al calcio.**

Para comprender la respuesta transcripcional frente al estrés por calcio enfocamos nuestro trabajo hacia la identificación de posibles promotores regulados por la presencia de este catión en el medio extracelular. Entre los posibles candidatos sugeridos por la base de datos podríamos distinguir aquellos que estarían sujetos a la actividad regulatoria de CrzA estudiando su expresión en un fondo genético nulo de este factor transcripcional. Por ello centramos nuestro estudio en un grupo de genes cuyos productos están relacionados con el control del nivel intracelular de calcio, las familias de transportadores de calcio vacuolares PMC, VCX y YVC.

En la levadura, Vcx1p, junto con el transportador de alta afinidad Pmc1p, son los responsables del transporte de calcio en la vacuola, el principal orgánulo de almacenamiento de calcio. Los niveles de expresión de *PMC1* son inducidos por Crz1 mientras que la activación de la calcineurina promueve la represión de la expresión de *VCX1* por un mecanismo aún desconocido (Cyert *et al.* 2013). En *A. nidulans* la expresión de los homólogos de *PMC1*, *pmcA* y *pmcB*, esta inducida por calcio y es dependiente de CrzA (Hagiwara *et al.* 2008). Aquí hemos extendido este estudio transcripcional a las familias VCX y YVC dado que en *A. nidulans* existen varios posibles homólogos para cada uno de los respectivos transportadores en la levadura modelo.

De entre los genes analizados (ver sección III-2 de Resultados), detectamos una regulación dependiente de los niveles de calcio sólo en algunos miembros del grupo de transportadores de baja afinidad, siendo de especial interés el patrón de expresión observado de los genes AN0471 y AN5821. Los trabajos de Hawigara y Spielvogel ya habían demostrado previamente la regulación génica de estos dos genes por CrzA e inducida por la presencia de calcio (AN0471 fue identificado como *vcxA*) (Hagiwara *et al.* 2008; Spielvogel *et al.* 2008). Sin embargo, en este trabajo demostramos que esta regulación no es sólo dependiente de la presencia de calcio si no de su concentración. Así, concentraciones relativamente bajas de calcio (10 mM) estimularon la expresión de los genes AN0471 y AN5821 mientras que una concentración diez veces superior (100 mM) mantuvo cerrada la expresión de ambos genes. Este patrón difería del que mostraban los genes AN7173 y AN6986 (posible homólogo de VNX1p). Éstos mostraron unos niveles de transcripción que variaban en el tiempo tras la inducción por calcio pero que eran independientes de la concentración del catión. La ausencia del factor CrzA no modificó el patrón de expresión de AN7173 y AN6986, pero si alteró notablemente el de AN0471 y AN5821. La expresión de estos genes era indetectable con una baja concentración de calcio pero elevada a tiempos tempranos del tratamiento con la alta concentración del cation. Estos resultados sugieren que existen dos tipos de respuesta a estrés por calcio, por un lado la que estaría mediada por CrzA y por otro la existencia de uno o varios sistemas reguladores independientes. En *Aspergillus* el primer grupo podría contener los miembros de la familia Pmc (PmcA y PmcB) y algunos de la familia Vcx (AN0471<sup>vcxA</sup> y AN5821). Sin embargo, el patrón de expresión de AN0471<sup>vcxA</sup> y AN5821 sugiere que su mecanismo regulador CrzA-dependiente está respondiendo de forma diferente a la concentración de calcio extracelular. Si éste dependiese directamente de CrzA sería necesario proponer un papel dual para este factor transcripcional, es decir que dependiendo de la concentración de calcio pueda actuar como activador o represor transcripcional. En favor de esta hipótesis están los resultados que evidencian, por un lado una regulación en función de la cantidad de calcio extracelular de la localización nuclear de este FT y por el otro de la presencia de dianas consenso de CrzA en los promotores de estos genes cuya distribución podría explicar el efecto dual de este regulador.

CrzA aumenta notablemente su localización nuclear y el tiempo que la mantiene en una proporción directa a la cantidad de calcio presente en el medio. En condiciones de alto nivel de calcio cabría pensar que CrzA es mantenido dentro del núcleo puesto que se precisa su función transcripcional de forma continuada, pudiendo ser ésta positiva o negativa. El estudio de las regiones promotoras de AN0471<sup>vcxA</sup> y AN5821 muestra la presencia de varias secuencias que se ajustan al consenso definido para los CDRE (*calcineurin dependent response element*), G<sup>A</sup>/TGGCTG

## Discusión

(Stathopoulos *et al.* 1997), lo que estaría a favor de un posible efecto transcripcional directo de CrzA si actuase sobre estas dianas. La distribución de los CDRE mostró un patrón similar para ambos genes, AN0471 y AN5821. En ambos casos se detectaron CDRE en la secuencia corriente arriba próxima al punto de inicio de transcripción (según los datos de la base de datos <http://www.aspergillusgenome.org/>) y por otro lado dentro de la región 5' UTR (ver figura D4). Esta distribución de los CDREs explicaría una regulación dual mediada por CrzA. Los CDREs fuera de la región 5' UTR podrían funcionar como UASs mientras que las dianas dentro de dicha región se comportarían como URSs. La cantidad y tiempo de permanencia de CrzA en el núcleo así como la afinidad relativa del FT por cada diana podría estar determinando el nivel de expresión de estos promotores. Queda pendiente la verificación experimental de este modelo de regulación dependiente de CrzA y que presentaría una alternativa a los modelos actuales.

Finalmente mencionar que no se descarta en absoluto un modelo donde esté presente la participación de otros factores transcripcionales. En el artículo de (Hagiwara *et al.* 2008) se mencionan tres posibles reguladores específicos de ruta de la familia binuclear zinc clusters ( $C_6$ ), como son AN2826, AN3420 y AN8774, y de un FT con dedos de zinc clásicos ( $C_2H_2$ ), AN4418, que muestran una regulación de su expresión calcio- y CrzA-dependiente. El papel de estos factores transcripcionales en la respuesta a estrés por calcio se desconoce completamente.

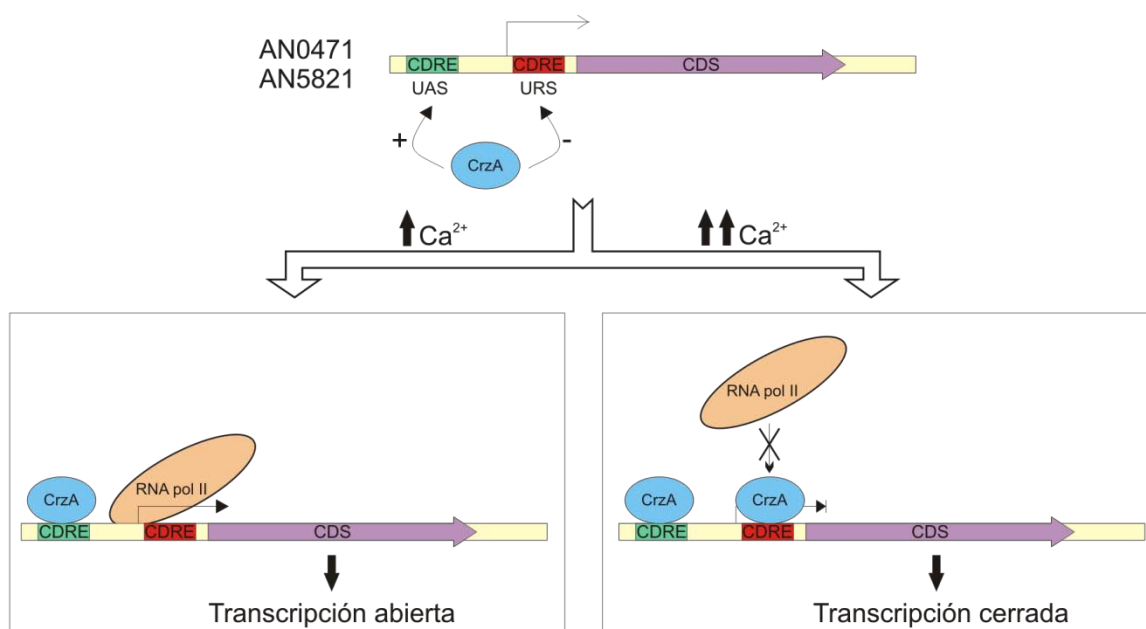
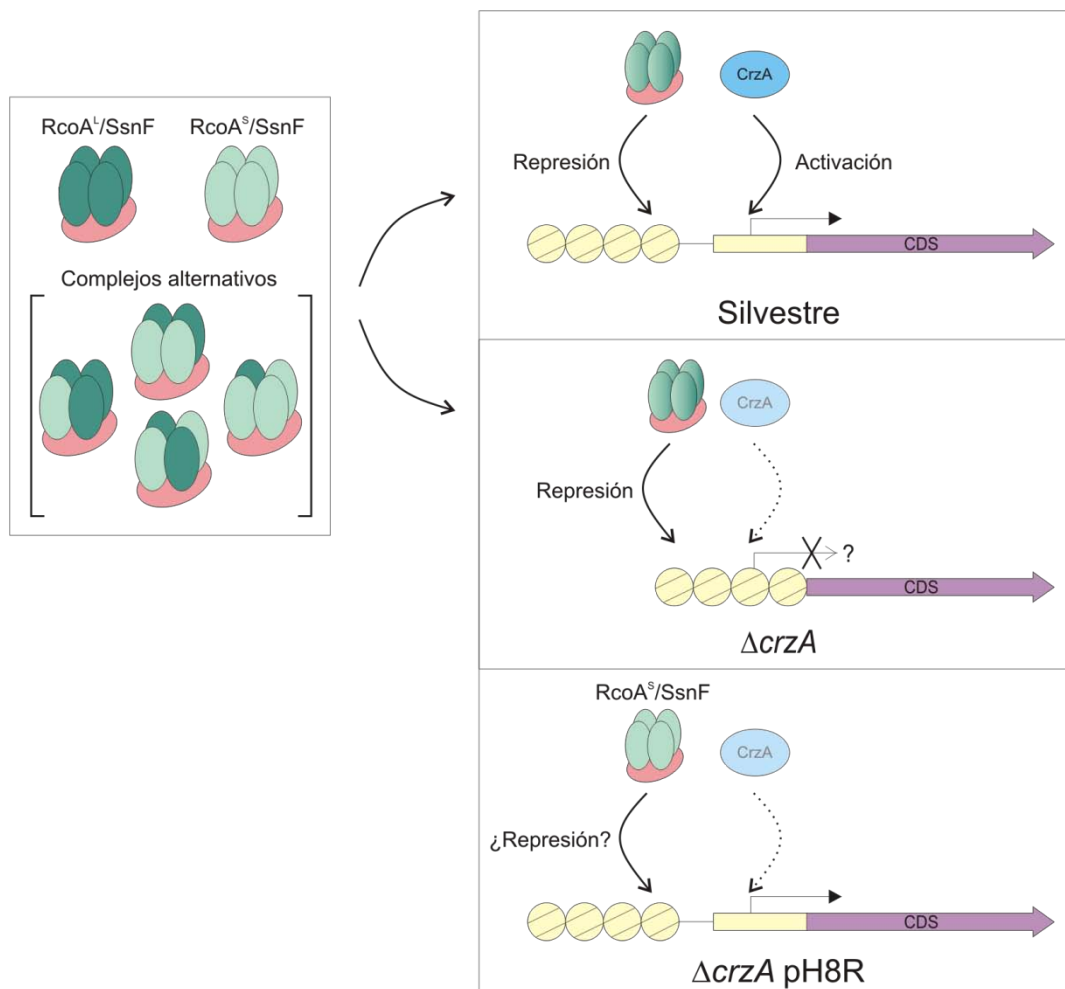


Figura D4: Modelo propuesto de regulación dual de la transcripción mediada por CrzA dependiente de los niveles de calcio.

#### 4.2 Mecanismo de regulación transcripcional en respuesta al pH alcalino.

El abordaje experimental que hemos utilizado para comprender el papel de CrzA en la respuesta al estrés por pH alcalino ha sido completamente diferente al anterior. En este caso hemos aprovechado los recursos del análisis genético clásico que ofrece *A. nidulans* y la colaboración con el Prof. Arst en el IC de Londres. Así se procedió al aislamiento de cepas que portaban mutaciones supresoras del fenotipo de sensibilidad al pH alcalino causado por el alelo  $\Delta crzA$ . Algunas de estas cepas mutantes mostraban tolerancia tanto al pH alcalino como a los altos niveles de calcio. Por otro lado, este grupo inglés estaba caracterizando cepas con mutaciones supresoras aisladas en presencia de altos niveles de calcio (Almeida *et al.* 2013), encontrando en algunos casos mutantes que mostraban tolerancia a ambos estímulos, como en nuestro caso. Aquí nos hemos centrado en la caracterización de aquellas mutaciones que específicamente suprimen el fenotipo de sensibilidad al pH alcalino. Entre los mutantes analizados hemos descrito la caracterización de PH8R-2 y de la mutación aislada en Madrid, PH8R-M2. La interpretación de la mutación encontrada en la secuencia codificante del gen AN6505, RcoA, que codifica para el homólogo del co-represor transcripcional general TUP1 nos ofrece una nueva perspectiva para entender el mecanismo regulatorio tras la respuesta a la alcalinidad.

La proteína RcoA es el homólogo de Tup1p de *S. cerevisiae*, una proteína multidominio que forma un heterocomplejo con Ssn6 y actúa como un correpresor transcripcional con carácter global. En *A. nidulans* RcoA participa en la regulación de la conidiación y ciclo sexual (Hicks *et al.* 2001) así como en la organización del patrón de nucleosomas en los promotores *alcR* y el bidireccional *prnD-prnB* (García *et al.* 2008). El complejo Tup1-Ssn6 consiste en un tetrámero de Tup1 unido a una molécula de Ssn6 (Varanasi *et al.* 1996). En esta tesis hemos demostrado la existencia de un procesamiento o maduración alternativa del transcrito de *rcoA*, que podría dar lugar a dos isoformas de RcoA que hemos denominado RcoA<sup>S</sup>, la forma de 535 aminoácidos, y la forma RcoA<sup>L</sup> de mayor tamaño, 585 aa, y que incluye un dominio de interacción con histonas. La coexistencia de dos formas de TUP1 no es un caso excepcional de *A. nidulans*. En *Schizosaccharomyces pombe* se ha descrito dos genes que codifican para el homólogo de Tup1, Tup11 y Tup12, y pueden interaccionar de forma independiente con Ssn6 dando lugar a formas alternativas del complejo represor (Fagerstrom-Billai *et al.* 2005). No se ha demostrado la formación de heterómeros mediante la combinación de las dos formas. De ser el caso, se podrían sugerir al menos 6 formas posibles (ver figura D5).



**Figura D5: Modelo de regulación de la expresión génica por el factor transcripcional CrzA y el correpressor RcoA/SsnF.** A la izquierda se representa las posibles formas alternativas de RcoA<sup>L</sup> (verde oscuro) y RcoA<sup>S</sup> (verde claro) con el correpressor SsnF (rosa). A la derecha se representan los diferentes modelos de represión y activación transcripcional de genes “alcalinos” en los fondos genéticos silvestre,  $\Delta crzA$  y pH8R.

El complejo TUP1/SSN6 interacciona con diferentes factores transcripcionales sobre el ADN y recluta histona deacetilasas que modifican a las histonas H3 y H4 dando lugar al remodelamiento de la cromatina, teniendo este, en la mayoría de los casos un efecto negativo sobre la transcripción (Smith *et al.* 2000) aunque también se han descrito efectos positivos (Proft *et al.* 2002; Conlan *et al.* 1999). El aislamiento de mutaciones en RcoA/TupA como supresoras de la ausencia de actividad CrzA en respuesta al pH alcalino sugiere un modelo de regulación en el que los genes requeridos para la tolerancia a dicho estrés estarían sometidos a un control positivo por parte de CrzA mientras que el complejo RcoA/SsnF mantendría su función represora (Figura D5). En ausencia de CrzA los promotores “alcalinos” se mantendrían cerrados por la actividad de RcoA/SsnF. Sin embargo la peculiaridad de las mutaciones aisladas sugiere que no es la pérdida total de la función RcoA (verificada con el estudio del alelo nulo) la responsable de dicho fenotipo

supresor, sino que es la presencia de la forma RcoA<sup>S</sup> (ver resultados), y quizás la de la forma truncada correspondiente a RcoA<sup>L</sup>, las que modifiquen el patrón de organización de la cromatina en los genes “alcalinos”. La forma truncada de RcoA<sup>L</sup> mantiene íntegramente el dominio de unión al correpresor SsnF pero se pierden los dominios de unión a histonas y repeticiones WD. Esta proteína podría dar lugar a un complejo represor con SsnF que estuviese alterando la distribución de los nucleosomas y fuese el responsable de la tolerancia al estrés alcalino de la cepa  $\Delta crzA$ . Sin embargo, las cepas que expresaban la forma truncada de RcoA no permitieron la supresión al pH alcalino de la cepa  $\Delta crzA$ . Proponemos que la ausencia de RcoA<sup>L</sup> en la formación del complejo con SsnF permite la desrepresión de determinados promotores entre los que se incluyen los que precisan la actividad de CrzA a pH alcalino.

Las mutaciones PH8R-2 y –M2 no suprimen el fenotipo de sensibilidad a calcio causado por el alelo  $\Delta crzA$  lo que puede ser interpretado en dos sentidos, por un lado que RcoA no regula los genes requeridos para la respuesta a elevadas concentraciones de calcio o que la forma RcoA<sup>S</sup> sigue ejerciendo su papel como regulador negativo para ese tipo de genes. Un papel diferencial en la respuesta a estrés catiónico ya ha sido propuesto para las formas Tup11 y Tup12, donde, por ejemplo, Tup12 es necesario en la respuesta a estrés inducido por calcio o potasio (Fagerstrom-Billai *et al.* 2005). El estudio por separado de cada una de las formas RcoA en la célula permitirá establecer sus funciones y lo que nos parece más interesante determinar si existe una interacción genética con mutaciones de pérdida de función en *sltA* o en el sistema de pH ambiental mediado por PacC. Así se podrá delimitar si la respuesta a estrés por pH alcalino es diferente para cada sistema regulador o si un grupo determinado de genes es regulado de forma coordinada por los tres factores transcripcionales CrzA, SltA y PacC, y negativamente por RcoA/SsnF. Sin descartar la intervención de factores adicionales tanto positivos como negativos.



## **CONCLUSIONES**



1. El factor transcripcional CrzA se modifica postraduccionalmente de forma reversible mediante, al menos, fosforilación de residuos en la región amino terminal al dominio de unión al DNA. Se han detectado cinco formas modificadas de este factor mediante técnicas electroforéticas, diferentes condiciones de cultivo y fondos genéticos mutantes.

2. CrzA es sustrato de la fosfatasa calcineurina, cuya subunidad catalítica se denomina CnaA en *A. nidulans*. CnaA reconoce un motivo de unión en el factor transcripcional a través del cual media su actividad defosforilante.

3. Las actividades de las quinasas CkiA y GskA, pertenecientes a las familias casein kinase I y glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , respectivamente, modifican el estado postraduccional de CrzA.

4. Elevadas concentraciones de calcio y manganeso, y la alcalinización del medio extracelular son señales que inducen la acumulación nuclear de CrzA. La actividad CnaA se requiere para esta correcta respuesta del factor transcripcional a estos estreses y la actividad de GskA se requiere para la correcta acumulación nuclear frente a estrés por alcalinidad.

5. La calmodulina, la calcineurina (subunidad catalítica) y las quinasas CkiA y GskA mantienen su localización celular en aquellas condiciones ambientales que inducen la acumulación nuclear de CrzA, por lo tanto, el factor transcripcional es el elemento de esta ruta de regulación génica que modifica su localización celular en respuesta a estrés.

6. CrzA presenta dos localizaciones celulares opuesta, acumulación nuclear en presencia de estrés y exclusión nuclear en condiciones de ausencia de estrés. Al menos una señal de exportación nuclear y dos señales de localización nuclear están presentes en la estructura primaria de CrzA, esta organización funcional en este factor está conservada con los factores de los sistemas estudiados en levaduras o en eucariotas superiores. Sin embargo las rutas de transporte no están conservadas entre los ascomicetos *S. cerevisiae* y *A. nidulans*.

7. CrzA se requiere para la tolerancia a la alcalinización del medio por el hongo. El represor transcripcional RcoA participa en este proceso de regulación de expresión génica. La caracterización de mutantes en RcoA ha demostrado la existencia de un sistema alternativo de procesamiento del mRNA de RcoA que da lugar a dos formas con longitud diferente para RcoA. Una de dichas formas podría ser la responsable de la regulación, quizás negativa, sobre la expresión de genes necesarios para la tolerancia al pH alcalino.

8. Se ha investigado el papel del calcio y de CrzA en la regulación de la expresión de genes codificantes para transportadores vacuolares de calcio. Se han identificado y analizado la

## Conclusiones

---

expresión de cuatro homólogos del transportador de baja afinidad “vacuolar cation exchanger”, VCX, y del canal “vacuolar cation channel”, YVC. Sólo dos transportadores VCX, *vcxA* y AN5821, son regulados por calcio y por CrzA. La concentración de calcio tiene un efecto diferencial sobre la expresión de estos genes, una baja concentración de calcio es inductora mientras que una alta concentración tiene un efecto negativo. CrzA podría estar mediando ambos efectos transcripcionales opuestos.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Almeida RS, Loss O, Colabardini AC, Brown NA, Bignell E, Savoldi M, Pantano S, Goldman MH, Arst HN, Jr., Goldman GH.** 2013. Genetic Bypass of *Aspergillus nidulans* crzA Function in Calcium Homeostasis. *G3.(Bethesda.)* .
- Apostolaki A, Harispe L, Calcagno-Pizarelli AM, Vangelatos I, Sophianopoulou V, Arst HN, Jr., Penalva MA, Amillis S, Scazzocchio C.** 2012. *Aspergillus nidulans* CkiA is an essential casein kinase I required for delivery of amino acid transporters to the plasma membrane. *Mol.Microbiol.* **84**, 530-549.
- Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG.** 1998. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol.Cell* **1**, 627-637.
- Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A.** 1999. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* **285**, 2129-2133.
- Bailey CR, Penfold HA, Arst HN, Jr.** 1979. Cis-dominant regulatory mutations affecting the expression of GABA permease in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Gen.Genet.* **169**, 79-83.
- Banuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S.** 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144** ( Pt 10), 2749-2758.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1**, 11-21.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S.** 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics.* **4**, 1633-1649.
- Bodvard K, Jorhov A, Blomberg A, Molin M, Kall M.** 2013. The yeast transcription factor Crz1 is activated by light in a Ca<sup>2+</sup>/calcineurin-dependent and PKA-independent manner. *PLoS.One.* **8**, e53404.
- Boustany LM, Cyert MS.** 2002. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.* **16**, 608-619.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Caddick MX, Arst HN, Jr.** 1986a. Structural genes for phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genet.Res.* **47**, 83-91.
- Caddick MX, Brownlee AG, Arst HN, Jr.** 1986b. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Gen.Genet.* **203**, 346-353.
- Cardenas ME, Hemenway C, Muir RS, Ye R, Fiorentino D, Heitman J.** 1994. Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.* **13**, 5944-5957.

## Bibliografía

---

- Chang PK.** 2008. *Aspergillus parasiticus* crzA, which encodes calcineurin response zinc-finger protein, is required for aflatoxin production under calcium stress. *Int.J.Mol.Sci.* **9**, 2027-2043.
- Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC.** 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**, 42-48.
- Chen S, Song Y, Cao J, Wang G, Wei H, Xu X, Lu L.** 2010. Localization and function of calmodulin in live-cells of *Aspergillus nidulans*. *Fungal.Genet.Biol.* **47**, 268-278.
- Chen YL, Brand A, Morrison EL, Silao FG, Bigol UG, Malbas FF, Jr., Nett JE, Andes DR, Solis NV, Filler SG, Averette A, Heitman J.** 2011. Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. *Eukaryot.Cell* **10**, 803-819.
- Chen YL, Konieczka JH, Springer DJ, Bowen SE, Zhang J, Silao FG, Bungay AA, Bigol UG, Nicolas MG, Abraham SN, Thompson DA, Regev A, Heitman J.** 2012. Convergent Evolution of Calcineurin Pathway Roles in Thermotolerance and Virulence in *Candida glabrata*. *G3.(Bethesda.)* **2**, 675-691.
- Cheong JK, Virshup DM.** 2011. Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **43**, 465-469.
- Chin D, Means AR.** 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10**, 322-328.
- Choi J, Kim Y, Kim S, Park J, Lee YH.** 2009. MoCRZ1, a gene encoding a calcineurin-responsive transcription factor, regulates fungal growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal.Genet.Biol.* **46**, 243-254.
- Church GM, Gilbert W.** 1984. Genomic sequencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 1991-1995.
- Clapham DE.** 2007. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-1058.
- Clutterbuck AJ.** 1993. *Aspergillus nidulans*, nuclear genes. In: O'Brien SJ, ed. *Genetic maps, Vol. Locus maps of complex genomes.*: Cold Spring Harbor Laboratory press, pp. 371-384.
- Conlan RS, Gounalaki N, Hatzis P, Tzamarias D.** 1999. The Tup1-Cyc8 protein complex can shift from a transcriptional co-repressor to a transcriptional co-activator. *J.Biol.Chem.* **274**, 205-210.
- Cove DJ.** 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim.Biophys.Acta* **113**, 51-56.
- Crabtree GR, Olson EN.** 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-S79.
- Cunningham KW, Fink GR.** 1994. Ca<sup>2+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Exp.Biol.* **196**, 157-166.
- Cyert MS.** 2001. Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu.Rev.Genet.* **35**, 647-672.
- Cyert MS.** 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **311**, 1143-1150.

- Cyert MS, Philpott CC.** 2013. Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**, 677-713.
- De Souza CP, Hashmi SB, Osmani AH, Andrews P, Ringelberg CS, Dunlap JC, Osmani SA.** 2013. Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS.One.* **8**, e58008.
- Doble BW, Woodgett JR.** 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J.Cell Sci.* **116**, 1175-1186.
- Espeso EA, Penalva MA.** 1996. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J.Biol.Chem.* **271**, 28825-28830.
- Espeso EA, Roncal T, Diez E, Rainbow L, Bignell E, Alvaro J, Suarez T, Denison SH, Tilburn J, Arst HN, Jr., Penalva MA.** 2000. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* **19**, 719-728.
- Espeso EA, Tilburn J, Arst HN, Jr., Penalva MA.** 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**, 3947-3956.
- Etxebeste O, Markina-Inarrairaegui A, Garzia A, Herrero-Garcia E, Ugalde U, Espeso EA.** 2009. Kapl, a non-essential member of the Pse1p/Imp5 karyopherin family, controls colonial and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **155**, 3934-3945.
- Fagerstrom-Billai F, Wright AP.** 2005. Functional comparison of the Tup11 and Tup12 transcriptional corepressors in fission yeast. *Mol.Cell Biol.* **25**, 716-727.
- Feske S, Rao A, Hogan PG.** 2007. The Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signalling pathway. In: Krebs J, Michalak M, eds. *Calcium: a matter of life or death*, Elsevier.
- Fillinger S, Chaverocche MK, Shimizu K, Keller N, d'Enfert C.** 2002. cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol.Microbiol.* **44**, 1001-1016.
- Findon H, Calcagno-Pizarelli AM, Martinez JL, Spielvogel A, Markina-Inarrairaegui A, Indrakumar T, Ramos J, Penalva MA, Espeso EA, Arst HN, Jr.** 2010. Analysis of a novel calcium auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Fungal.Genet.Biol.* **47**, 647-655.
- Forde JE, Dale TC.** 2007. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol.Life Sci.* **64**, 1930-1944.
- Garcia I, Mathieu M, Nikolaev I, Felenbok B, Scazzocchio C.** 2008. Roles of the *Aspergillus nidulans* homologues of Tup1 and Ssn6 in chromatin structure and cell viability. *FEMS Microbiol.Lett.* **289**, 146-154.
- Gorlach J, Fox DS, Cutler NS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J.** 2000. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* **19**, 3618-3629.
- Grigoriu S, Bond R, Cossio P, Chen JA, Ly N, Hummer G, Page R, Cyert MS, Peti W.** 2013. The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS.Biol.* **11**, e1001492.

- Grimes CA, Jope RS.** 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog.Neurobiol.* **65**, 391-426.
- Guerini D.** 1997. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **235**, 271-275.
- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A.** 2006. A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **441**, 646-650.
- Hagiwara D, Kondo A, Fujioka T, Abe K.** 2008. Functional analysis of C2H2 zinc finger transcription factor CrzA involved in calcium signaling in *Aspergillus nidulans*. *Curr.Genet.* **54**, 325-338.
- Hernandez-Lopez MJ, Panadero J, Prieto JA, Randez-Gil F.** 2006. Regulation of salt tolerance by *Torulaspota delbrueckii* calcineurin target Crz1p. *Eukaryot.Cell* **5**, 469-479.
- Hicks J, Lockington RA, Strauss J, Dieringer D, Kubicek CP, Kelly J, Keller N.** 2001. RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol.Microbiol.* **39**, 1482-1493.
- Hilioti Z, Cunningham KW.** 2003. The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **311**, 1089-1093.
- Hilioti Z, Gallagher DA, Low-Nam ST, Ramaswamy P, Gajer P, Kingsbury TJ, Birchwood CJ, Levchenko A, Cunningham KW.** 2004. GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev.* **18**, 35-47.
- Hirayama S, Sugiura R, Lu Y, Maeda T, Kawagishi K, Yokoyama M, Tohda H, Giga-Hama Y, Shuntoh H, Kuno T.** 2003. Zinc finger protein Prz1 regulates Ca<sup>2+</sup> but not Cl<sup>-</sup> homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *J.Biol.Chem.* **278**, 18078-18084.
- Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L.** 2002. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem.Sci.* **27**, 619-627.
- Hunter T.** 2012. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **367**, 2513-2516.
- Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Ohmiya N, Niwa Y, Goto H.** 2007. Acetate inhibits NFAT activation in T cells via importin beta1 interference. *Eur.J.Immunol.* **37**, 2309-2316.
- Jope RS, Johnson GV.** 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem.Sci.* **29**, 95-102.
- Joseph JD, Means AR.** 2002. Calcium binding is required for calmodulin function in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot.Cell* **1**, 119-125.
- Juvvadi PR, Fortwendel JR, Pinchai N, Perfect BZ, Heitman J, Steinbach WJ.** 2008. Calcineurin localizes to the hyphal septum in *Aspergillus fumigatus*: implications for septum formation and conidiophore development. *Eukaryot.Cell* **7**, 1606-1610.

- Juvvadi PR, Fortwendel JR, Rogg LE, Burns KA, Randell SH, Steinbach WJ.** 2011. Localization and activity of the calcineurin catalytic and regulatory subunit complex at the septum is essential for hyphal elongation and proper septation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol.Microbiol.* **82**, 1235-1259.
- Kafadar KA, Cyert MS.** 2004. Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot.Cell* **3**, 1147-1153.
- Kafadar KA, Zhu H, Snyder M, Cyert MS.** 2003. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev.* **17**, 2698-2708.
- Karababa M, Valentino E, Pardini G, Coste AT, Bille J, Sanglard D.** 2006. CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol.Microbiol.* **59**, 1429-1451.
- Kehlenbach RH, Dickmanns A, Gerace L.** 1998. Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J.Cell Biol.* **141**, 863-874.
- Keyser P, Borge-Renberg K, Hultmark D.** 2007. The *Drosophila* NFAT homolog is involved in salt stress tolerance. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **37**, 356-362.
- Kingsbury TJ, Cunningham KW.** 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev.* **14**, 1595-1604.
- Kishi T, Ikeda A, Nagao R, Koyama N.** 2007. The SCFCdc4 ubiquitin ligase regulates calcineurin signaling through degradation of phosphorylated Rcn1, an inhibitor of calcineurin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 17418-17423.
- Klee CB, Crouch TH, Krinks MH.** 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 6270-6273.
- Klee CB, Ren H, Wang X.** 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J.Biol.Chem.* **273**, 13367-13370.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lev S, Desmarini D, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Djordjevic JT.** 2012. The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity. *PLoS.One.* **7**, e51403.
- Li H, Rao A, Hogan PG.** 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol.* **21**, 91-103.
- Li H, Zhang L, Rao A, Harrison SC, Hogan PG.** 2007. Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *J.Mol.Biol.* **369**, 1296-1306.
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL.** 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.
- Liu JO.** 2003. Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **311**, 1103-1109.
- Liu JO.** 2009. Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunol.Rev.* **228**, 184-198.

## Bibliografía

---

- Macara IG.** 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **65**, 570-94, table.
- Mancini M, Toker A.** 2009. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat.Rev.Cancer* **9**, 810-820.
- Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NF, Curmi PM, Forwood JK, Boden M, Kobe B.** 2011. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim.Biophys.Acta* **1813**, 1562-1577.
- Markina-Inarrairaegui A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Araujo-Bazan L, Fernandez-Martinez J, Flores JA, Osmani SA, Espeso EA.** 2011. Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Biol.Cell* **22**, 3874-3886.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW.** 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**, 3445-3458.
- Mehta S, Li H, Hogan PG, Cunningham KW.** 2009. Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Mol.Cell Biol.* **29**, 2777-2793.
- Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, de Larrinoa IF.** 1998. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* **425**, 323-328.
- Meselson M, Yuan R.** 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217**, 1110-1114.
- Miao L, Schulten K.** 2009. Transport-related structures and processes of the nuclear pore complex studied through molecular dynamics. *Structure.* **17**, 449-459.
- Mingot JM, Espeso EA, Diez E, Peñalva MA.** 2001. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol.Cell Biol.* **21**, 1688-1699.
- Nardoizzi JD, Lott K, Cingolani G.** 2010. Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun.Signal.* **8**, 32.
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR.** 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.
- Ni M, Rierson S, Seo JA, Yu JH.** 2005. The pkaB gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with pkaA and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot.Cell* **4**, 1465-1476.
- Niki I, Yokokura H, Sudo T, Kato M, Hidaka H.** 1996. Ca<sup>2+</sup> signaling and intracellular Ca<sup>2+</sup> binding proteins. *J.Biochem.* **120**, 685-698.
- Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A.** 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol.Cell* **6**, 539-550.
- Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A.** 2004. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol.Cell Biol.* **24**, 4184-4195.

- Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN, Peñalva MA.** 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622-1632.
- Pan F, Sun L, Kardian DB, Whartenby KA, Pardoll DM, Liu JO.** 2007. Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature* **445**, 433-436.
- Pantazopoulou A, Peñalva MA.** 2009. Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol.Biol.Cell* **20**, 4335-4347.
- Pemberton LF, Paschal BM.** 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic.* **6**, 187-198.
- Pemberton TJ.** 2006. Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires. *BMC.Genomics* **7**, 244.
- Penalva MA, Arst HN, Jr.** 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**, 426-46, table.
- Perrino BA, Ng LY, Soderling TR.** 1995. Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain. *J.Biol.Chem.* **270**, 340-346.
- Polizotto RS, Cyert MS.** 2001. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J Cell Biol.* **154**, 951-960.
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AW.** 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv.Genet.* **5**, 141-238.
- Proft M, Struhl K.** 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol.Cell* **9**, 1307-1317.
- Rao A, Luo C, Hogan PG.** 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 707-747.
- Rasmussen CD, Means RL, Lu KP, May GS, Means AR.** 1990. Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. *J.Biol.Chem.* **265**, 13767-13775.
- Rispail N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grunler A, Huguet R, Perez-Nadales E, Poli A, Sartorel E, Valiante V, Yang M, Beffa R, Brakhage AA, Gow NA, Kahmann R, Lebrun MH, Lenasi H, Perez-Martin J, Talbot NJ, Wendland J, Di PA.** 2009. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal.Genet.Biol.* **46**, 287-298.
- Rodriguez A, Roy J, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Nino-Moreno P, Orti L, Pantoja-Uceda D, Pineda-Lucena A, Cyert MS, Redondo JM.** 2009. A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol.Cell* **33**, 616-626.
- Rossi A, Arst HN, Jr.** 1990. 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.* **54**, 51-53.
- Roy J, Li H, Hogan PG, Cyert MS.** 2007. A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and in vivo function. *Mol.Cell* **25**, 889-901.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos M, de Larrinoa IF.** 2005. Functional characterization of the *Candida albicans* CRZ1 gene encoding a calcineurin-regulated transcription factor. *Curr.Genet.* **48**, 88-100.
- Schumacher J, de Larrinoa IF, Tudzynski B.** 2008. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. *Eukaryot.Cell* **7**, 584-601.
- Senguen FT, Grabarek Z.** 2012. X-ray structures of magnesium and manganese complexes with the N-terminal domain of calmodulin: insights into the mechanism and specificity of metal ion binding to an EF-hand. *Biochemistry* **51**, 6182-6194.
- Serrano R.** 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int.Rev.Cytol.* **165**, 1-52.
- Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P.** 2002. Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J.Biol.Chem.* **277**, 48664-48676.
- Shimizu K, Keller NP.** 2001. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**, 591-600.
- Sieber M, Baumgrass R.** 2009. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun.Signal.* **7**, 25.
- Smith RL, Johnson AD.** 2000. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem.Sci.* **25**, 325-330.
- Soriani FM, Malavazi I, da Silva Ferreira ME, Savoldi M, Von Zeska Kress MR, de Souza Goldman MH, Loss O, Bignell E, Goldman GH.** 2008. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Mol.Microbiol.* **67**, 1274-1291.
- Spielvogel A, Findon H, Arst HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P, Stahl U, Meyer V, Espeso EA.** 2008. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem.J.* **414**, 419-429.
- Stathopoulos AM, Cyert MS.** 1997. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**, 3432-3444.
- Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS.** 1999. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev.* **13**, 798-803.
- Steinbach WJ, Reedy JL, Cramer RA, Jr., Perfect JR, Heitman J.** 2007. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat.Rev.Microbiol.* **5**, 418-430.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.

- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA, Arst HN, Jr.** 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779-790.
- Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW.** 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-221.
- Varanasi US, Klis M, Mikesell PB, Trumbly RJ.** 1996. The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol.Cell Biol.* **16**, 6707-6714.
- Vincent O, Rainbow L, Tilburn J, Arst HN, Jr., Penalva MA.** 2003. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol.Cell Biol.* **23**, 1647-1655.
- Wang G, Lu L, Zhang CY, Singapuri A, Yuan S.** 2006. Calmodulin concentrates at the apex of growing hyphae and localizes to the Spitzenkorper in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* **228**, 159-166.
- Wang H, Liang Y, Zhang B, Zheng W, Xing L, Li M.** 2011. Alkaline stress triggers an immediate calcium fluctuation in *Candida albicans* mediated by Rim101p and Crz1p transcription factors. *FEMS Yeast Res.* **11**, 430-439.
- Wang P, Heitman J.** 2005. The cyclophilins. *Genome Biol.* **6**, 226.
- Watanabe Y, Perrino BA, Soderling TR.** 1996. Activation of calcineurin A subunit phosphatase activity by its calcium-binding B subunit. *Biochemistry* **35**, 562-566.
- Wu H, Peisley A, Graef IA, Crabtree GR.** 2007. NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends Cell Biol.* **17**, 251-260.
- Xu D, Farmer A, Chook YM.** 2010. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **20**, 782-790.
- Yang L, Ukil L, Osmani A, Nahm F, Davies J, De Souza CP, Dou X, Perez-Balaguer A, Osmani SA.** 2004. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot.Cell* **3**, 1359-1362.
- Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS.** 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol.Chem.* **277**, 31079-31088.
- Zhang H, Zhao Q, Liu K, Zhang Z, Wang Y, Zheng X.** 2009. MgCRZ1, a transcription factor of *Magnaporthe grisea*, controls growth, development and is involved in full virulence. *FEMS Microbiol.Lett.* **293**, 160-169.
- Zhang T, Xu Q, Sun X, Li H.** 2013. The calcineurin-responsive transcription factor Crz1 is required for conidation, full virulence and DMI resistance in *Penicillium digitatum*. *Microbiol.Res.* **168**, 211-222.