

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



## TESIS DOCTORAL

### **Percepción del ambiente alcalino por *Aspergillus nidulans*: el módulo receptor-transductor**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Daniel Lucena Agell**

Director

Miguel Ángel Peñalva Soto

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



# Percepción del ambiente alcalino por *Aspergillus nidulans*: el módulo receptor-transductor

---



Memoria presentada por Daniel Lucena Agell para optar al grado de doctor.

**TESIS DOCTORAL**  
**DANIEL LUCENA AGELL**  
**2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



# Percepción del ambiente alcalino por *Aspergillus nidulans*: el módulo receptor-transductor

---



Memoria presentada por Daniel Lucena Agell para optar al grado de doctor.

Director de Tesis:

Miguel Ángel Peñalva Soto  
Prof. de investigación del C.S.I.C.  
Centro de Investigaciones Biológicas  
C.S.I.C

Tutor:

Humberto Martín Brieva  
Departamento de Microbiología II  
Facultad de Farmacia  
Universidad Complutense de Madrid

**TESIS DOCTORAL**  
**DANIEL LUCENA AGELL**

**2014**



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el centro de investigaciones Biológicas (C.I.B.) del CSIC bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Peñalva Soto, Profesor de Investigación del CSIC y coordinador de la Unidad de Genética Molecular de *Aspergillus nidulans*.

El Trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos de la Dirección General de Investigación a través de los proyectos BIO2009-07281 y BIO2012-30965 y por una beca F.P.I del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España asignada al proyecto BIO2009-07281 y concedida al doctorando Daniel Lucena Agell.

## ABREVIATURAS

3'UTR: 3' untranslated región o región 3' no transcrita

5'UTR: 5' untranslated región o región 5' no transcrita

Af: *Aspergillus fumigatus*

cDNA: Ácido dexosirribonucleico codificante

DBD: Dominio de unión a DNA

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: Ácido etilen diamino tetra-acético

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GPCR: Receptor acoplado a proteína G (*G Protein-Coupled Receptor*)

*gpdA<sup>mini</sup>*: Fragmento del promotor del gen codificante de la gliceraldehido 3-P deshidrogenasa

GRK: Quinasa de GPCR (*G protein-coupled receptor Kinase*)

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- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

kb: Kilo base

kDa: Kilo Dalton

MCA: Medio completo de *Aspergillus*

mCh: proteína rojo-cereza fluorescente monomérica (*Monomeric cherry fluorescent protein*)

MFA: Medio fermentación de *Aspergillus*

MMA: Medio mínimo de *Aspergillus*

MMR: Medio mínimo de regeneración

MMR-TOP: Medio mínimo de regeneración-TOP

myc: Residuos 408-439 de la proteína p62c-myc humana

NLS: Señal de localización nuclear

ORF: Fase de lectura (*Open Reading Frame*)

PABA: Ácido p-aminobenzoico

PAGE: *Polyacrylamide gel electrophoresis*

pb: Par de bases

PEG: Polietilenglicol

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PSA: Persulfato amónico

rpm: Revoluciones por minuto

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAsa: Ribonucleasa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: N, N, N, N-tetrametilendiamina

Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano

UTR: Región no traducida

UV: Ultravioleta

WMM: Medio Mínimo para microscopía (*Watch minimal médium*)

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

***ÍNDICE***

# ÍNDICE

<a href="#">A-Summary</a>	1
A.1-Introduction	1
A.2-Main objectives and results	2
A.3-Conclusions	4
<b>1-INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.1-La transducción de señales: el mecanismo de respuesta estímulos extracelulares	6
1.2-Receptores acoplados a proteínas G y arrestinas: funcionamiento y regulación	7
1.2.1-Los receptores acoplados a proteína G heterotrimérica	8
1.2.1.A-La superfamilia de los GPCRs	9
1.2.1.B-Estructura y activación de los GPCRs	11
1.2.1.B.1-Reordenamientos a gran escala de las hélices transmembrana	12
1.2.1.B.2-Interruptores moleculares	13
1.2.1.B.3-Disparadores de la activación dependientes del ligando	14
1.2.1.B.4-El papel de las proteínas G en la activación	14
1.2.2-Las arrestinas	15
1.2.2.A-La superfamilia de las arrestinas	15
1.2.2.B-Estructura, activación y función de las arrestinas	16
1.2.3-El paradigma de los GPCRs	16
1.2.4-Otros papeles de las arrestinas: rompiendo con el paradigma de los GPCRs	18
1.3-La adaptación al pH por parte de los organismos	19
1.3.1-La respuesta al pH en los hongos: generalidades e implicaciones	21
1.3.1.A-La patogénesis fúngica y la ruta de señalización por pH	22
1.4- <i>Aspergillus nidulans</i> como organismo modelo de la ruta de señalización por pH ambiental	22
1.4.1-Genética formal de la señalización por pH ambiental	23
1.4.2-PacC: El factor de transcripción de la ruta de pH	25
1.4.2.A-Activación y localización subcelular de PacC	26
1.4.3-La ruta Pal: la vía de señalización por pH ambiental en <i>Aspergillus nidulans</i>	27
1.4.3.A-Los componentes que participan en la ruta de señalización por pH	27
1.4.3.B-El modelo de señalización por pH en <i>A. nidulans</i>	29
1.4.4-La señalización por pH ambiental en otros hongos	31
1.4.4.A-La ruta Rim en <i>S. cerevisiae</i>	31
1.4.4.B-La ruta Rim en <i>Candida albicans</i>	32
1.5-La endocitosis en hongos	32

2-OBJETIVOS	37
3-MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1-Medios utilizados para <i>A. nidulans</i>	39
3.1.1-Solución de sales, elementos traza y suplementos para medios	39
3.1.2-Medio mínimo de Aspergillus (MMA)	40
3.1.3-Medio mínimo de Aspergillus ajustado a pH 8.3 (MMA-pH 8.3)	41
3.1.4-Medio mínimo para microscopio ( <i>Watch Minimal Midium</i> , WMM)	41
3.1.5-Medio completo de Aspergillus (MCA)	41
3.1.6-Medio de fermentación (MFA)	42
3.1.7-Medio mínimo de regeneración base (MMR) y de cobertura (MMR-TOP)	42
3.1.8-Ajuste del pH en los medios de <i>A.nidulans</i> en condiciones no estándar	42
3.1.9-Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	42
3.2-Cepas de microorganismos utilizadas	42
3.2.1-Cepas de <i>A. nidulans</i>	42
3.2.2-Cepas de <i>E. coli</i>	53
3.3-Vectores y Oligonucleótidos utilizados	54
3.3.1-Tabla de vectores	54
3.3.2-Tabla de oligonucleótidos	55
3.4-Manejo de <i>E. coli</i>	59
3.4.1-Transformación	59
3.4.2-Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	60
3.5-Manejo de <i>A. nidulans</i>	61
3.5.1-Mantenimiento y cultivo	61
3.5.2-Transformación	62
3.5.3-Cruce entre cepas	62
3.5.4-Aislamiento de DNA	63
3.5.4.A-Aislamiento “limpio” de DNA genómico	63
3.5.4.B-Aislamiento de DNA genómico de esporas	64
3.5.5-Método de extracción de proteína total	64
3.5.6-Método de extracción de proteína soluble	65
3.5.7-Obtención de extractos de membrana	65
3.5.8-Obtención de transformantes de transgenes integrados en los loci <i>pyroA</i> , <i>pantoB</i> o <i>argB</i>	67
3.5.9-Obtención de transformantes por reemplazamiento génico en el locus de <i>palH</i>	68
3.5.10-Cultivos para ensayo de respuesta a pH alcalino	68
3.5.11-Tests fenotípicos de crecimiento en medio sólido para la ruta de pH	69
3.6-Técnicas de biología molecular	69
3.6.1-Genotipado de estirpes por PCR	69

## Índice

3.6.2-Mutagénesis dirigida	70
3.6.3-PCR de fusión	70
3.6.4-Southern blot	71
3.6.5-Inmunodetección de proteínas: ensayos de western blot	72
3.6.6-Ensayo de defosforilación con fosfatasa del fago $\lambda$	73
3.6.7-Ensayos de pull down con extractos solubles de <i>A. nidulans</i>	73
3.7-Microscopía de fluorescencia	74
3.7.1-Medios de observación para el microscopio y condiciones de cultivo	74
3.7.2-Uso de las distintas fuentes de carbono en microscopía	75
3.7.3-Experimentos de cambio de pH al microscopio	76
3.8-Herramientas informáticas	76
3.9-Otros	76
3.9.1-“Kits” comerciales de bioquímica y biología molecular empleados	76
3.9.2-Productos radiactivos	77
3.9.3-Reactivos y enzimas de biología molecular	77
<b>4-RESULTADOS-CAPÍTULO I</b>	<b>79</b>
4.1-Contexto previo	79
4.2-Las proteínas del complejo sensor afectan de manera diferente a la activación de la ruta	80
4.3-PalF tiene el papel clave pero PalH también contribuye a la activación	82
4.3.1-Análisis de la sobreexpresión del receptor PalH y de la arrestina PalF por separado	82
4.3.2-La ubiquitinación artificial de PalF promueve el procesamiento de PacC independientemente del pH	84
4.3.3-Análisis de la sobreexpresión conjunta de PalH y PalF	86
4.3.4-Análisis de la sobreexpresión de PalH en un fondo PalF::Ub	88
4.4-PalH es el sensor de pH ambiental	91
4.4.1-Construcción y funcionamiento del alelo <i>palH::ha<sub>3</sub></i>	91
4.4.2-PalH se fosforila en condiciones alcalinas pero no ácidas	93
4.4.3-Análisis por mutagénesis dirigida de PalH	94
4.4.3.A-Examen de los bucles y de las regiones transmembrana de la zona extracelular	96
4.4.3.A.1-Generación de un mutante con una doble substitución en el 2º bucle extracelular	100
4.4.3.B-Análisis de los bucles intracelulares	101
4.4.3.B.1-Las serinas del 1º bucle intracelular no participan en la fosforilación de PalH	102
4.4.3.B.2-Análisis de los residuos con carga positiva del 3º bucle intracelular	102
4.4.3.C-Estudio de los dominios transmembrana	105

## Índice

4.4.3.C.1-Análisis de Asp238 en TM4	105
4.4.3.C.2-Análisis de Pro316 en TM6	107
4.4.3.C.3-Una substitución cuádruple en las hélices 6 y 7 causa Un fenotipo de mimesis de alcalinidad	107
4.4.3.C.3.1-Separación de mutaciones en el alelo <i>palH4338</i>	110
4.4.3.C.3.2-Generación de un mutante con la doble substitución Phe319Ala-Trp332Ala	111
4.5-Estudio del papel fisiológico de la fosforilación de PalH	115
4.5.1-PalH contiene una región conservada fosforilable	115
4.5.2-La fosforilación de PalH no es necesaria para la activación de PacC	119
4.5.3-La fosforilación de PalH es palF dependiente y PalI y PalA independiente	119
4.5.4-PalH sólo requiere, en su cola citosólica, los dos sitios de unión a PalF para activar a PacC	120
4.5.5-PalF únicamente interacciona con PalH a través de la cola citosólica del receptor	122
4.6-La activación de la ruta de señalización por pH no requiere endocitosis	122
4.6.1-Estudio de la localización de PalH en respuesta al pH alcalino	123
4.6.2-SynA como reportero de la endocitosis	125
4.6.2.A-Análisis de la endocitosis en <i>sagAΔ</i>	129
4.6.2.B-Análisis de la endocitosis en <i>arfBΔ</i>	129
4.6.2.C-La endocitosis en <i>fimAΔ</i>	129
4.6.2.D-La endocitosis en el mutante regulable de <i>slab</i>	130
4.6.3-Análisis de la activación de la ruta en el mutante <i>myoA<sup>S371E</sup></i>	131
4.6.4-Análisis de la activación de la ruta en el mutante <i>sagAΔ</i>	133
4.6.5-La activación de la ruta en el mutante <i>arfBΔ</i>	134
4.6.6-Análisis de la activación de la ruta en el mutante <i>fimAΔ</i>	135
4.6.7-La activación de la ruta en el mutante <i>slab</i>	137
4.6.8-La ruta está activa en ausencia de endocitosis pero no en ausencia del receptor PalH	138
<b>4-RESULTADOS-CAPÍTULO II</b>	<b>140</b>
4.7-Estudio de la localización subcelular de PalF	140
4.7.1-PalF se reparte entre el citosol y la membrana plasmática	142
4.7.2-PalH también mejora la localización de PalF en la membrana	142
4.7.3-El redireccionamiento de PalF a la membrana plasmática es capaz de activar la señalización de forma constitutiva	144
4.7.4- La unión de PalF a la membrana plasmática provoca un aumento de los focos corticales de PalC a pH ácido	146
4.8-Contribución de las proteínas del complejo sensor a su localización subcelular	147
4.8.1-Análisis de la localización de PalF58 yPalH369 por separado	147
4.8.2- Análisis conjunto de la localización de PalF58 y PalH369	149

## Índice

4.8.3-PalI no mejorar la localización de PalF en la membrana	149
4.8.4-La sobreexpresión de las 3 proteínas del complejo sensor permite la deslocalización de PalF y PalI en condiciones alcalinas	152
<b>4-RESULTADOS-CAPÍTULO III</b>	<b>154</b>
4.9-Estudio de la variación de los niveles de PacC en el estado estacionario	154
4.9.1-La respuesta al pH alcalino requiere minutos	154
4.9.2-Las tres formas de PacC se estabilizan con el tiempo	155
4.9.3-Los niveles de PalH y PalF se estabilizan con el tiempo, al igual que PacC	156
4.9.4-PacC <sup>27</sup> tarda mucho tiempo en desaparecer al volver al pH ácido	156
4.9.5-Las mutaciones hipomórfas en el gen <i>pacX</i> suprimen parcialmente la necesidad de la ruta <i>pal</i>	157
4.9.6-PacX se localiza en un punto discreto del núcleo	159
<b>5-DISCUSIÓN</b>	<b>161</b>
5.1-La regulación de los niveles de PacC	161
5.2-PalH como el sensor de pH ambiental	162
5.2.1-La importancia del alternador rotamérico en PalH	165
5.2.2-El papel de la fosforilación en PalH	165
5.2.3-La endocitosis de PalH no es necesaria para la activación de la ruta de pH	167
5.2.4-La localización de PalH depende de PalF y PalI	168
5.3-La localización de PalF	171
5.4-El modelo de la ruta de señalización por pH	172
<b>6-CONCLUSIONES</b>	<b>176</b>
<b>7-BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>178</b>

## *Summary*

## Summary

Summary of the report entitled “*Aspergillus nidulans* alkaline ambient perception: the receptor-transducer complex” for Doctorate in Science of MSc. Daniel Lucena Agell.

### A.1-INTRODUCTION

Living organisms are able to sense, respond and adapt to different environmental stimuli. In the same way, cells have developed homeostatic regulation systems to adapt to different external stimuli. The signal transduction, the manner that cells sense and external stimulus and transduce it inside them in a comprehensive signal, was first defined by Professor Martin Rodbell [1]. This system is always formed by a receptor, a transducer and an effector [1,2]. Over the wide type of receptors that cells have, there exists a superfamily of receptors called GPCRs which have approximately 800 members that are able to activate themselves to different external stimuli, from small molecules, cations and hormones, to light [3,4]. The main feature of this sort of receptors is the seven transmembrane  $\alpha$ -helices that they have in their structure. GPCRs undergo a rearrangement in their structure upon ligand binding that ends in receptor activation. This activation allows the recognition of specific sites in the intracellular side of the receptor by a heterotrimeric G protein, which then dissociates in its subunits  $\alpha$  and  $\beta,\gamma$  that in turn, are able to activate through second messengers different signalling pathways inside the cell [4]. To avoid over-signalling by GPCRs, a desensitization system exists, based on the phosphorylation of the activated receptors by the GRKs (G protein coupled receptors kinases) or the PkcC or PkcA kinases which in turn, allows the recruitment of  $\beta$ -arrestins [5]. The binding of  $\beta$ -arrestin upon activated receptors blocks the interaction with a G protein and promotes the internalization of the complex receptor-arrestin. Recently, a new paradigm of signalling has emerged upon receptor-arrestin binding. After its internalization, this complex through the arrestin is able to interact with different proteins and activate different signalling pathways [5,6].

Fungi are able to grow over wide environmental conditions. pH is one of these conditions and fungi are able to adapt over a wide range. This is possible thanks to a signalling pathway called *rim/pal* that has extensively studied in *Aspergillus nidulans*. This pathway is formed by the product of the six *pal* genes: PalA, PalB, PalC, PalF, PalH and PalI and by the zinc transcription factor PacC [7-14]. PacC is activated after two processing steps. Firstly, PacC inactive form, PacC<sup>72</sup>, is processed to PacC<sup>53</sup> in a pH and *pal* dependent manner. The second processing step that leads to PacC active form, PacC<sup>27</sup>, is mediated by the proteasome. PacC<sup>27</sup> is able to enter to the nucleus and then activate genes that are required in alkaline conditions and repress those required in acidic conditions [15-18].

PalH and PalI are both membrane proteins [13]. PalH is the putative pH-sensing receptor which contains 7 predicted transmembrane helices [11], thus resembling GPCRs. Upon alkalinisation, PalF, the arrestin-like protein of the pH signalling pathway is recruited by PalH and then, is phosphorylated and ubiquitinated [19]. Ubiquitination is crucial to activate pH signalling [20] and

## Summary

mediates the recruitment of Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)-I protein, Vps23, to plasma membrane [21]. Immediately, ESCRT-II and -III proteins arrive at the plasma membrane. In turn, ESCRT-III protein, Vps32, recruits PalC and PalA to cortical sites [14,21,22]. PalC arrives to the plasma membrane before PalA as Galindo *et al.* [21], demonstrated. PalA is able to bind to YPXL/I motifs in PacC<sup>72</sup> and recruit it [23]. On the other hand, Vps24 is able to recruit calpain-like protease PalB through its MIT motif that interacts with MIM motif of Vps24 [24]. Then, PalB processes PacC<sup>72</sup> to PacC<sup>53</sup> which releases from PalA and is able to be processed to PacC<sup>27</sup> by the proteasome.

## A.2-MAIN OBJECTIVES AND RESULTS

The main goals of this thesis are:

- To demonstrate that PalH is the pH-sensing receptor.
- To study the role of PalH phosphorylation in the pH signalling context.
- To demonstrate whether PalH endocytosis is required or not for pH signalling activation.
- To study PalF subcellular localisation and the influence of PalF and PalI in PalH traffic.
- To examine the long term response at alkaline pH in terms of PacC processing and PalH and PalF levels.

The results of this thesis are divided into three different chapters:

### *Chapter One*

The first chapter has been focused in PalH. Overexpression analyses of PalH and PalF have demonstrated that PalF has a crucial role upon activation but PalH is necessary for pH signalling.

In order to develop different studies based in site-directed mutagenesis of PalH, a triple HA (hemagglutinin) was used to tag *palH*. This construct was then re-inserted in *palH* locus by gene replacement. This tag allowed discovering that PalH is phosphorylated exclusively under alkaline conditions. Site-directed mutagenesis of *palH::ha<sub>3</sub>* permitted the identification of critical residues for pH signalling in the second extracellular loop. Moreover, two substitutions located in TM6 and TM7 in PalH lead to the first alkalinity mutant ever found in a *pal* protein. Both substituted residues (Phe319 and Trp332), together with a conserved proline located at TM6 resembles a molecular switch found in some GPCRs which is named rotamer toggle [25].

On the other hand, deletion analyses of conserved regions in PalH sequence have allowed identifying a phosphorylation region within PalH. Studies focused in this region ruled out the GPCR- $\beta$ -arrestin recruitment paradigm in which phosphorylation is required. In this way, PalH

## Summary

phosphorylation is not necessary for PalF recruitment, thus not affecting pH signalling activation. Deletion of the region contained between the PalF binding sites I and II (this sites are necessary for PalH-PalF interaction [19]) within PalH cytosolic tail (the C-terminal region of PalH) has demonstrated that both sites are sufficient to activate PacC processing.

To finish this chapter, analyses of the endocytosis requirement in order to activate pH signalling have been carried out, using different endocytic-defective mutants. Studies with these mutants have shown that overexpressed PalH::GFP is located at the plasma membrane instead of the endovacuolar system as it occurs in the wild-type. Furthermore, PacC processing analyses in these defective mutants are not different of the wild-type PacC processing. Together, these results with those obtained by Galindo *et al.* [21,22], end with the idea that PalH endocytosis is required for pH signalling.

## Chapter Two

The second chapter has been focused in PalF localisation. Using a mCherry tagging in the N-terminal region of arrestin-like protein, first-time microscopy of PalF has been carried out. PalF, although is prominent at the cytosol, is able to localise at the plasma membrane without PalH necessity. Moreover, fusion of two PLC $\delta$  domains (which have high affinity for the phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate of the plasma membrane), to the N-terminal region of PalF has redirected it to the plasma membrane. In these conditions, PalF is able to signalling without PalH more efficiently than PalF with ubiquitin fusion [20], demonstrating that plasma membrane localisation of PalF is important for signalling.

On the other hand, studies of overexpressed PalH::GFP and mCherry::PalF mutual localisation have been made. Both proteins mutually cooperate to localise at the plasma membrane more efficiently. Furthermore, the same analysis was carried out using a reproduction of two single substitutions that break PalH-PalF interaction [19], into the PalH and PalF fluorescent proteins, showing that Ser86Pro affects PalF sole localisation (is excluded from plasma membrane) and its interaction with PalH. However, studies of PalF and PalI localisation have been shown that they don't directly interact and cooperate in their mutual plasma membrane localisation.

Finally, microscopy analyses of the co-overexpression of PalH::HA<sub>3</sub>, PalI::GFP and mCherry::PalF have been made, giving an idea of PalF and PalI trafficking upon ambient alkalinisation.

## Chapter three

The last chapter has been centred in the study of the steady-state of PacC processing. Different short-time and long-time PacC processing assays have been carried out. PacC activation requires

## Summary

minutes after the ambient alkalisation whereas it arrives at equilibrium between its different forms at 150-180 minutes after the pH shift. In the same manner, PalH and PalF arrive to equilibrium between their different forms. Moreover, return to the basal state after acidification of the environment in a strain which has previously grown in alkaline conditions, requires hours.

Finally, studies using a loss of function mutant of *pacX*, a zinc finger protein, have shown that negatively regulates PacC levels. These results together with the fact that PacX localises in a single focus inside the nucleus allow thinking that PacX is a transcription factor which repress *pacC*.

## A.3-CONCLUSIONS

These are the main conclusions of this thesis:

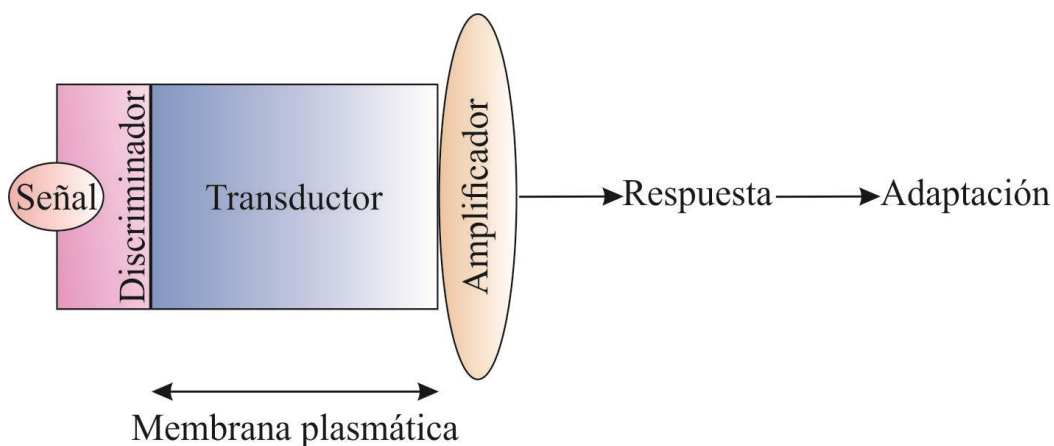
- 1-PalH is the environmental pH sensing receptor.
- 2-The Phe319 and Trp332 residues in PalH play a main role in its activation.
- 3-There are some residues located in and around the 2<sup>nd</sup> extracellular loop of PalH which are critical for pH signalling.
- 4-PalH is phosphorylated exclusively under alkaline conditions.
- 5-PalH phosphorylation is not implicated in PalF recruitment and is not necessary for pH signalling.
- 6-PalH endocytosis is not necessary for pH signalling.
- 7-PalF localises at the plasma membrane without PalH necessity.
- 8-Plasma membrane sole localisation of PalF activates the pH signalling.
- 9-PalF and PalH mutually cooperate to localise at the plasma membrane.

## ***INTRODUCCIÓN***

## 1-INTRODUCCIÓN

### 1.1-LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES: EL MECANISMO DE RESPUESTA A ESTÍMULOS EXTRACELULARES

Los organismos vivos tienen la capacidad de sentir, responder y adaptarse a múltiples estímulos ambientales. De la misma manera, las células han desarrollado en respuesta a distintos estímulos extracelulares sistemas de regulación homeostática, que les permiten adaptarse para sobrevivir al ambiente en el que viven. Toda respuesta al ambiente por parte de la célula empieza con un determinado estímulo extracelular. Ese estímulo es reconocido por un componente de la membrana plasmática y transducido en una señal interpretable dentro de la célula, que desemboca en una respuesta fisiológica adaptativa. El ganador del Nobel Martin Rodbell fue el primero en definir el concepto de transmisión de un estímulo extracelular al interior de la célula como transducción de la señal. El profesor Rodbell aplicó conceptos de la teoría del procesamiento de la información de Norbert Wiener [26], a sus estudios de las proteínas G y la adenilato ciclasa [1,2]. Él fue el primero en aplicar los términos abstractos del lenguaje cibernético a componentes biológicos: discriminador para el receptor, transductor para las proteínas G heterotriméricas y amplificador para la adenilato ciclasa por su capacidad de generar un gran aumento de la producción de AMP cíclico [1].



**Figura I.1-El modelo de transducción de señales propuesto por Rodbell.** El modelo está formado por un discriminador, un transductor y un amplificador. El transductor se encarga de acoplar la señal recibida por el discriminador al amplificador. Todo ello desencadena una respuesta celular específica que permite la adaptación por parte de la célula a un estímulo determinado.

La figura I.1 muestra un esquema del modelo planteado por Rodbell con los distintos componentes necesarios para la señalización. El transductor sería el dispositivo que permitiría el acoplamiento de información entre el discriminador y el amplificador. De esta manera, las proteínas G heterotriméricas se encargarían de transducir un estímulo extracelular determinado recibido por un receptor, en una señal transmisible e interpretable por el interior de la célula, lo que desencadenaría una respuesta determinada al estímulo percibido [1]. Los estudios sobre señalización celular han evolucionado, habiéndose descubierto infinidad de rutas interconectadas e incrementándose año a año, el conocimiento y el número de componentes que las forman. Sin embargo, el término principal utilizado por Rodbell, la transducción de señales, sigue siendo totalmente válido en la actualidad.

## **1.2-RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G Y ARRESTINAS: FUNCIONAMIENTO Y REGULACIÓN**

### **1.2.1-Los Receptores Acoplados a Proteína G heterotrimérica**

Los receptores se definen como componentes esenciales para la célula, a los que se le pueden unir moléculas de todo tipo para desencadenar una respuesta celular característica. El concepto moderno de receptor fue esbozado por primera vez hace más de cien años por Ehrlich en su “teoría de la cadena lateral” de la respuesta inmune, la cual proponía la existencia de “cadenas laterales” en las células que son capaces de reconocer determinantes antigénicos, lo que permitiría la unión de éstos a las células [27]. Sin embargo, fue Langley con sus estudios de la transmisión neuromuscular y el antagonismo de drogas, el primero en hablar de “substancias receptoras” para referirse a esos sitios celulares de interacción [28].

Los estudios sobre receptores fueron evolucionando desde los primeros análisis basados en cuantificar la acción de éstos, hasta las aproximaciones más cuidadosas mediante estudios de unión directa del ligando, pasando por los estudios estructurales y la búsqueda de interactores celulares [29]. Hoy en día, se conocen distintas clases de receptores. Una clase mayoritaria está formada por la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, también conocidos como GPCRs (del inglés *G Protein-Coupled Receptors*), o receptores con siete dominios transmembrana (7-TMDRs o *7-TransMembrane Domain Receptors*). Este tipo de receptores son los más numerosos ya que existen alrededor de 800 diferentes en humanos y todos ellos tienen una característica distintiva común: su estructura 3D consiste en siete  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana plasmática. Los GPCRs son capaces de reconocer distintas clases de moléculas y estímulos tales como hormonas, neurotransmisores, odorantes, protones o la luz [30]. De hecho,

## Introducción

el primer receptor caracterizado en detalle de esta superfamilia fue la rodopsina que se localiza en los discos de los bastones retinales (revisado en [31]). Estudios de secuenciación aminoacídica realizados en paralelo por Hargrave [32] y Ovchinnikov [33] en 1982, así como el clonaje del gen de la rodopsina bovina llevado a cabo por Nathans y Hogness [34], revelaron la presencia de esas siete hélices hidrofóbicas conectadas por bucles hidrofílicos, con el extremo N-terminal localizado en la región intradiscal y el extremo C-terminal expuesto al citosol de la membrana del disco. El cromóforo 11-*cis*-retinal se encuentra unido por enlace covalente vía base de Schiff protonada a la lisina 296 de la hélice VII.

Posteriormente, el análisis del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico pudo ser realizado gracias a distintos avances técnicos, tales como el uso de la digitonina para su solubilización [35] o el desarrollo de una matriz efectiva para cromatografía de afinidad [36-38]. Estas técnicas permitieron purificar cantidades suficientes del receptor como para caracterizarlo bioquímicamente. Más tarde, se comprobó que el receptor purificado y reconstituido en vesículas lipídicas era capaz de activar vía una proteína  $G_s$  el dominio catalítico de la adenilato ciclasa, formando uno de los primeros sistemas funcionales *in vitro* [39-42]. Este hecho, acabó de confirmar el modelo de tres componentes propuesto por Rodbell (*vide supra*) de receptor, transductor y efector. Además, la purificación del receptor permitió, mediante la obtención de péptidos con bromuro de cianógeno y su posterior secuenciación, generar oligonucleótidos para el clonaje del gen correspondiente. Ese hecho dio lugar al descubrimiento del gen del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico que, a diferencia del de la rodopsina [34], no contiene intrones [43], algo que con el tiempo se ha visto que sucede en muchos otros genes que codifican para GPCRs. Además, este trabajo pionero abrió paso a la búsqueda de homólogos, lo que permitió ir aumentando de forma más rápida el número de miembros de la familia caracterizados.

Actualmente, los estudios se centran en la caracterización estructural y funcional de este tipo de receptores mediante la cristalización y el uso de agonistas, antagonistas, agonistas inversos [44-46] y, muy recientemente, agonistas parciales que son capaces de activar una de las dos vías de transducción asociada a este tipo de receptores [47]. Muchas de las interpretaciones y modelos de funcionamiento que se verán en los siguientes apartados están basados en las estructuras activas de la rodopsina [48-50] y de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgico [51,52] y adenosina  $A_{2A}$  [53,54], aunque la mejora en las técnicas de purificación y cristalografía de receptores ha permitido que a finales del año 2012 se encuentren resueltas las estructuras de 16 tipos diferentes de GPCRs, muchas ellas obtenidas ese mismo año.

### ***1.2.1.A-La superfamilia de los GPCRs***

El descubrimiento de los distintos miembros de los GPCRs ha ido acompañado con la generación de un sistema de clasificación basado en homología de secuencias y similitud estructural. Actualmente, ese sistema se conoce como GRAFS [55-57] y empezó con cinco clases distintas, pero hoy en día está formado por seis familias:

**-Clase A o familia de receptores similares a Rodopsina:** la forman todos aquellos receptores que se asemejan a la rodopsina. Esta familia se caracteriza por contener una región N-terminal corta y por interactuar con una gran variedad de ligandos diferentes. Además, es la que se encuentra mejor definida. En humanos está formada por casi 700 miembros divididos a su vez en 4 grupos diferentes,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . En ella se incluyen dos de los receptores mejor caracterizados a parte de la rodopsina: el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y el receptor adenosina  $A_{2A}$ .

**-Clase B o familia de receptores similares a Secretina:** esta clase está en discusión, ya que antiguamente incluía también la clase de receptores de adhesión celular, pero actualmente este tipo de receptores podría formar una clase aparte. Los receptores de esta familia presentan una región N-terminal rica en cisteínas.

**-Clase C o familia de receptores Metabotrópica/Glutamato/Gusto/Receptores de feromonas:** la forman receptores que son similares filogenéticamente a los receptores de glutamato GRM. Los receptores para glutamato se caracterizan por contener en su región N-terminal un dominio de reconocimiento del ligando y ser similares estructuralmente a las proteínas de unión a aminoácidos de las bacterias, LIVBP. En este grupo encontramos a los receptores para el calcio como CASR, a los receptores para GABA, a los receptores del gusto tipo 1 y a los receptores de feromonas V2R.

**-Clase D o familia de los receptores fúngicos de feromonas:** la forman receptores similares a los receptores de feromonas fúngicos Ste2/Ste3.

**-Clase E o familia de receptores de AMP cíclico:** es un grupo de GPCRs descrito principalmente en el hongo *D. discoideum*. Es un grupo bastante desconocido.

**-Clase F o familia de receptores *Frizzled*/receptores para el gusto tipo 2:** los receptores *Frizzled* se han considerado como grupo recientemente. Sorprendentemente, los

## Introducción

receptores para el gusto tipo 2 se asemejan filogenéticamente a los receptores *Frizzled* y por eso se engloban dentro de esta clase.

Además de esta clasificación general, en hongos existe una clasificación propia debido a que el sistema anterior no incluye a los sensores de nutrientes. Xue y colaboradores propusieron en el año 2008 [58], un sistema que estaría formado por seis clases y que combina la clasificación clásica utilizada en *N. crassa* de cinco familias, más un grupo adicional identificado en el hongo basidiomiceto *C. neoformans*. Esta clasificación que se basa en similitud de secuencias aminoacídicas y en el tipo de ligando, se estructura de la siguiente manera:

**-Familia de receptores de feromonas similares al receptor Ste2:** en ella se encuentran todos aquellos GPCRs que son similares a Ste2, el cual se expresa en células **a** y percibe el factor  $\alpha$ .

**-Familia de receptores de feromonas similares al receptor Ste3:** Aquí se hallan todos aquellos receptores 7-TM similares a Ste3, el cual se expresa en células  $\alpha$  y percibe el factor **a**.

**-Familia de proteínas similares a los receptores de cAMP:** es el grupo más desconocido. Se conocen algunos tipos pero todavía no se han realizado estudios funcionales.

**-Familia de receptores para carbono/aminoácidos:** este grupo se podría subdividir en dos distintos, formado por los receptores sensibles a fuentes de carbono, como el receptor Gpr1, y los receptores sensibles a aminoácidos, como el receptor Gpr4.

**-Familia de putativos receptores para nutrientes:** esta familia está formada por putativos sensores para distintos nutrientes, como el receptor 7-TM putativo para nitrógeno, Stm1. Esta familia se podría juntar con la familia anterior para formar la superfamilia de receptores sensibles a nutrientes.

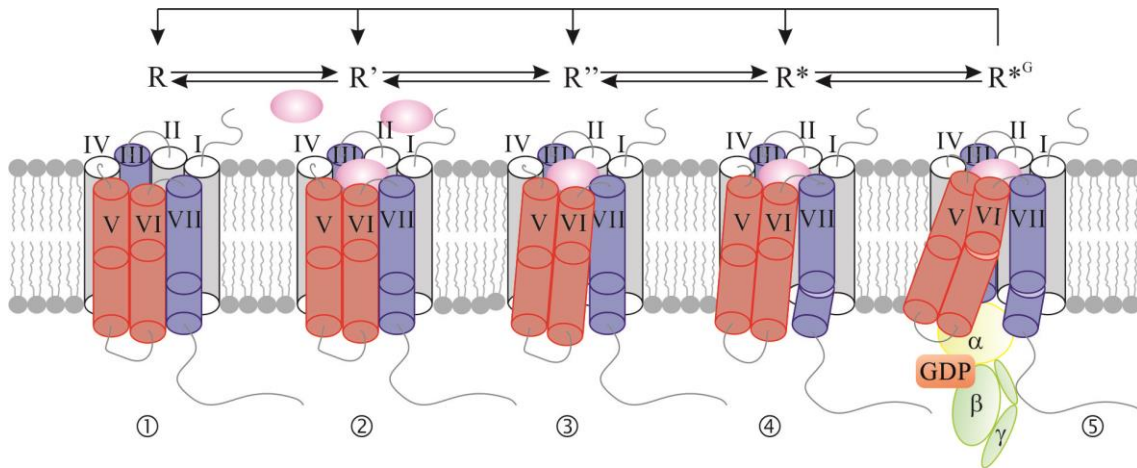
**-Familia de opsinas microbianas:** son GPCRs fotosensibles que se asemejan a las opsinas microbianas. El receptor mejor caracterizado de esta familia es Nop-1 de *N. crassa*, el cual comparte un 81.8% de identidad aminoacídica con las opsinas.

Sin embargo, este sistema de clasificación de GPCRs fúngicos no incluye al gran grupo de proteínas 7-TM similares a Pth11 descritas en el patógeno de plantas *Magnaporthe grisea* y

que está conservado únicamente en el subfilo *Pezizomycotina*. Además, hay GPCRs huérfanos que con el tiempo se incluirán en las filas de alguna de las familias anteriores, y posiblemente pueda surgir una nueva clase formada por GPCRs sensibles a ácidos grasos.

### 1.2.1.B-Estructura y activación de los GPCRs

Como se ha comentado anteriormente, los GPCRs tienen en su estructura siete hélices hidrofóbicas que contienen entre 19 y 28 aminoácidos cada una [34]. Estos dominios son capaces de atravesar la membrana plasmática, lo que permite al receptor anclarse en ella. Además, se encuentran conectados entre sí por bucles intra- y extracelulares que participan en la activación del receptor, una región N-terminal extracelular que puede participar en el reconocimiento del ligando y un extremo C-terminal, que se conoce como cola citosólica, situado hacia el interior celular.



**Figura I.2-Los distintos estados de activación de los GPCRs y los reordenamientos de sus hélices.** Los GPCRs tienen distintos estados de inactivación (R, R')-activación (R'',R\*). Cada estado conlleva una serie de reordenamientos globales en las hélices transmembrana. La unión del ligando (2) sobre un receptor inactivo (1), provoca que las hélices V y VI se muevan (3), lo que a su vez provoca un movimiento de las hélices III y VII (4) que permite la exposición de una serie de residuos reconocibles por la proteína G heterotrimérica en la región intracelular del receptor, permitiéndose la unión de la proteína G con el receptor (5).

Los estudios sugieren que muchos GPCRs existen en un equilibrio dinámico entre sus estados inactivo (R, R') y activo (R'', R\*) (los estados R, R', R'' y R\*, corresponden a reordenamientos en las hélices transmembrana que dirigen al receptor hacia el estado activado. Es necesario que pase por los distintos estados para que el receptor se active, tal y como se muestra en la figura I.2.). El estado activo (R\*) puede convertirse en el estado señalizador (R\*<sup>G</sup>) en presencia de una proteína G heterotrimérica (véase figura I.2). La distribución entre los distintos estados en ausencia del ligando correspondiente varía de un receptor a otro y marca las diferentes actividades basales [59,60]. Los agonistas inversos generan un desplazamiento del

## Introducción

equilibrio hacia el estado inactivo y a la vez disminuyen la actividad basal. En cambio, los antagonistas no disminuyen la actividad basal pero mantienen el estado inactivo. La unión de los agonistas cambia el equilibrio hacia el estado activo, que se caracteriza por cambios conformacionales a gran escala que afectan sobre todo a las regiones intracelulares del receptor [61].

### 1.2.1.B.1-Reordenamientos a gran escala de las hélices transmembrana

Las hélices transmembrana juegan un papel crucial en la activación del receptor. A pesar de las diferencias existentes en la identidad de los distintos receptores, la comparación entre los estados inactivo y activo muestra características de activación comunes con respecto a los cambios conformacionales en las regiones intracelulares [62]. Debido a las relativamente pocas estructuras cristalizadas que hay de los GPCRs, muchos de esos estudios están basados en la rodopsina, en el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y en el receptor de adenosina  $A_{2A}$ . En ellos se ha observado que el reordenamiento más común en las zonas intracelulares de los dominios transmembrana implica un movimiento oscilatorio de la hélice VI hacia el exterior del grupo de dominios transmembrana, en conjunción con un movimiento de la hélice V (véase figura I.2, puntos 3, 4 y 5) [61,63]. Además, las posiciones finales de las regiones intracelulares de esas hélices parecen estar controladas por reordenamientos cruciales en la proteína G, acompañados por la liberación del GDP.

Las hélices III y VII sufren otro cambio conformacional durante la activación [53,54]. El dominio transmembrana VII se desplaza hacia el interior del eje central del grupo de hélices a la vez que se da lugar a reordenamientos en una región altamente conservada de este dominio, mientras que el dominio III padece un movimiento ascendente a lo largo de su eje y algo de movimiento lateral (véase figura I.2, puntos 4 y 5).

Todo ello sugiere que el movimiento de las hélices V y VI es esencial para la activación y subsiguiente unión de la proteína G. Sin embargo, el movimiento de las hélices III y VII depende más de cada receptor-ligando en particular y, aunque su papel en la activación de la proteína G correspondiente no está claro, se especula con que pudiera participar en la vía alternativa de transducción de señal [64].

### 1.2.1.B.2-Interruptores moleculares

Los reordenamientos a gran escala de las hélices transmembrana durante la activación del receptor se acompañan a su vez de la activación de interruptores moleculares locales. Esos

## Introducción

interruptores, que se caracterizan principalmente por cambios rotaméricos en residuos altamente conservados, estabilizan los movimientos globales de los dominios transmembrana [61].

Como sucede en el estudio de los cambios globales en las hélices, el análisis de estos conmutadores se ha realizado principalmente en receptores de tipo A (similares a rodopsina), y por ello se encuentra en fases muy iniciales. En ellos, se han visto dos motivos altamente conservados, el motivo D[E]RY, localizado en la hélice III, y el motivo NPxxY, que se halla en la hélice VII. Además, la presencia de ciertos residuos aromáticos en la hélice VI podría estar formando otro tipo de interruptor que está actualmente en discusión [25].

El residuo de arginina de la secuencia D[E]RY forma un puente salino con el residuo de aspártico (glutámico) posterior. En algunos receptores ese puente salino se rompe como consecuencia de la activación del receptor, lo que desbloquea un cambio rotamérico de la cadena lateral de la arginina que a su vez permite la interacción de ésta con la hélice C-terminal de la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G correspondiente [44,48,49,65]. Además, esa arginina puede formar otro interruptor conocido como cerrojo iónico mediante la formación de un puente salino con un residuo de aspártico situado en la hélice VI, estabilizando la conformación inactiva [66]. Sin embargo, este tipo de interruptor es menos común en los GPCRs, aunque no se puede descartar que se formen otro tipo de interacciones tales como puentes de hidrógeno entre esa arginina y residuos polares de la hélice VI.

Otro de los motivos que funcionan como un interruptor molecular, la secuencia NPxxY, contiene una tirosina muy conservada que sirve como un interruptor de activación a gran escala. En la forma inactiva, esa tirosina apunta hacia las hélices I y II. En cambio, durante la activación del receptor su cadena lateral cambia su conformación rotamérica, apuntando hacia el eje central del grupo de dominios transmembrana y formando interacciones con cadenas laterales de residuos de las hélices III y VI. Además, su grupo hidroxilo podría estar formando un puente de hidrógeno con otro interruptor putativo, el de la tirosina conservada de la hélice V que se ha comprobado por mutagénesis, que juega un papel en la estabilización de los GPCRs [67-69].

Uno de los últimos interruptores descritos hasta la fecha, aunque su papel como tal está siendo discutido actualmente, es el alternador rotamérico [25,70]. En este interruptor participan el triptófano y las dos fenilalaninas de la hélice VI, que durante la activación global cambian su conformación rotamérica lo que afecta al ángulo de torsión de la hélice provocado por la prolina. Ese cambio en la torsión resulta ser clave, como ya se ha visto (ver apartado 1.2.1.B.1), para la activación no sólo del receptor, sino también de la proteína G.

1.2.1.B.3-Disparadores de la activación dependientes del ligando

Los GPCRs presentan distintas morfologías de los bolsillos extracelulares a los que se unen los ligandos específicos. Sin embargo como ya se ha comentado, aunque hay distintos bolsillos para la unión del ligando, el mecanismo de reordenamientos a gran escala que acaban en la activación del receptor es bastante general. Esto es posible gracias a ciertas interacciones específicas receptor-ligando, también conocidas como disparadores de la activación, que controlan el equilibrio entre los distintos estados funcionales del receptor.

Una de esas interacciones compite con el modelo actual de interruptor rotamérico. Se ha visto que el triptófano conservado de la hélice VI no cambia su conformación rotamérica durante la activación. En cambio, parece interactuar estéricamente con cadenas laterales del agonista, lo que provoca un movimiento del triptófano que a su vez genera el movimiento de oscilación en la hélice VI en el receptor de adenosina A<sub>2A</sub> y en la rodopsina. En cambio, en el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, ese movimiento oscilatorio de la hélice VI se da gracias interacciones polares entre cadenas laterales del agonista con dos serinas localizadas en la hélice V [71,72], lo que provoca un movimiento hacia el interior de la región extracelular de la hélice que a su vez genera un cambio rotamérico en una isoleucina de la hélice III, afectando a la cadena lateral de una de las fenilalaninas de la hélice VI y generando el movimiento oscilatorio en ésta.

Otro sitio general en el bolsillo de unión capaz de generar cambios conformacionales en el receptor, implica a las hélices transmembrana III y VII, que están conectadas durante la activación por interacciones mediadas por el ligando.

Aunque parece existir un mecanismo de activación bastante común, estudios más profundos deben ser realizados para encontrar nuevos mecanismos disparadores de la activación.

1.2.1.B.4-El papel de las proteínas G en la activación

Además de todo lo que se ha visto en los puntos anteriores, existe un papel importante de la proteína G en la activación del receptor. La forma oligomérica completa de la proteína G (esto es, con sus tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) controla una serie de cambios conformacionales que permiten la activación total del receptor, además de la liberación del GDP por parte de la proteína G, lo que da paso a su activación por carga con GTP. Esos reordenamientos aparentemente fuerzan un desplazamiento adicional de las hélices V y VI, curvando ésta última de forma notoria hacia fuera [65].

## 1.2.2-Las arrestinas

El descubrimiento de las arrestinas data de finales de 1980. Dos estudios independientes hallaron una proteína que denominaron como antígeno S o proteína 48-kDa [73]. Más tarde, se demostró que se trataban de la misma proteína y la llamaron arrestina porque era capaz de “arrestar” la activación de la fosfolipasa C mediante la unión a la rodopsina activa y fosforilada [74]. Posteriormente, se vio que la arrestina era capaz de atenuar la señalización por proteína G en sistemas reconstituidos del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, lo que indicó que debían existir homólogos de esa proteína, hallándose uno que se bautizó como  $\beta$ -arrestina [75,76].

Actualmente, se sabe que la familia de las  $\beta$ -arrestinas está formada por cuatro miembros, la arrestina 1 (también llamada antígeno S o arrestina visual), la arrestina 2 ( $\beta$ -arrestina 1), la arrestina 3 ( $\beta$ -arrestina 2) y la arrestina 4 (llamada arrestina X o arrestina de los conos). Las arrestinas 1 y 4 están limitadas a los conos y bastones del ojo e interactúan exclusivamente con la rodopsina. En cambio, las arrestinas 2 y 3, a partir de ahora  $\beta$ -arrestinas 1 y 2, se encuentran de forma ubicua en distintos tipos de células (revisado en [6]).

### 1.2.2.A-La superfamilia de las arrestinas

Hasta el descubrimiento reciente de las arrestinas fúngicas [19,77], algunas de ellas también conocidas como adaptadores de tráfico similares a arrestina o ARTs (*Arrestin-Related Traffic adaptors*), se creía que las  $\beta$ -arrestinas eran el único tipo de arrestinas existente y que evolutivamente habían surgido en los animales. Recientemente, se ha descubierto que las  $\beta$ -arrestinas no son el único tipo de estas proteínas y que sólo forman una subfamilia de cuatro miembros. Álvarez propuso en el 2008 una clasificación basada en análisis filogenéticos [78], en la que la superfamilia de las arrestinas estaría formada por tres grupos diferentes: **1)** el grupo similar al dominio Spo0M cuyas proteínas están presentes en archaeas y bacterias, y que evolutivamente son las más antiguas de todas; **2)** el grupo de las arrestinas que está formado por dos tipos diferentes, las  $\alpha$ -arrestinas, evolutivamente más antiguas y las  $\beta$ -arrestinas, que son más recientes; **3)** el grupo de proteínas similares al dominio Vps26. Estos dos últimos grupos sólo se encuentran en eucariotas y el grupo formado por las  $\alpha$ - y  $\beta$ -arrestinas está excluido de plantas. Sin embargo, las  $\alpha$ -arrestinas no se limitan únicamente a eucariotas inferiores como se creía en un principio, sino que también están presentes en eucariotas superiores. Los humanos, por ejemplo, contienen 6 alfas, también denominadas Arrdc (*Arrestin domain containing*).

La principal diferencia entre las  $\alpha$ - y  $\beta$ -arrestinas radica en que las primeras presentan un motivo PY en su extremo C-terminal, mientras que las segundas tienen una  $\alpha$ -hélice en el

dominio arrestina N (para el dominio arrestina N, véase el punto siguiente). Asimismo, las proteínas del grupo Spo0M y Vps26 contienen dominios arrestina N y C terminal más similares al de las  $\alpha$ -arrestinas, aunque estructuralmente Vps26 se parece más a las  $\beta$ -arrestinas. Además, hay algunas  $\alpha$ -arrestinas como PalF/Rim8 que bioquímicamente y funcionalmente se asemejan más a las  $\beta$ -arrestinas [19].

### ***1.2.2.B-Estructura, activación y función de las arrestinas***

Las arrestinas mejor estudiadas estructuralmente son las  $\beta$ -arrestinas, que se caracterizan por contener dos dominios arrestina, el dominio N y el dominio C conectados por una región bisagra de 12 residuos y una cola C-terminal. Los dominios arrestina N y C están formados por siete láminas beta anti-paralelas en forma de sándwich. Cada dominio es funcionalmente independiente y en la conformación inactiva se mantienen de forma intacta gracias a interacciones polares que se dan en una región conocida como núcleo polar. Además, la arrestina inactiva contiene la cola C-terminal enterrada en lo que se llama “interfaz de tres elementos”, que incluye a la propia cola, la beta-lámina I y la  $\alpha$ -hélice I [79].

Las arrestinas son, en general, proteínas fosfosensoras que tienen mayor afinidad por interactores activos que estén fosforilados. En el caso de los GPCRs fosforilados, los fosfatos irrumpen en el núcleo polar de la arrestina, lo que provoca una serie de cambios conformacionales en la propia arrestina que desembocan en la activación de ésta [80], con su defosforilación, su ubiquitinación y la exposición de su cola C-terminal que contiene motivos de reconocimiento por parte de las proteínas de la maquinaria endocítica [81].

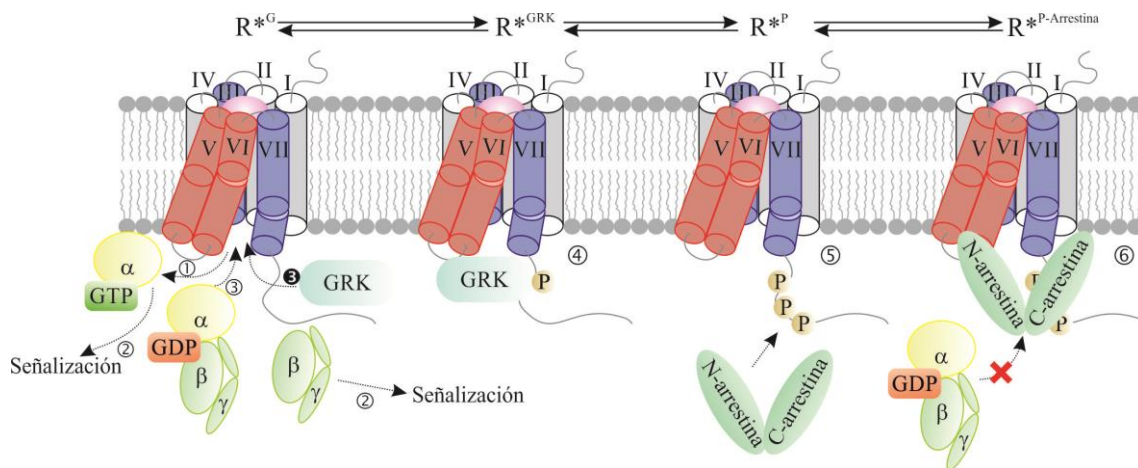
Sus funciones celulares son muy diversas, regulando la activación, internalización, tráfico y señalización de distintos receptores de membrana, tanto 7-TM como receptores quinasa (revisado en [5,82]).

### **1.2.3-El paradigma de los GPCRs**

Como se ha comentado en el punto 1.2.1, los GPCRs se activan en respuesta a un determinado estímulo. La figura I.3 es un esquema representativo de la activación y regulación clásica de los GPCRs. La unión del ligando, provoca una serie de cambios conformacionales en el receptor que desembocan en la exposición de unos residuos concretos reconocibles por las proteínas G heterotriméricas que están formadas por tres subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$  (véase figura I.2, punto 5). En el estado inactivo, la subunidad  $G\alpha$  contiene GDP en su centro activo y se encuentra en una conformación que favorece la interacción con el dímero  $G\beta\gamma$ . La interacción entre el receptor activo y la proteína G heterotrimérica causa el intercambio del GDP asociado a

## Introducción

la subunidad  $G\alpha$  por GTP, lo que promueve un cambio a la conformación activa que facilita la disociación del dímero  $G\beta\gamma$  de la subunidad  $G\alpha$ , y permite que éstas puedan reclutar a sus efectores activando respuestas celulares únicas (punto 1, figura I.3).



**Figura I.3-El paradigma clásico de los GPCRs.** El receptor activo expone una serie de residuos reconocibles por una proteína G heterotrimérica. La unión receptor-proteína G provoca que ésta libere el GDP y se le una GTP, lo que a su vez provoca la disociación de la proteína G en sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ,  $\gamma$  (1), desencadenándose respuestas celulares específicas (2). Una nueva proteína G se puede unir al receptor activo (3 blanco) o éste puede ser reconocido por las GRKs (3 negro). Si esto último sucede, el receptor es entonces fosforilado (4) lo que permite la unión de la  $\beta$ -arrestina correspondiente (5), bloqueándose la unión de una nueva proteína G heterotrimérica (6) y atenuando la señal.

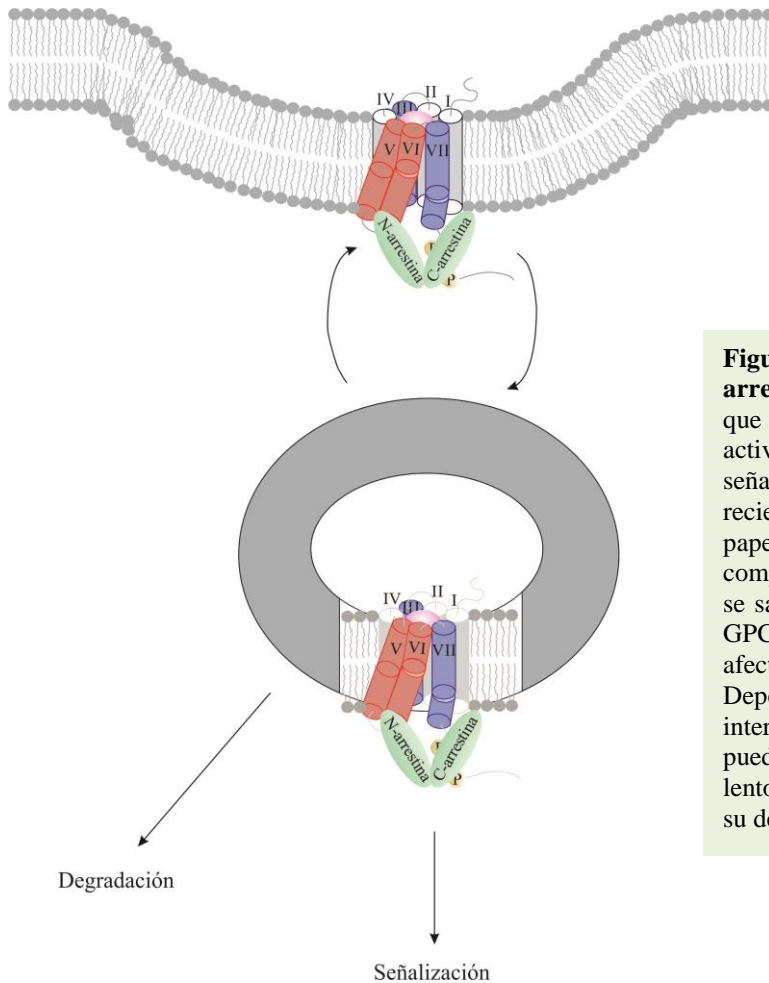
Después de la propagación de señales, el GTP de la subunidad  $G\alpha$  es hidrolizado a GDP, lo que revierte el cambio conformacional y permite su re-asociación con el dímero  $G\beta\gamma$  para “regenerar” a la proteína G inactiva (figura I.3, punto 3) [6,62].

Sin embargo, existe un mecanismo de regulación en los GPCRs para evitar la sobreseñalización por parte del receptor, conocido como atenuación de la señal. En ese mecanismo participan quinasas y las  $\beta$ -arrestinas. Los GPCRs activos exponen una serie de residuos que son reconocibles y facilitan el reclutamiento de las GRKs (quinasas de GPCRs, véase figura I.3, punto 3 negro)[5] o por PkcA o PkcC [83]. Éstas a su vez, fosforilan ciertos aminoácidos (figura R.3, punto 4), cuya modificación es reconocida por la  $\beta$ -arrestina correspondiente (figura I.3, punto 5). Este reconocimiento permite que la arrestina se una con mayor afinidad al receptor activo, lo que inhibe por impedimento estérico la unión de una nueva proteína G heterotrimérica (figura I.3, viñeta 6).

### **1.2.4-Otros papeles de las arrestinas: rompiendo con el paradigma de los GPCRs**

El análisis de las  $\beta$ -arrestinas ha permitido descubrir que su función no se restringe únicamente en bloquear la interacción entre el receptor y su proteína G heterotrimérica para atenuar la señalización [6]. Es conocido que las  $\beta$ -arrestinas también pueden funcionar como adaptadores de tráfico gracias a que son capaces de interactuar con componentes de la maquinaria endocítica tales como el complejo AP-2, la cadena pesada de la clatrina o la proteína G monomérica ARF6 (*ADP-Ribosylation Factor 6*) [6]. Estas interacciones facilitan por un lado la internalización del complejo receptor-arrestina y por otro, su tráfico y destino final. Estudios más detallados han permitido determinar la existencia de dos tipos de receptores, basada en el tipo de interacción que tengan con su arrestina correspondiente. Si la interacción es transitoria, como en el caso del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, se habla de un receptor tipo A cuyo reciclado (esto es, su vuelta a la membrana plasmática desde el endosoma temprano o “*sorting endosome*”) es rápido. Si la interacción es más estable como en el caso del receptor para la angiotensina AT1aR, se habla de un receptor tipo B cuyo reciclado desde el endosoma temprano es más lento y entra con mayor facilidad en la ruta degradativa [84]. Sin embargo, las arrestinas no participan en la internalización y tráfico de todos los GPCRs.

Otro papel importante de las  $\beta$ -arrestinas es su implicación en la ubiquitinación de los receptores 7-TM y de otro tipo de receptores, actuando como adaptadores de las ligasas E3 de ubiquitina, dirigiendo de esta manera su degradación [5,85].



**Figura I.4-La señalización por  $\beta$ -arrestinas.** Actualmente, se sabe que las arrestinas también pueden activar distintas rutas de señalización. Además de este reciente descubrimiento, en el que el papel de la internalización del complejo receptor-arrestina es clave, se sabe que la internalización de los GPCRs mediada por las arrestinas afecta al destino final de éstos. Dependiendo del tipo de receptor, la internalización con la arrestina puede actuar en su reciclado rápido o lento a la membrana plasmática o en su degradación.

Además, estudios relativamente recientes han demostrado que pueden funcionar como transductores a través de los mismos receptores cuya señal atenúan [5,84]. Ese hallazgo rompió con el paradigma de señalización clásico de los GPCRs. En ese caso, la internalización del complejo receptor arrestina permite la activación de rutas distintas de señalización a las activadas mediante proteína G, tal como muestra la figura I.4. Eso es gracias a que las arrestinas pueden funcionar como proteínas de andamiaje, reclutando distintos interactores que permiten activar cascadas de MAPK quinasas que desembocan en la activación de, por ejemplo, ERK1/2 [86]. Asimismo, el estudio mediante agonistas parciales que únicamente activen las vías de señalización mediadas por arrestina, está permitiendo descubrir que las capacidades de las arrestinas como transductores son más diversas de lo que en un principio se concibió.

### 1.3-LA ADAPTACIÓN AL pH POR PARTE DE LOS ORGANISMOS

El pH es una escala logarítmica negativa utilizada para describir la concentración de protones. Cuanto más bajo es el valor de pH más alta es la concentración de iones de hidrógeno

## Introducción

y cuanto más alto, menor concentración hay de protones. Acumulaciones localizadas de protones en el interior celular pueden dar lugar a cambios en el pH intracelular que pueden afectar de forma negativa a las células y organismos. En humanos, se ha comprobado que valores bajos de pH intracelular contribuyen a diversos procesos patofisiológicos tales como la hipertensión [87], que puede estar relacionada con otras patologías como la obesidad o la diabetes *mellitus*. Además, alteraciones en la regulación del pH citoplásmico por parte de los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  están asociadas a diversas patologías como el glaucoma o la epilepsia [88].

En general, en las células existen distintos gradientes de pH intracelulares. Por ejemplo, diversos orgánulos como las mitocondrias o los lisosomas/vacuolas presentan un pH distinto al del citoplasma [89]. Los distintos gradientes de pH están acoplados a los procesos metabólicos y a los niveles de energía. Por ello, las células deben regular su pH intracelular ya que cambios en él tienen efectos sobre diversos procesos celulares tales como la actividad de numerosas enzimas, la contractilidad de los elementos del citoesqueleto o la conductividad de los canales iónicos [89]. Además, afectan al control del ciclo celular. Para disponer de una correcta homeóstasis del pH intracelular, las células tienen diversos mecanismos como canales de tipo simporte o antiporte para  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  o aniones, además de ATPasas que bombean protones al exterior celular [89]. Asimismo, el consumo de protones por el metabolismo es un mecanismo regulador del pH intracelular muy importante.

Los microorganismos, también son capaces de regular su pH intracelular ya que su alteración es igualmente dañina. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los organismos pluricelulares, los cuales tienen valores de pH extracelular en torno a la neutralidad, los microorganismos están totalmente expuestos a las variaciones del pH del ambiente en el que viven. Por ello, han desarrollado sistemas para regular su homeóstasis en función del pH ambiental. En los hongos por ejemplo, y tal como se explicará en el siguiente punto, existe una ruta de señalización ampliamente distribuida y muy conservada, que se encarga de detectar variaciones en el pH extracelular y regular respuestas transcripcionales acordes a esos cambios (revisado en [90]).

Sin embargo, parece ser que los microorganismos no son los únicos capaces de regular respuestas en base a las variaciones del pH extracelular. Recientemente se ha encontrado en células tumorales un nuevo tipo de GPCRs bautizados como GPCRs sensores de protones [91,92]. Los tumores tienen un microambiente ácido y se cree que la acidosis podría activar este tipo de GPCRs desencadenando diversas respuestas celulares que estarían implicadas en metástasis y proliferación, inflamación o vascularización del tumor [93]. Además, este mismo tipo de receptores se ha visto que están implicados en procesos inflamatorios regulando respuestas pro- o anti-inflamatorias en diversos procesos patológicos distintos a los tumores [94].

### 1.3.1-La respuesta al pH en los hongos: generalidades e implicaciones

Como ya se ha visto en el punto anterior, los organismos tienen mecanismos reguladores del pH intracelular y empiezan a aparecer, en organismos superiores, sistemas de respuesta a los cambios en el pH extracelular.

En los hongos, existen sistemas de regulación de la homeóstasis del pH. El uso de glucosa como fuente de carbono preferida en hongos produce una gran cantidad de ácidos orgánicos. Para asegurar la correcta actividad de las rutas metabólicas principales, existe una ATPasa de protones Pam1 [95], que se encarga de la eliminación constante de iones de hidrógeno al medio extracelular. Esta ATPasa funciona con la energía obtenida por la hidrólisis del ATP. Además, el bombeo de protones al exterior celular genera un gradiente electroquímico llamado fuerza protón-motriz que a su vez activa distintos sistemas de transporte secundarios. Asimismo, en levaduras hay descritos otros sistemas reguladores del pH como canales antiporte alcalino-catiónicos. Sin embargo, el sistema principal para la homeóstasis del pH en hongos es la bomba ATPásica de protones [96,97]. Otra bomba de protones dependiente de ATP en hongos es la V-ATPasa [98-100], la cual bombea iones de hidrógeno al interior de la vacuola. Esto permite a su vez generar un gradiente electroquímico que permite el transporte de iones y aminoácidos a través de canales  $H^+$  antiporte. Por último, la fuerza protón-motriz generada por la ATPasa mitocondrial  $F_1F_0$  en la cadena de transporte electrónico, permite la formación de nuevo ATP. Todos estos sistemas permiten mantener el pH intracelular en un rango de valores estrecho situado en torno a la neutralidad.

Por otra parte, debido a que los hongos secretan enzimas, permeasas y metabolitos secundarios cuya actividad depende del pH correcto, estos organismos son capaces de generar respuestas adaptativas en base a variaciones en el pH del ambiente. Ello es gracias a que presentan una ruta de transducción de la señal que es capaz de “sentir” los cambios en el pH ambiental y generar cambios en la expresión génica. Esa ruta de señalización por pH es conocida como ruta *pal/rim* o PacC/Rim101 y ha sido extensamente estudiada en dos especies concretas, *A. nidulans* (ruta *pal*) y *S. cerevisiae* (ruta *rim*). Básicamente, la activación del sensor putativo de pH PalH (*S. cerevisiae* presenta dos homólogos, Rim21/Dfg16 [101]) y con posible ayuda de PalI/Rim9 [102], desencadena una respuesta en cascada mediada por PalF/Rim8 [102], PalC/YGR122W [14], PalA/Rim20 y PalB/Rim13 [102,103] que finaliza con la activación del factor de transcripción PacC/Rim101 y su consiguiente activación de genes útiles en condiciones alcalinas y la represión de genes necesarios en condiciones ácidas. Esta ruta será extensamente comentada en el apartado 1.4 y derivados.

Asimismo, el conocimiento de esta ruta de señalización puede ser aplicada en la producción de diversos compuestos a gran escala o para evitar la generación de ciertos

compuestos dañinos para el hombre. Por ejemplo, algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la penicilina se producen en mayores cantidades cuando el pH ambiental es alcalino [104]. De la misma manera, se sabe que algunos precursores de las aflatoxinas se producen cuando las condiciones ambientales son ácidas [105,106].

### ***1.3.1.A- La patogénesis fúngica y la ruta de señalización por pH***

Como ya se ha visto, la ruta de señalización por pH es importante para los hongos. Además, se ha comprobado que existe una relación casi universal entre la ruta *pal/rim* y la patogénesis fúngica, cuya virulencia se extiende a plantas y animales [106,107]. En *Candida albicans*, se ha estudiado que la señalización por PacC/Rim101 es necesaria para la invasión corneal. Asimismo, mutantes nulos para *pacC/rim101* y *palF/rim8* provocan una menor virulencia por candidiasis en modelos murinos [108]. De la misma manera, se ha visto que PacC/Rim101 podría participar en la interacción patógeno-hospedador posiblemente gracias a la expresión de proteínas de membrana necesarias para la adhesión a las células del hospedador [109]. Por otra parte, se ha comprobado que inóculos de cepas de *A. nidulans* constitutivas para PacC provocan un aumento de la invasión por parte del hongo, lo que hace incrementar la mortalidad [110]. En *A. fumigatus* se ha observado que la expresión de sideróforos útiles para la captación de hierro durante la invasión, está regulada por PacC, el cual se ha comprobado que resulta esencial para la patogénesis de este hongo [111]. Sin embargo, mutaciones de pérdida de función en la ruta provocan que *Fusarium oxysporum* sea más virulento que las cepas silvestres cuando infectan raíces de plantas de tomate [112,113].

## **1.4-*Aspergillus nidulans* COMO ORGANISMO MODELO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH ALCALINO**

*Aspergillus nidulans* es un hongo filamentoso y homotático, perteneciente al grupo ascomycota [114,115], cuyo crecimiento vegetativo está polarizado y ocurre por extensión apical. Este tipo de crecimiento provoca que largos filamentos ramificados llamados hifas, se entrecrucen para formar una red denominada micelio. Las hifas están formadas por células multinucleadas que se encuentran segmentadas por septos perforados que permiten el paso de nutrientes a lo largo de toda la hifa.

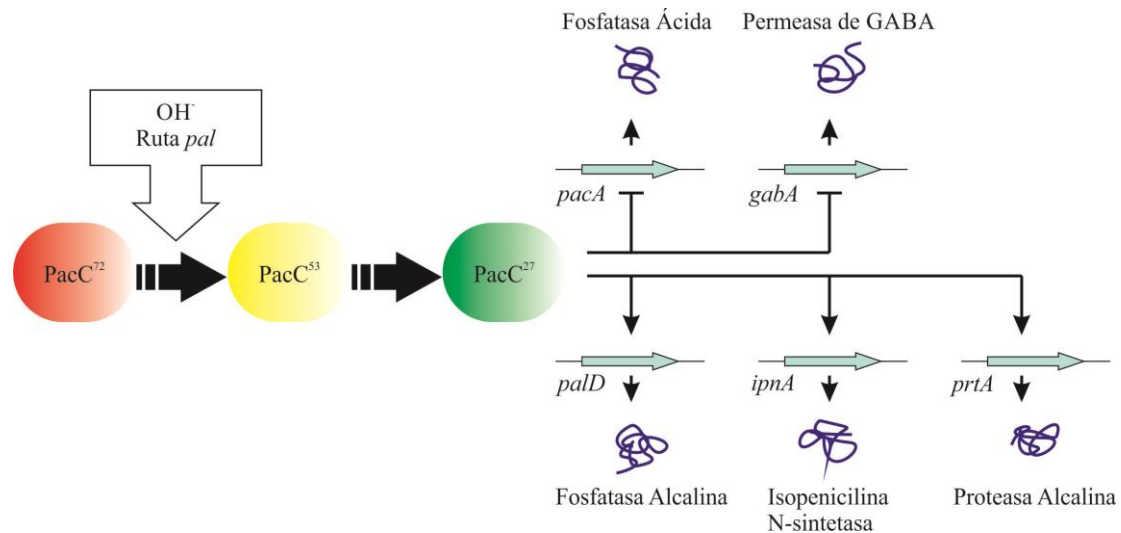
*A. nidulans* presenta un ciclo de vida haplo-diploide, que consta de un ciclo asexual o vegetativo, donde el hongo crece y puede dispersarse a través de la formación de conidiosporas (esporas uninucleadas haploides); un ciclo sexual conocido que comienza con la fusión de sus

hifas (anastomosis) con ellas mismas o con las de otra estirpe, dando lugar a ascosporas (esporas binucleadas haploides); y un ciclo parasexual [116]. Gracias a que su ciclo de vida sexual es conocido, a su fácil manipulación y rápido crecimiento, a su enorme versatilidad metabólica y fisiológica y a que su genoma se encuentra secuenciado desde el año 2005 [117], se considera a este hongo un excelente organismo modelo no sólo para el estudio de otros organismos de su mismo género cuyo ciclo sexual se desconoce, sino también para estudios de genética [118,119], biología celular y molecular de organismos superiores.

### **1.4.1-Genética formal de la señalización por pH ambiental**

Gracias a su gran versatilidad fisiológica y metabólica, *A. nidulans* es capaz de adaptarse y colonizar distintos ambientes. Una de sus adaptaciones radica en la capacidad de crecer en un amplio rango de valores de pH ambiental, que va de 2.5 a 10.5 [120]. Esto es debido, por un lado y como ya se ha visto, a un eficiente mecanismo homeostático que mantiene un pH intracelular relativamente constante [121]. Por otra parte, existe un sistema de regulación de la expresión génica que se asegura de que metabolitos, enzimas extracelulares y permeasas únicamente se secreten al medio cuando el pH ambiental se aproxime a su pH de actividad óptimo [106,122]. Además, la utilización de ciertos compuestos puede estar sujeta a la regulación por el pH ambiental. Ese es el caso del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), el cual puede usarse como fuente de nitrógeno en condiciones ambientales ácidas pero no alcalinas [123,124].

El regulador clave de la expresión génica por pH ambiental en *A. nidulans* es PacC. Sin embargo, *pacC* no es el único gen implicado en la respuesta a las variaciones del pH ambiental [125,126]. Existen otros dos reguladores conocidos en este hongo, el producto del gen *crzA* (el cual presenta un homólogo en *S. cerevisiae*, CRZ1 [127]), responsable de la activación de genes alcalinos dependientes de calcio [128,129], y la proteína codificada por *sltA* cuya pérdida de función provoca la sensibilidad a diversos cationes tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Li}^+$ , además de incapacitar al hongo para crecer en un ambiente alcalino [128].



**Figura I.5-Modelo de la regulación génica debida a la señalización por pH alcalino.** En respuesta a la señal de pH alcalino transducida por la ruta *pal*, PacC<sup>72</sup>, la forma inactiva, es procesado a PacC<sup>53</sup> y posteriormente a PacC<sup>27</sup>, la forma activa. PacC<sup>27</sup> es un represor de “genes ácidos”, tales como *pacA* y *gabA*, y un activador de “genes alcalinos” como *palD*, *ipnA* y *prtA*. Mutaciones de pérdida de función tanto en *pacC* (*pacC*<sup>+/-</sup>, *pacC*), como en los genes *pal*, mimetizan los efectos del pH ambiental ácido y dan lugar a la desrepresión de “genes ácidos” y a la ausencia de expresión de los “genes alcalinos”. Las mutaciones *pacC*<sup>c</sup>, sin embargo, dan lugar a la activación de PacC a cualquier pH ambiental de manera independiente de la ruta *pal*. Dichas mutaciones mimetizan los efectos de un ambiente alcalino.

*A. nidulans* contiene siete genes implicados en la regulación por pH ambiental que son el gen *pacC* y seis genes llamados *pal*: *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI* [7-14], todos ellos identificados por cribado genético [121,130,131]. Los datos genéticos demuestran que únicamente en condiciones alcalinas, los productos de los genes *pal* son capaces de transducir una señal que finaliza con la activación del factor de transcripción codificado por *pacC*, el cual promueve la expresión de “genes alcalinos” y reprime la expresión de “genes ácidos” [106,107,122,130,132] (figura I.5). Las mutaciones aisladas en el sistema de regulación por pH se pueden clasificar en tres tipos diferentes:

**-Mutaciones de mimesis de acidez:** son todas aquellas mutaciones que dan lugar a un patrón de expresión génica similar al de una cepa silvestre crecida en condiciones ácidas. Esas mutaciones aumentan la expresión de aquellos genes útiles en condiciones ácidas y reprimen la expresión de genes necesarios en condiciones alcalinas, independientemente del pH al que se crezca la estirpe en cuestión. Todas esas mutaciones son de pérdida parcial o total de función, caracterizadas por impedir parcial o totalmente el crecimiento a pH alcalino, causar hipersensibilidad al molibdato e hiperresistencia a neomicina. Este tipo de mutaciones también provocan un aumento en los niveles de fosfatasa ácida extracelular y una disminución en la correspondiente fosfatasa alcalina [121,132,133]. Las mutaciones *pacC*<sup>c</sup> y *pacC*<sup>+/-</sup>

pertenecientes a este grupo son recesivas y, además, la mutación *pacCA* es criosensible y afecta de manera negativa a la conidiación [121].

**-Mutaciones de mimesis de alcalinidad:** son todas aquellas mutaciones que dan lugar a un patrón de expresión génica similar al de una cepa silvestre crecida en condiciones alcalinas. A nivel de regulación transcripcional aumentan la expresión de genes útiles en condiciones alcalinas y reprimen la expresión de los genes necesarios en condiciones ácidas, sea cual sea el pH del medio [104,132,134-137]. Estas mutaciones confieren un fenotipo de hiperresistencia a molibdato e hipersensibilidad a neomicina. Además, hay un aumento en los niveles de fosfatasa alcalina extracelular y una disminución de la correspondiente fosfatasa ácida.

**-Mutaciones de mimesis de neutralidad:** son todas aquellas mutaciones cuyo patrón de expresión génica es similar al de una cepa silvestre crecida a pH 6.5, donde hay expresión tanto de “genes ácidos” como de “genes alcalinos”. Este tipo de mutaciones, denotadas como *pacC<sup>c/-</sup>* [15,106], presentan una mezcla de las características fenotípicas de las mutaciones de mimesis de acidez y alcalinidad, independientemente del pH del medio.

Dentro de estas tres categorías, existe una considerable variabilidad fenotípica. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con *pacC*, sólo se han hallado mutaciones de mimesis de acidez en los genes *pal* [16,131,132], cuyos alelos nulos son indistinguibles entre sí a excepción de *palI*, el cual presenta un fenotipo similar al de pérdida parcial de función de los otros genes *pal* [10,11,15,131,132]. Como todas las mutaciones en los genes *pal* son recesivas e hipostáticas a gran parte de las mutaciones en *pacC* [106,122,130,131,133], se ha asumido que éste actúa corriente abajo de *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI*, cuyos productos deben participar en un proceso común.

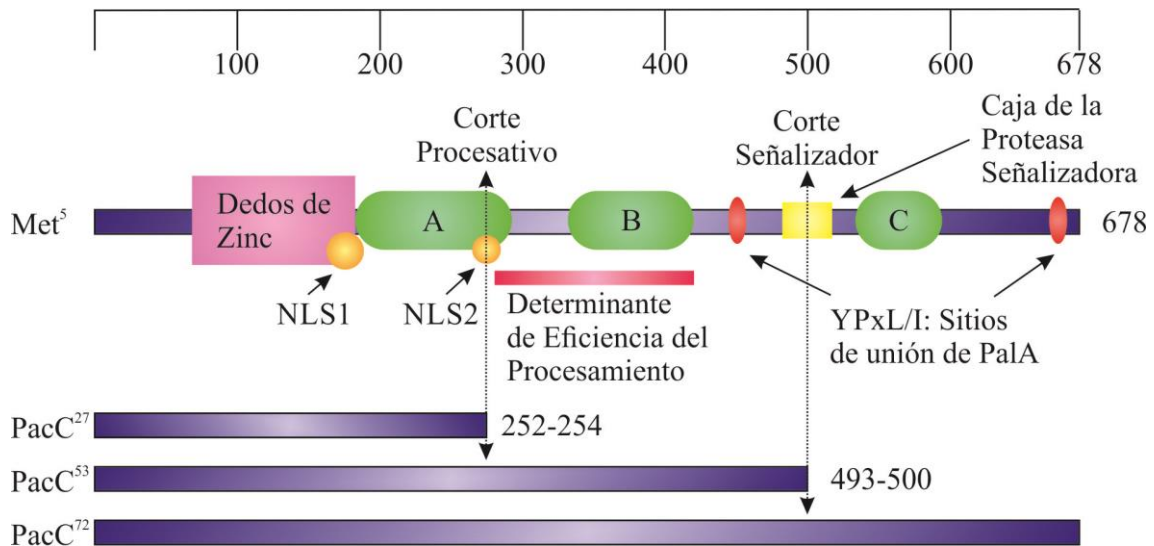
### 1.4.2-PacC: el factor de transcripción de la ruta de pH

PacC es un factor de transcripción que contiene tres dedos de Zinc que reconocen la secuencia consenso 5'-GCCARG (donde R es una purina), en el DNA [132,138]. Espeso y colaboradores, demostraron que PacC es capaz de unirse al promotor *ipnA* [104] (gen que codifica para la isopenicilina N-sintetasa, figura I.5) y activar su expresión en respuesta a un pH ambiental alcalino [134]. En cambio, en esas mismas condiciones, también reprime *gabA* que codifica para el transportador de GABA, compitiendo a nivel de unión a DNA con IntA/AmdR (el activador transcripcional de *gabA*, figura I.5) [136].

### ***1.5.2.A-Activación y localización subcelular de PacC***

PacC presenta tres formas en la célula, denominadas en función de su masa molecular: PacC<sup>72</sup> (72 kDa), PacC<sup>53</sup> (53 kDa) y PacC<sup>27</sup> (27 kDa) [15-18]. El producto primario de traducción es PacC<sup>72</sup> que contiene 674 aminoácidos [15,132]. Esta forma presenta tres regiones de interacción moleculares denominadas A, B y C, que mantienen a la proteína en su conformación cerrada, lo que previene su procesamiento proteolítico (figura I.6). Cuando el pH ambiental se alcaliniza, PacC<sup>72</sup> se procesa a la forma PacC<sup>53</sup> [16]. Este primer paso proteolítico depende tanto del pH ambiental como de los elementos de la ruta *pal* y se le denomina “corte señalizador”. La proteasa señalizadora (casi con certeza PalB) produce un corte en la región conservada denominada “caja de la proteasa señalizadora” (*signaling protease box*) y elimina alrededor de 180 residuos en la región C-terminal de PacC<sup>72</sup> (figura I.6). De esta manera, se elimina la región de interacción molecular C, suprimiendo las interacciones que mantienen a PacC<sup>72</sup> en su forma cerrada por lo que el producto PacC<sup>53</sup> es accesible a la proteasa “procesativa”, que en este caso es el proteasoma [18], dando lugar a la forma completamente procesada PacC<sup>27</sup> que está constituida por los ~250 residuos N-terminales de PacC<sup>72</sup> (figura I.6).

Como factor de transcripción que es, PacC accede al interior del núcleo para llevar a cabo su función. Son las formas procesadas PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup> las que se localizan preferiblemente en el núcleo [139-141], siendo la forma 27 exclusivamente nuclear, mientras que la forma no procesada PacC<sup>72</sup> se localiza principalmente en el citoplasma, aunque hay una cierta proporción que también se encuentra en el núcleo [139]. La localización nuclear es dependiente de dos regiones NLS (sitio de localización nuclear o *Nuclear Localization Site*) que son independientes entre sí y se denominan NLS1 y NLS2 [18,139,141,142] (figura I.6). La NLS1 está situada en la  $\alpha$ -hélice del tercer dedo de zinc de PacC y media la importación nuclear activa de PacC<sup>27</sup> y PacC<sup>72</sup>. La NLS2 de PacC está situada entre los aminoácidos 250 y 273 y se trata de una señal de localización nuclear bipartita clásica, oculta en la conformación cerrada de PacC y que se expone durante el procesamiento de PacC<sup>72</sup> a PacC<sup>53</sup>, lo que permite al heterodímero KapA/KapB interactuar con ella, hecho que promueve el transporte de PacC<sup>53</sup> al interior nuclear, en cooperación con la NLS1 [140,141].



**Figura I.6-El factor de transcripción PacC.** Se muestran las características más importantes de PacC. A, B y C son las regiones interactoras que mantienen a PacC<sup>72</sup> en una conformación cerrada en ausencia de señal de pH. La unión de PalA a los sitios YPXL/I que flanquean la caja de la proteasa señalizadora de 24 residuos (residuos 479-502) es imprescindible para que el corte señalizador se produzca. La posición aproximada del punto de corte de la proteasa señalizadora es en alguno de los residuos entre el 493 y el 500. Una característica importante en PacC es la presencia de los dedos de zinc, donde el dedo 1 interacciona con el dedo 2, y los dedos 2 y 3 interaccionan con el DNA. En el dedo 3 se sitúa la NLS1 (NLS clásica) y en la región A la NLS2 (NLS bipartita). La proteasa procesativa requiere la presencia del determinante de eficiencia del procesamiento, y el punto de corte de esta proteína se sitúa entre los residuos 252 y 254.

### 1.4.3-La ruta Pal: la vía de señalización por pH ambiental en *A. nidulans*

#### 1.4.3.A-Los componentes que participan en la ruta de señalización por pH

Diversos trabajos, han demostrado que los componentes de la ruta de señalización de pH ambiental *pal/rim* están conservados en hongos, siendo en los organismos *A. nidulans*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *Y. lipolitica* donde mejor se han estudiado. En *A. nidulans*, los componentes de la ruta son los siguientes:

**-PalH:** es una proteína con 7 dominios transmembrana [11], que se localiza en la membrana plasmática pero predomina en el sistema endovacuolar [13]. Su cola citosólica

## Introducción

interacciona fuertemente con PalF, la primera arrestina fúngica descubierta y aunque perteneciente al grupo de  $\alpha$ -arrestinas, presenta una mayor similitud a las  $\beta$ -arrestinas [19]. Mutaciones en PalF o PalH que previenen esa interacción, impiden la señalización por pH [19].

**-PalF:** como se ha comentado, PalF es una  $\alpha$ -arrestina con mayor similitud a las  $\beta$ -arrestinas [19]. PalF se fosforila y poli-ubiquitina con la alcalinización del medio, de manera dependiente de PalH y parcialmente dependiente de PalI [19]. Hervás *et al.*, demostraron que la ubiquitinación de PalF es clave para la señalización [20]. Además, Herrador y colaboradores demostraron que Vps23 y Rim8 (el homólogo de PalF en *S. cerevisiae*), interaccionan directamente a través de un motivo SXP localizado en Rim8 y un motivo UEV situado en Vps23 que reconoce el motivo SXP y la ubiquitina en Rim8 [143].

**-PalI:** es una proteína con tres dominios transmembrana que se localiza casi exclusivamente en la membrana plasmática. Mutantes nulos de PalI tienen un fenotipo similar de pérdida parcial de función en otros genes *pal*, lo que demuestra que su papel es importante pero no esencial en la ruta de pH. Muy probablemente, PalI asegura la localización de PalH en la membrana plasmática ya que cuando se co-sobreexpresa con PalH::GFP, este último se relocaliza en la membrana plasmática [13].

**-PalA:** es una proteína de 848 residuos que interacciona con el componente principal de ESCRT III, Vps32 [21,22]. La señalización por pH requiere que PalA se una a PacC<sup>72</sup> a través de dos motivos YPXL/I que flanquean la caja de la proteasa señalizadora en este último [23]. PalA es una proteína perteneciente a la familia de proteínas con dominio Bro1, las cuales están implicadas en rutas de transducción de señales y tráfico de membranas [144-148]. Sin embargo, a diferencia de otras proteínas con dominio Bro1 tales como Bro1p, PalA juega un papel fundamental en la ruta de señalización por pH pero no participa en la ruta de los cuerpos multivesiculares MVB (*MultiVesicular Body Pathway*) [23,149].

**-PalB:** es una cisteín-proteasa con un dominio catalítico similar al de las calpaínas, que son cisteín-proteasas dependientes de calcio [7]. Es una calpaína atípica, ya que carece de los dominios de unión a calcio (*calmodulin-like calcium binding domain IV*) que son característicos de las calpaínas [150,151], pero conservan la tríada catalítica característica de dichas proteasas, Cys-His-Asn. Junto a su dominio catalítico hay el dominio de homología a PalB PBH (*PalB Homology Domain*), el cual está altamente conservado y se encuentra en otras proteínas homólogas de PalB. Además contiene un dominio MIT (*Microtubule-Interacting and Trafficking*) en su región N-terminal, que interacciona con el motivo C-terminal de Vps24, MIM (*MIT Interactor Motif*) [24,152]. PalB es el principal candidato a ser la proteasa señalizadora de PacC, pero no se requiere para el corte “procesativo”, que como ya se ha comentado, se da a través del proteasoma.

**-PalC:** es una proteína de 507 residuos que se caracteriza por tener en su extremo C-terminal dos residuos aromáticos. Galindo *et al.*, demostraron que PalC interacciona también con Vps32 a través de un dominio similar a Bro1 [12,14], aunque su función no es del todo conocida. Sin embargo, se sabe que PalC es indispensable para la activación de la ruta de pH, actuando aguas arriba de PalA y PalB [21].

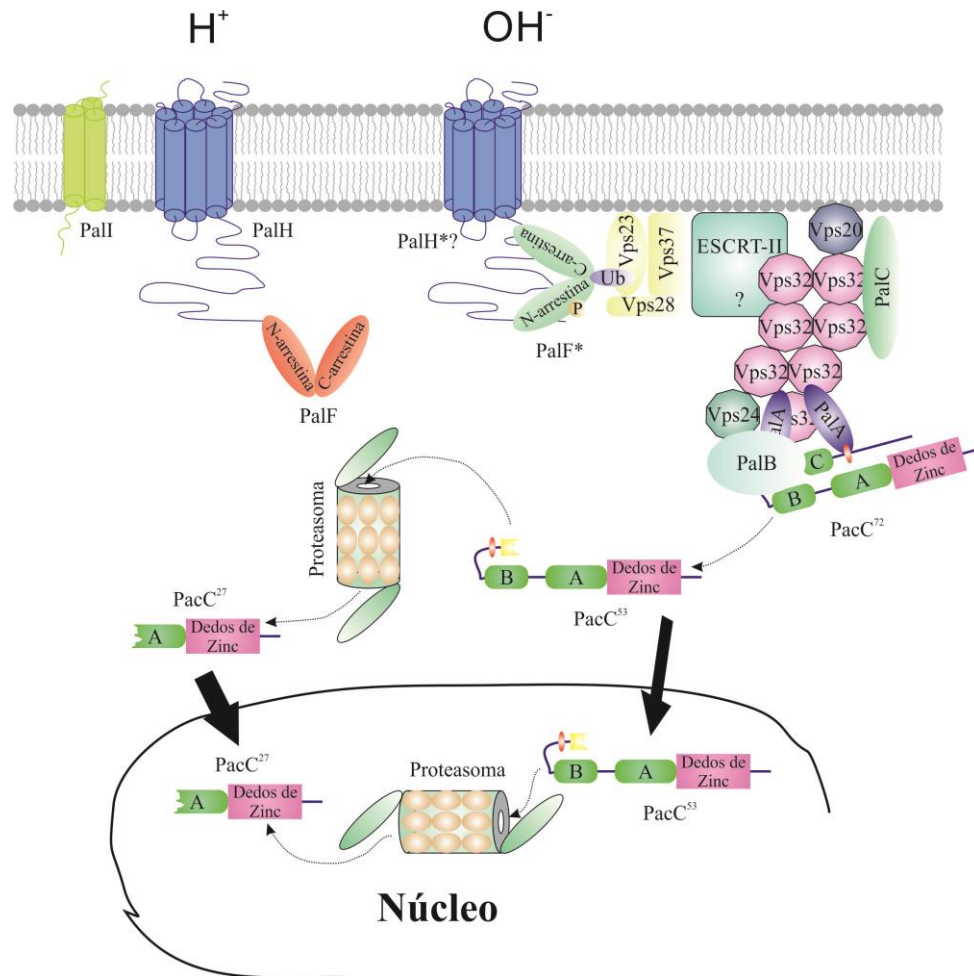
Además de la participación de las proteínas Pal, se conoce la implicación de algunos de los componentes de los complejos ESCRT en la ruta de señalización por pH [14,21,24,143]. Los complejos ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), participan en la ruta de formación de cuerpos multivesiculares que se encarga de la degradación de cierto tipo de proteínas o cargos como los receptores de membrana [153]. Existen 4 complejos diferentes enumerados ESCRT-0, -I, -II y -III, que permiten transportar al cargo de manera secuencial de un complejo a otro. El complejo ESCRT-0 es el que se encarga de reconocer a la proteína que debe ser internalizada y recluta a ESCRT-I. ESCRT-I interacciona con el cargo y recluta a ESCRT-II, el cual a su vez recluta a ESCRT-III. Éste concentra el cargo y recluta proteínas necesarias para su deubiquitinación (Doa4) y para el desensamblado de los complejos ESCRT como Vps4 (revisado en [154]). Sin embargo, ciertos componentes de estos complejos son “secuestrados” por alguna de las proteínas Pal para actuar en la señalización por pH.

### ***1.4.3.B-El modelo de señalización por pH en A. nidulans***

Antiguamente, el modelo en *A. nidulans* de esta vía de señalización presentaba dos complejos espacialmente diferenciados. El primer complejo denominado “complejo superior”, estaba formado por PalH, PalI y PalF y se situaba en la membrana plasmática, mientras que el segundo complejo denominado “complejo inferior”, se localizaba de forma hipotética en la membrana del endosoma y estaba formado por las proteínas PalA, PalB, PalC y PacC<sup>72</sup> interaccionando con proteínas del ESCRT-III. Ese modelo, proponía tal y como ocurre en la señalización de los GPCRs mediada por  $\beta$ -arrestinas, que las proteínas del complejo superior debían ser endocitadas para activar la señalización [107]. Sin embargo, Galindo demostró de forma sucesiva que, por un lado, PalC y PalA se reclutan a focos discretos de la membrana plasmática de manera pH y PalH dependiente y de manera independiente de PalB, lo que situó a PalB corriente abajo de esas dos proteínas. Además, estableció la disposición de PalC y PalA en la ruta, situando a PalC corriente arriba de PalA. Por otra parte, observó que Vps23, una de las proteínas que forman el ESCRT-I, se recluta a esos mismos focos de manera dependiente de PalF e independiente de Vps27, proteína del ESCRT-0 necesaria para reclutar al siguiente complejo ESCRT. Asimismo, demostró la necesidad de Vps4, la AAA-ATPasa que

## Introducción

desensambla los complejos ESCRT, para regular el tiempo de residencia de las proteínas implicadas en la ruta de señalización por pH [21].



**Figura I.7-Modelo actual de la ruta *pal* de señalización en *Aspergillus nidulans*.** PalH, PalF y PalI forman el complejo sensor asociado a la membrana plasmática. PalF se fosforila (P) y ubiquitina (Ub) en respuesta a la alcalinización del medio, de manera dependiente del pH y de PalH y parcialmente dependiente de PalI. La ubiquitinación de PalF es clave para la señalización ya que recluta a Vps23 (proteína del ESCRT-I), a la membrana plasmática. Vps23 reclutaría a ESCRT-II y después a ESCRT-III. La proteína de ESCRT-III, Vps32, a su vez recluta a PalC y a PalA. Esto permite que PacC<sup>72</sup> se reclute a través de su interacción con PalA. La proteasa señalizadora, probablemente PalB, es reclutada por Vps24 (otro componente de ESCRT-III) y corta a PacC<sup>72</sup> en la caja señalizadora (eliminando su extremo C-terminal inhibitorio) y da lugar a PacC<sup>53</sup>. PacC<sup>53</sup> es procesada por el proteasoma que provoca la degradación en la región 252-254 para dar lugar a PacC<sup>27</sup>. PacC<sup>72</sup> tiene localización citoplásmica y nuclear, mientras que PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup> se localizan exclusivamente en el núcleo.

Por todo ello, en el modelo actual propuesto (figura I.7) se cree, a falta de más pruebas, que la endocitosis no es necesaria. Este modelo presenta a PalH como el sensor de pH dado que la ubiquitinación de PalF, paso clave para la activación de la ruta [20], es pH y PalH dependiente [19]. Sin embargo, también es parcialmente dependiente de PalI aunque, como ya se ha visto (*vide supra*), esta proteína es importante pero no indispensable para la señalización [13]. Así, la activación supuesta de PalH permitiría la ubiquitinación de PalF que a su vez

reclutaría a Vps23 lo que permitiría el montaje de ESCRT-III en la membrana plasmática, en el que probablemente participa ESCRT-II, dado que *vps36Δ*, uno de sus componentes, previene la señalización por pH en *A. nidulans*. Una vez montado el complejo ESCRT-III en la membrana plasmática, el componente mayoritario de ese complejo, Vps32, reclutaría a PalC a través de su dominio similar a Bro1. Posteriormente, se reclutaría a PalA ya que su presencia en los focos de la membrana plasmática es dependiente de PalC. PalA a su vez, recluta a PacC<sup>72</sup> mediante el reconocimiento de los dos motivos YPXL/I presentes en el factor de transcripción [23]. Por otro lado, PalB la proteasa señalizadora de pH que da lugar a la forma PacC<sup>53</sup> [16], se reclutaría mediante la interacción de su dominio MIT con el dominio MIM de Vps24 [24], y probablemente por otras interacciones con ESCRT-III y/ membranas. Una vez obtenido PacC<sup>53</sup>, éste se soltaría de PalA por la eliminación de uno de los motivos YPXL/I [19] y podría ser procesado a PacC<sup>27</sup> por el proteasoma [18] y entrar a núcleo.

Sin embargo, todavía hace falta aclarar, entre otros aspectos, cuál es el papel concreto de PalC y PalI, como se evitan los eventos de gemación por parte de los ESCRT, como se activa PalB o demostrar fehacientemente que PalH es el sensor de pH ambiental [21].

### **1.4.4-La señalización por pH ambiental en otros hongos**

#### ***1.4.4.A-La ruta Rim en S. cerevisiae***

*S. cerevisiae* contiene un ortólogo de PacC llamado Rim101p, el cual está constituido por 628 residuos. Inicialmente descrito como un regulador positivo de la meiosis, más tarde se comprobó que participaba en la respuesta al pH ambiental y en la ruta del daño a pared [155,156]. Rim101p a diferencia de lo que ocurre con PacC, sólo es procesado una vez. Sin embargo, ese corte proteolítico es equivalente al que sufre PacC<sup>72</sup> por parte de la “proteasa señalizadora” y depende del pH y de la ruta *rim*. Como ya se ha comentado en el punto 1.3.1, existen homólogos en *S. cerevisiae* para las proteínas Pal [102,103], con la única diferencia de PalH, el cual tiene 2 homólogos en *S. cerevisiae*, Rim21 y Dfg16 [101]. Otra diferencia importante entre ambos microorganismos está en que Rim101p únicamente reprime “genes ácidos” y controla de manera indirecta la expresión de “genes alcalinos” [126,156,157].

#### **1.4.4.B- La ruta Rim en *Candida albicans***

*C. albicans* es un microorganismo que forma parte de la microbiota humana. Es un patógeno oportunista cuya capacidad para colonizar tejidos del hospedador depende de su respuesta al pH ambiental. La ruta *CARim*, el equivalente a la ruta *pal/rim*, controla el dimorfismo en *C. albicans* de manera que en condiciones ácidas su crecimiento es levaduriforme y en condiciones alcalinas su crecimiento es filamentoso [158]. En este caso, CaRim101p se activa tanto a pH ácido como a pH alcalino por un único corte proteolítico que elimina una región C-terminal. La forma de 74 kDa de CaRim101p se obtiene a pH alcalino y la forma de 65 kDa se obtiene a pH ácido [159]. La forma 74 kDa es capaz de unirse a los promotores de dos genes implicados en patogénesis, *PHR1* y *PHR2*, activando el primero y reprimiendo el segundo [160,161], además de regular positivamente la expresión de la proteasa Sap5, que se encarga de degradar la E-cadherina [162], facilitando la invasión por parte del hongo.

### **1.5- LA ENDOCITOSIS EN HONGOS Y SU IMPORTANCIA EN LA SEÑALIZACIÓN POR pH**

Como ya se ha comentado anteriormente (véase punto 1.4.4), durante muchos años se ha creído que la endocitosis era necesaria para la señalización por pH (revisado en [107]). Sin embargo, actualmente esa idea se concibe como errónea [20,21]. No obstante, es necesario destacar el más que seguro papel de la endocitosis en la regulación de la señalización por pH tal y como ocurre en las rutas mediadas por GPCRs (revisado en [163]). Es por ello, que se explica en esta introducción.

La endocitosis es el proceso por el que las células internalizan membrana plasmática así como sus lípidos y proteínas asociadas (transportadores, receptores, permeasas...), en vesículas que se fusionan con el sistema endovacuolar. Es un proceso celular esencial que en hongos se inicia con la formación de una vesícula endocítica recubierta de clatrina en la membrana plasmática. La formación de esa vesícula es dependiente de F-actina y en ella participan distintas proteínas. En *S. cerevisiae*, se ha propuesto la clasificación de esas proteínas en cuatro módulos distintos correspondientes a las distintas etapas de formación y maduración de la vesícula [164]:

**-Módulo de cubierta:** formado por clatrina, Sla1p, Pan1p, End3p y Sla2p, las cuales se ensamblan en la membrana plasmática para luego internalizarse aproximadamente 200 nm con

## Introducción

la vesícula en formación para desensamblarse después. Este módulo se forma de manera independiente a la actina pero requiere de su polimerización para su movimiento y su desensamblaje (figura I.8, panel A).

**-Módulo de actina:** formado por F-actina, Cap1/2p, Sac6p, Abp1p y el complejo Arp2/3, las cuales se ensamblan en una red de filamentos de actina ramificada y con forma cónica [165,166]. En este módulo, la vesícula se libera de la membrana plasmática y se mueve rápidamente hacia el interior a medida que los filamentos de actina de la red previamente montada se van desensamblando [167,168]. Las proteínas de este módulo dependen de la F-actina para su localización (figura I.8, panel A).

**-Módulo WASP/Myo:** formado por Las17p (el homólogo en levaduras de WASP), por Myo5p y por Bbc1p [169]. Este módulo se mantiene inmóvil en los sitios de la membrana plasmática donde se polimeriza la actina y se desensambla después del movimiento de la vesícula hacia el interior. Una de sus funciones es controlar la red de actina (figura I.8, panel A).

**-Módulo de la amfifisina:** formado entre otros por Rvs161p y Rvs167p, las proteínas de este módulo se localizan brevemente en los sitios de endocitosis para internarse rápidamente unos 100 nm y desaparecer. Se cree que participan en la escisión de la vesícula endocítica (figura I.8, panel A).

En *A. nidulans* existen homólogos conocidos de todas las proteínas de formación de la vesícula tales como SlaB [170] o FimA [171] (Sla2p y Sac6p en *S. cerevisiae*, respectivamente), que se ha comprobado que participan en la endocitosis (revisado en [172]).

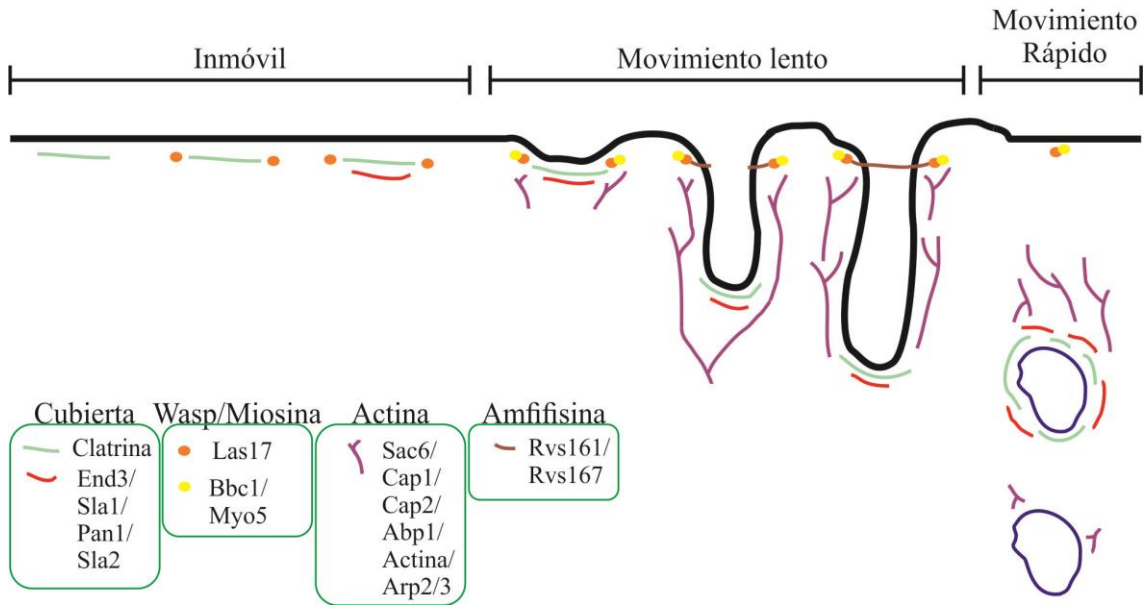
El sistema endovacuolar está formado por distintos compartimentos que crean una red de orgánulos implicados en diversos procesos celulares tales como la regulación de la transducción de señales o la composición lipídica de la membrana plasmática. Las proteínas que se encuentran en la membrana de la vesícula endocítica pueden viajar a los compartimentos endosomales y ser recicladas de nuevo a la membrana plasmática o seguir la vía degradativa que acaba con su destrucción por proteasas en el lumen de la vacuola en hongos, o de su equivalente en metazoos, el lisosoma (figura I.8, panel B). Ese viaje no es directo, sino que las proteínas circulan a través de diversos compartimentos que están interconectados por el tráfico que se establece entre ellos. En hongos se puede diferenciar desde el punto de vista funcional, 3 tipos de compartimentos endocíticos: dos tipos distintos de endosomas (PGE y PVE) y vacuolas. Las vesículas endocíticas llegan al Endosoma Post-Golgi (PGE o *Post-Golgi Endosome*) [173], el cual está alimentado por membranas procedentes del Golgi y comparte características de identidad con los endosomas y el Golgi (figura I.8, panel B puntos 1 y 3). Las proteínas que llegan al PGE pueden seguir dos vías diferentes, volver al Golgi y desde allí viajar de nuevo a la membrana plasmática por la ruta biosintética (figura I.8, panel B puntos 4 y 11), o progresar hacia un segundo compartimento endosomal [174] denominado Endosoma Pre-Vacuolar (PVE o *Pre-Vacuolar Endosome*, figura I.8, panel B punto 5) [173]. Este compartimento se

## Introducción

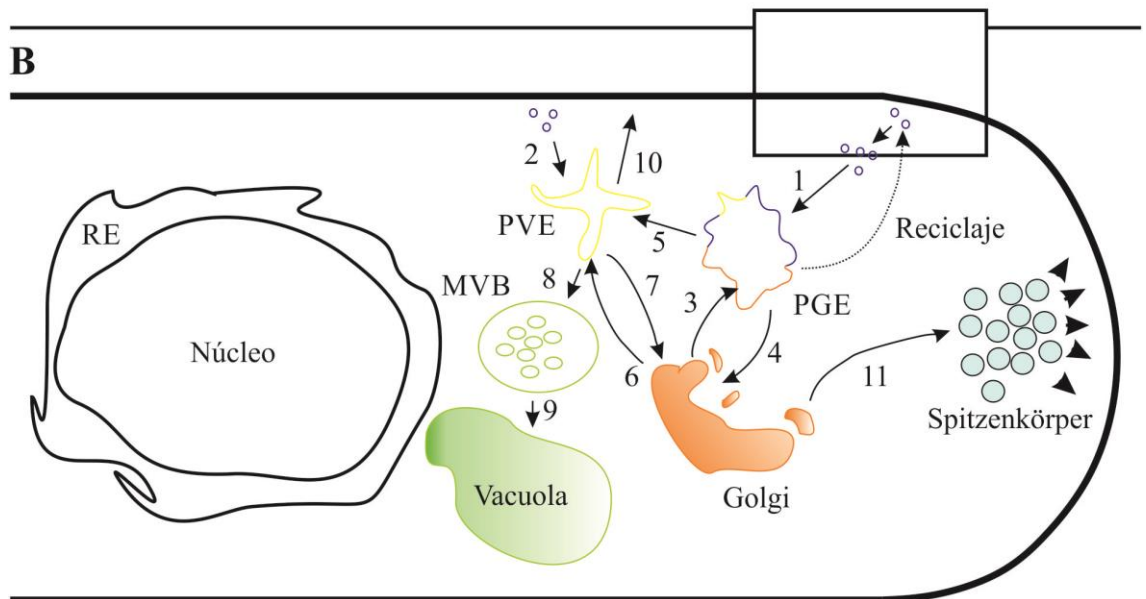
caracteriza por la adquisición progresiva del fosfolípido fosfatidilinositol-3-fosfato (PI-3-P) [175] y por la presencia de la syntaxina Pep12p. En él, convergen las rutas biosintética y endocítica ya que recibe tráfico procedente del Golgi y cargos del PGE y de las vesículas endocíticas que han de ser degradados en la vacuola, tal como muestra los puntos 5, 6 y 8 del panel B de la figura I.8. La maduración del PVE da lugar a un orgánulo denominado Cuerpo Multivesicular (MVB o *MultiVesicular Body*, figura I.8, panel B) que contiene vesículas intralumenales (ILVs o *IntraLuminal Vesicles*), formadas por la invaginación de la membrana. Cuando han madurado del todo, los MVBs se fusionan con las vacuolas (figura I.8, panel B, punto 9). Los cargos que han sido seleccionados y se encuentran en las ILVs son incorporados al lumen vacuolar [176], mientras que las proteínas residentes en la membrana del PVE pueden viajar de nuevo a la membrana plasmática o incorporarse a la membrana de la vacuola. Además, hay tráfico desde el PVE al Golgi (figura I.8, panel B, punto 7), necesario para ciertas proteínas imprescindibles para el tráfico entre Golgi y PVE puedan regresar al Golgi [176]. Por otro lado, hay tráfico desde la membrana plasmática al PVE y tráfico reciclador directo desde el PVE a la membrana plasmática [173], tal como se muestra en la figura I.8, panel B, puntos 2 y 10. Toda esta red de tráfico está regulada por proteínas adaptadoras que reclutan y clasifican a los diferentes cargos que han de ser transportados. Hay cinco complejos proteicos identificados en *S. cerevisiae* que actúan como adaptadores: el complejo AP-1, que al menos participa en el transporte entre el Golgi y la membrana plasmática; el complejo AP-2, que regula el transporte entre la membrana plasmática y el compartimento endosomal; el complejo AP-3 que participa en el transporte desde el Golgi a la vacuola sin pasar a través del PVE [176,177] y el retrómero, un complejo heteropentamérico, que actúa en el transporte retrógrado desde el PVE al Golgi [178,179]. En el caso del transporte entre el Golgi y el PVE participan las proteínas GGAs (*Golgi-localized, Gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding*), los cuales reconocen cargos ubiquitinados en la membrana del Golgi y participan en su incorporación a vesículas recubiertas de clatrina para ser transportados al PVE [180,181].

La interconexión existente entre los distintos compartimentos endosomales y la maduración progresiva de éstos dificultan la distinción morfológica. Por ello, se utilizan distintas proteínas específicas de las distintas membranas [182-184] o distintas formas del fosfatidilinositol (PI) [185,186], como reporteros para la clasificación de los distintos compartimentos. Además, los compartimentos de la ruta endocítica contienen distintos dominios de membrana que están definidos por proteínas organizadoras de esos dominios, los cuales son heterogéneos en composición proteica y lipídica [187,188].

A



B



**Figura I.8-Modelo de endocitosis y tráfico de membranas en hongos. A.-**La formación y liberación de la vesícula endocítica implica a las proteínas de 4 módulos distintos que son reclutadas secuencialmente. **B.-**Flecha 1: endocitosis desde la membrana plasmática al endosoma post-Golgi (PGE); flecha 2: endocitosis desde la membrana al endosoma prevacuolar (PVE); flecha 3: tráfico anterógrado desde el Golgi al PGE; flecha 4: tráfico retrógrado desde el PGE al Golgi; flecha 5: tráfico entre el PGE y el PVE; flecha 6: ruta biosintética desde el Golgi al PVE; flecha 7: tráfico retrógrado desde el PVE al Golgi; flecha 8: maduración del PVE en cuerpos multivesiculares (MVB); flecha 9: fusión homotípica de los MVBs entre ellos o con la vacuola; flecha 10: ruta de secreción desde el PVE a la membrana; flecha 11: ruta de secreción desde el Golgi a la membrana plasmática.

## ***OBJETIVOS***

## **2-OBJETIVOS**

Los objetivos de esta tesis son los siguientes:

- Demostrar que PalH es el sensor de pH ambiental.
- Estudiar el papel de la fosforilación de PalH en el contexto de la señalización.
- Demostrar si la endocitosis de PalH es necesaria o no para la activación de la ruta.
- Estudiar la localización subcelular de PalF y la influencia de PalF y PalI en el tráfico de PalH.
- Examinar la respuesta a largo plazo a pH alcalino en términos de procesamiento de PacC y de los niveles de PalH y PalF.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### 3-MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1-MEDIOS UTILIZADOS PARA *A. nidulans*

A no ser que se indique lo contrario, todos los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo a 37°C. En cambio, los cultivos en medio líquido se crecieron a 30°C si el medio utilizado fue MMA, o a 37°C si se utilizó MFA (ver ambos más abajo). En los cultivos en medio líquido, se inoculó en matraces de Erlenmeyer una suspensión de esporas de aproximadamente  $3 \times 10^6$  conidios/ml en Tween 80, 0.01%. Los cultivos líquidos se crecieron con agitación (250 rpm), en incubadoras equipadas con plataforma de rotación orbital (New Brunswick). La solución de sales y elementos traza son los descritos por Cove [189].

##### 3.1.1-Solución de sales, elementos traza y suplementos para medios

###### *Solución de Sales con Fosfato 50x*

Para 1 litro:

KCl	26 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	76 g
Solución de elementos traza sin fosfatos	50 ml

###### *Solución de Sales sin Fosfato 50x*

Para 1 litro:

KCl	26 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	26 g
Solución de elementos traza sin fosfatos	50 ml

###### *Solución de casaminoácidos*

Hidrolizado de caseína 150 g/litro. Se esterilizó en autoclave a 110°C, 20 minutos y 0.5 bar. Se utilizó como solución 10x.

*Solución de elementos traza sin fosfato 1000x*

Para 1 litro:

Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	40 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	400 mg
FeCl <sub>3</sub>	800 mg
ZnCl <sub>2</sub>	8 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	800 mg

*Solución de Vitaminas 100x*

Para 1 litro:

Tiamina	50 mg
Biotina	100 mg
Ácido nicotínico	100 mg
D-pantotenato de calcio	200 mg
Piridoxina-HCl	50 mg
Riboflavina	10 mg
Inositol	24 g

La solución de vitaminas 100x se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C.

*Suplementos*

Inositol: 24g/l (65 mM). Concentración final 650 µM.

Piridoxina-HCl (vitamina B6): 50 mg/l (250 µM). Concentración final 2.5 µM.

Ácido p-aminobenzoico (PABA): 200 mg/l (1.4 mM). Esterilizado en autoclave a 110°C, 0.5 bar y 20 minutos. Concentración final 14 µM.

Pantotenato de Calcio: 600 mg/l (2.4 mM). Concentración final 24 µM.

D-Pantolactona: 200 mg/l. Concentración final

Biotina: 100 mg/l (0.4 mM). Concentración final 0.04 µM.

Arginina-HCl: 63.2 g (0.3 M). Concentración final 3 mM.

Excepto el PABA, cada una de estas soluciones se esterilizó por filtración. Todas ellas se guardaron a 4°C.

Uracilo: 56 mg/100 ml medio. Concentración final 5 mM

Uridina: 122 mg/ 100 ml cultivo. Concentración final 5 mM.

Estos dos suplementos se pesaron y añadieron directamente al medio.

### **3.1.2-Medio mínimo de *Aspergillus* (MMA)**

Para 1 litro de medio mínimo líquido se diluyeron 20 ml de solución de sales 50x con agua destilada. Posteriormente, se ajustó el pH a 6.5 con NaOH y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 110°C y 0.5 bar.

El medio mínimo sólido se preparó de la misma forma que el anterior y se añadió agar (Oxoid) al 1% (p/v).

En todos los casos que fue requerido, se complementó el medio MMA base sólido o líquido con los suplementos necesarios para cada cepa. Asimismo, se añadió D-glucosa al 1% (p/v) como fuente de carbono y tartrato de amonio (5mM concentración final) como fuente de nitrógeno, a no ser que se indique lo contrario.

### **3.1.3-Medio mínimo de *Aspergillus* ajustado a pH 8.3 (MMA-pH 8.3)**

Para 1 litro de medio mínimo sólido a pH 8.3 se diluyeron 20 ml de solución de sales 50x en agua destilada y se añadieron 16.93 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.37 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente, se ajustó el pH a 8.3 con NaOH (10 M concentración inicial) y se añadió agar al 1% (p/v). Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C y 0.5 bar.

Previo a su uso, se complementó con los requerimientos necesarios para cada cepa y se añadió D-glucosa al 1% (p/v) como fuente de carbono, y 5 mM (concentración final) de tartrato de amonio como fuente de nitrógeno.

### **3.1.4-Medio mínimo para microscopio (Watch Minimal Medium, WMM)**

Para 1 litro de medio se diluyeron 20 ml de solución de sales sin fosfatos 50x, con agua destilada y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. En el momento de su utilización, el medio se suplementó con los requerimientos necesarios para cada cepa. Además, se añadió 0.1% de D-glucosa (p/v) como fuente de carbono y 5 mM (concentración final) de amonio tartrato como fuente de nitrógeno. El pH del medio se ajustó según las condiciones que se exponen en el apartado 3.1.7 (*vide infra*).

### **3.1.5-Medio completo de *Aspergillus* (MCA)**

Por cada litro de medio se añadieron 20 ml de solución concentrada de sales 50x, 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 destilada hasta un litro y el pH se ajustó a 6.5 con NaOH. Para el medio sólido se añadió agar al 1% (p/v). El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C y 0.5 bar.

Antes de su utilización, se añadieron 10 ml/l de solución de vitaminas (*vide supra*) y, en caso de necesitarse, los requerimientos específicos de cada estirpe.

### **3.1.6-Medio de fermentación (MFA)**

Este medio incluye como principal componente 25 g/l de CSL (Corn Steep Liquor). Antes de pesarlo, se mezclaron correctamente las fases sólida y líquida, y una vez pesado, se añadió agua destilada y 20 ml/l de solución concentrada de sales 50x. Después de una agitación durante 20 minutos, se filtró al vacío y se ajustó el pH a 6.8 con NaOH. Finalmente, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos, a 110°C y 0.5 bar.

En el momento de su uso, se añadieron los suplementos necesarios para cada estirpe y las fuentes principales de nitrógeno y carbono, tartrato de amonio 5 mM y sacarosa al 3% (p/v), respectivamente. El pH del medio se ajustó según se indica en el apartado 3.1.8 (ver más abajo).

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

Para preparar el medio MMR, se diluyeron 20 ml de solución de sales 50x y 342 g de sacarosa (1 M concentración final), en agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. Posteriormente, se ajustó el pH a un valor de 7 con NaOH y se añadió 1% de agar antes de esterilizar el medio durante 20 minutos, a 110°C y 0.5 bar.

Previo a su uso, se añadió D-glucosa al 1% (p/v) como fuente de carbono y 5 mM (concentración final) de tartrato de amonio como fuente de nitrógeno, además de la incorporación de los suplementos nutricionales necesarios para el crecimiento de las diferentes cepas.

EL MMR-TOP se preparó de la misma manera, disminuyendo la concentración de agar al 0.4%.

### **3.1.8-Ajuste del pH en los medios de *A. nidulans* en condiciones no estándar**

Como se ha comentado en los apartados anteriores, el pH de los medios en condiciones estándar se encuentra entre los valores de 6.5 y 6.8, dependiendo del medio. Sin embargo, para poder estudiar funcionalmente la ruta *pal*, se necesita ajustar los valores de pH de los medios

por encima o debajo de los anteriores. Debido a ello, se utilizaron distintas formas para tamponar el pH de los medios, dependiendo de las características del medio y de las condiciones experimentales.

Para cultivos cuya finalidad fue la observación al microscopio de fluorescencia, se empleó el medio WMM ajustado a pH ácido con 25 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (concentración final; pH~5.1, 5.2; la ruta *pal* está inactiva), tamponado a pH neutro con 12.5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 12.5 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (concentraciones finales; pH~7), y ajustado a pH alcalino con 25 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (concentración final; pH~8.1-8.2) (en estas dos últimas condiciones la ruta *pal* está activa). De forma similar, el medio MFA o MMA líquido se tamponó para los experimentos de cambio de pH, a pH ácido (pH~4.3) con 50 mM de citrato de sodio pH 3.5. y a pH alcalino con 100 mM de Hepes (pH~8.2), ajustado con NaOH.

### **3.1.9-Medios de cultivo para *Escherichia coli* (*E. coli*)**

Se utilizó el medio LB para el cultivo de *Escherichia coli*, que contiene extracto de levadura (5g/l), NaCl (5g/l) y bactotriptona (10g/l). Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH y en el caso en el que el medio fuera sólido, se añadió agar al 1.5 % (p/v). Una vez preparado, se esterilizó durante 20 minutos, a 110°C y 0.5 bar.

Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina, se añadió este antibiótico a una concentración de 100 µg/ml tanto en medio líquido como sólido. Cuando se seleccionaron transformantes por ausencia de actividad del reportero β-galactosidasa, se añadió al medio X-gal a una concentración final de 83 mM y 100 mM de IPTG (concentración final).

## **3.2-CEPAS DE MICROORGANISMOS UTILIZADAS**

### **3.2.1-Cepas de *A. nidulans***

Las cepas utilizadas en esta tesis doctoral, así como sus respectivos genotipos se hallan descritos en la siguiente tabla. Todas ellas son portadoras del alelo mutante *veA1*, mutante de pérdida de función de *veA* (“velvet”), que permite la conidiación profusa en ausencia de luz [190]. Los marcadores están descritos en Clutterbuck [191].

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD002	<i>biA1</i>	Arst
MAD305	<i>pabaA1 pacC14</i>	Arst
MAD858	<i>biA1 palA34 areA1601areAr168 pantoB100</i>	Arst
MAD878	<i>pantoB100 palB38</i>	Arst
MAD976	<i>yA2 pabaA1 argB2 palI32</i>	Arst
MAD991	<i>wA3 pyroA4 myoA(S371E)</i>	Roxanne
MAD1046	<i>wA2 pyroA4 pabaA1</i>	Arst
MAD1074	<i>palH72 inoB2</i>	Arst
MAD1218	<i>yA2 pantoB100 pabaA1 pacC900</i>	Arst
MAD1315	<i>wA4 inoB2 pacC900</i>	Arst
MAD1349	<i>inoB2 palH72 pacC900</i>	Arst
MAD1350	<i>pacC900 palH72</i>	Arst
MAD1362	<i>inoB2 palB38 3xMyc::<i>pacC</i></i>	Arst
MAD1373	<i>yA2 pabaA1 palC::<i>gfp</i></i>	Galindo
MAD1432	<i>pabaA1 palC4</i>	Tilburn
MAD1445	<i>yA2 pabaA1 pacC14900</i>	Hervás-Aguilar
MAD1473	<i>wA3 pantoB100 palF58</i>	Peñalva
MAD1730	<i>pyroA4 inoB2 nkuAΔ::<i>bar pacC900</i></i>	Peñalva
MAD1732	<i>pyroA4 inoB2 pyrG89 nkuAΔ::<i>bar pacC900</i></i>	Peñalva
MAD1811	<i>inoB2 palC4 pacC900</i>	Peñalva
MAD1818	<i>pantoB100, palC::<i>gfp, palH72</i></i>	Peñalva
MAD1829	<i>inoB2 palI32 pacC900</i>	Peñalva
MAD1972	<i>palC4; pyroA4</i>	Peñalva
MAD1977	<i>wA4 pabaA1 pacC900 palF15</i>	Peñalva
MAD2000	<i>yA2 palA34 pabaA1 pantoB100</i>	Peñalva
MAD2009	<i>wA2 pyroA4 pantoB100 pacC900</i>	Peñalva
MAD2268	<i>pabaA1 pacC900</i>	Peñalva
MAD2335	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuAΔ::<i>bar argB arfB::Tn::pyr-4</i></i>	Shaw
MAD2336	<i>pantoB100 palH::<i>ha3::pyrGfum nkuA+ ¿pyrG89?</i></i>	Hervás-Aguilar
MAD2352	<i>wA4 pyroA4 inoB2 palF::<i>ha3::pyrGfum pyrG89 nkuAΔ::<i>bar pacC900</i></i></i>	Hervás-Aguilar
MAD2384	<i>pyroA4 5'UTR(<i>slaB</i>)::<i>pyrGfum::niiAp::<i>slaB pyrG89 nkuAΔ::<i>bar</i></i></i></i>	Hervás-Aguilar
MAD2467	<i>argB2::<i>[argB*::alcAp::<i>gfp::synA]; nkuAΔ::<i>bar pyroA4</i></i></i></i>	Peñalva
MAD2486	<i>inoB2 pyroA4::<i>[gpdAmini::<i>palF::ha3::pyroA] pacC900 nkuAΔ::<i>bar</i></i></i></i>	Hervás-Aguilar
MAD2491	<i>inoB2 nkuAΔ::<i>bar pyroA4::<i>[pyroA*::gpdAmini::<i>palF::ha3::ub] pacC900</i></i></i></i>	Hervás-

## Materiales y Métodos

			Aguilar
MAD2493	<i>inoB2 nkuAΔ::bar pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3::ubK48R]</i>		Hervás-
	<i>pacC900</i>		Aguilar
MAD2549	<i>pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA] pyrG89 palH::Myc3::pyrGfum</i>		Hervás-
	<i>nkuAΔ::bar</i>		Aguilar
MAD2550	<i>pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::ub::pyroA] pyrG89 palH::Myc3::pyrGfum</i>		Hervás-
	<i>nkuAΔ::bar</i>		Aguilar
MAD2556	<i>yA2 pabaA1 pyroA4 gfp::synA::pyrGfum niiAp::slaB pyrG89?</i>		Hervás-
	<i>nkuAΔ::bar?</i>		Aguilar
MAD2560	<i>wA2 pabaA1 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>		Peñalva
MAD2668	<i>ΔpalH::pyroAfum pacC900 pyroA4 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2672	<i>pyroA4 gfp::synA::pyrGfum pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2673	<i>gfp::synA::pyrGfum pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2674	<i>yA2 pyroA4 pabaA1 gfp::synA::pyrGfum pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2705	<i>palH72 pacC900 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*] nkuAΔ::bar</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2707	<i>inoB2 pacC900 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*] palH+ nkuA+</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2712	<i>inoB2 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA] nkuA+</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2713	<i>inoB2 pantoB100 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*] pacC+ palH72</i>		Hervás-
	<i>¿nkuA+?</i>		Aguilar
MAD2714	<i>inoB2 palH72 pacC900 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::ub::pyroA*]</i>		Hervás-
	<i>nkuAΔ::bar</i>		Aguilar
MAD2715	<i>inoB2 palH+ pacC900 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::ub::pyroA*]</i>		Hervás-
	<i>nkuA+</i>		Aguilar
MAD2723	<i>palH72 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::ub(K48R)::pyroA*] nkuA+</i>		Hervás-
			Aguilar
MAD2725	<i>5'UTR(slaB)::pyrGfum::niiAp::slaB</i>		Hervás-
	<i>pyroA4::[gpdAmini::palH::gfp::pyroA*] nkuA+? pyrG89?</i>		Aguilar
MAD2726	<i>wA2 pabaA1 5'UTR(slaB)::pyrGfum::niiAp::slaB</i>		Hervás-
	<i>pyroA4::[gpdAmini::palH::gfp::pyroA*] nkuA+? pyrG89?</i>		Aguilar
MAD2743	<i>yA2 pyroA4 pantoB100</i>		Arst
MAD2885	<i>palH::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>		Pougovkina
MAD2886	<i>palH(W13L)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>		Hervás-
			Aguilar

## Materiales y Métodos

MAD2887	<i>palH(L258P)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Hervás-Aguilar
MAD2888	<i>palH(Y259D)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Hervás-Aguilar
MAD2889	<i>palH(P264L)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Hervás-Aguilar
MAD2890	<i>palH(Y268C)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Hervás-Aguilar
MAD2891	<i>palH(N275I)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Hervás-Aguilar
MAD2944	<i>wA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4 pacC900</i>	Hervás-Aguilar
MAD3000	<i>palH (Tail)::ha3::pyrGfum pyroA4 pyrG89 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Pougovkina
MAD3002	<i>palH(ΔR1)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Pougovkina
MAD3007	<i>pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900 nkuAΔ::bar?</i>	Galindo
MAD3049	<i>wA2 pantoB100 [pantoB*::gpdAmini::palH::Myc3] pyroA4[pyroA*::gpdAmini::palF::ub::HA] pacC900</i>	Galindo
MAD3050	<i>wA2 pantoB100 [pantoB*::gpdAmini::palH::Myc3] pyroA4[pyroA*::gpdAmini::palF::ub::HA] pacC900</i>	Galindo
MAD3058	<i>palH(ΔR2)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Pougovkina
MAD3060	<i>palH(ΔR3)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Pougovkina
MAD3117	<i>palH(ΔR4)::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Pougovkina
MAD3230	<i>wA4 inoB2 gfp::synA::pyrGfum</i>	
MAD3319	<i>yA2 pabaA6</i>	Galindo
MAD3492	<i>pabaA1 yA2 argB2::[argB*-alcAp::gfp::synA(en-)]</i>	Pantazopoulou
MAD3870	<i>palH(ΔR1)::ha3::pyrGfum pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD3871	<i>palH(ΔR1)::ha3::pyrGfum pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD3872	<i>palH(ΔR1)::ha3::pyrGfum pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD3873	<i>palH::ha3::pyrGfum pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900 pyrG89 ΔnkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD3874	<i>palH::ha3::pyrGfum pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD3875	<i>palH::ha3::pyrGfum pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD3876	<i>pyroA4 pabaA1 pacC900</i>	Este trabajo

## Materiales y Métodos

MAD3877	<i>pyroA4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD3878	<i>pyroA4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD3879	<i>pyroA4 palH (ΔR1)::ha3::pyrGfum ¿pyrG89? pacC900</i>	Este trabajo
MAD3880	<i>pabaA1 palH (ΔR1)::ha3::pyrGfum ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD3881	<i>pyroA4 pabaA1 palH (ΔR1)::ha3::pyrGfum ¿pyrG89? pacC900</i>	Este trabajo
MAD3882	<i>pantoB100 ΔagcA::pyrGfum palH::ha3::pyrGfum ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD3883	<i>wA2 pantoB100 ΔschA::pyrGfum palH::ha3::pyrGfum ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD3884	<i>wA2 ΔschA::pyrGfum palH::ha3::pyrGfum ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD3885	<i>pantoB100 ΔpkaA::pyrGfum palH::ha3::pyrGfum ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD3886	<i>pantoB100 ΔpkaA::pyrGfum palH::ha3::pyrGfum ¿pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD3964	<i>5'UTR (slaB)::pyrGfum::niiAp::slaB pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD3968	<i>nkuAΔ::bar argB pyrG89 pyroA4 riboB2 sagAΔEnd3::riboBfum</i>	Diallinas
MAD4121	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4</i>	Este trabajo
MAD4122	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4</i>	Este trabajo
MAD4209	<i>fimA::Tn431::pyr-4 pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::barcargB riboB2 veA1</i>	Shaw
MAD4251	<i>pyroA4 fimA::Tn341::pyr-4 pyrG89? nkuAΔ::bar? gfp::synA::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD4256	<i>palH::ha3::pyrGfum pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4257	<i>palH::ha3::pyrGfum pacC+ nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4258	<i>palH(ΔBt PalFBS)::ha3::pyrGfum pacC900 nkuAΔ::bar? pyrG89? pyroA4</i>	Este trabajo
MAD4261	<i>palH::ha3::pyrGfum (F319 y 320, W332 y 338 a A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4269	<i>fimA::Tn431::pyr-4 pacC900 pyroA4 inoB2 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>	Este trabajo
MAD4270	<i>fimA::Tn431::pyr-4 pacC900 pyroA4 pyrG89? nkuAΔ::bar?</i>	Este trabajo
MAD4274	<i>palH::ha3::pyrGfum pyroA4 pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4275	<i>palH::ha3::pyrGfum pyroA4 pabaA6 pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4298	<i>wA2 fimA::Tn431::pyr-4 pyrG89? ΔnkuA?</i> <i>pyroA4[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD4334	<i>palH::ha3::pyrGfum (F319 y 320, W332 y 338 a A) pyrG89 pyroA4 inoB2 pacC+ nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4335	<i>palH::ha3::pyrGfum (F319 y 320, W332 y 338 a A) pyrG89 pabaA6 pacC+ nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4336	<i>palH::ha3::pyrGfum (F319 y 320, W332 y 338 a A) pyrG89 pyroA4 pacC+ nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4364	<i>yA2 palH::ha3::pyrGfum (F319 y 320, W332 y 338 a A) pyrG89? pabaA1</i>	Este trabajo
MAD4365	<i>yA2 palH::ha3::pyrGfum (F319 y 320, W332 y 338 a A) pyrG89? inoB2</i>	Este trabajo
MAD4383	<i>pyrG89? nkuAΔ::argB arfB::Tn::pyr-4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4384	<i>wA4 pyrG89? inoB2 nkuAΔ::argB arfB::Tn::pyr-4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4385	<i>pyrG89? nkuAΔ::argB arfB::Tn::pyr-4 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD4386	<i>pyrG89? nkuAΔ::argB arfB::Tn::pyr-4</i>	Este trabajo

## Materiales y Métodos

	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	
MAD4387	<i>pyrG89? pyroA4 nkuAΔ::argB arfB::Tn::pyr-4 gfp::synA::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD4388	<i>pyrG89? pyroA4 nkuAΔ::argB arfB::Tn::pyr-4 gfp::synA::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD4413	<i>palH::ha3::pyrGfum (P316A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4414	<i>palH::ha3::pyrGfum (P316A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4415	<i>palH::ha3::pyrGfum (S130, 132, 134, 137 y 138 a A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4416	<i>palH::ha3::pyrGfum (S130, 132, 134, 137 y 138 a A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4417	<i>palH::ha3::pyrGfum (H296A, K298A y R300A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4418	<i>palH::ha3::pyrGfum (H296A, K298A y R300A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4419	<i>palH::ha3::pyrGfum (D238A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4420	<i>palH::ha3::pyrGfum (D238A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4421	<i>palH::ha3::pyrGfum (F319 y 320, W332 y 338 a A) pyrG89 pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar</i>	Este trabajo
MAD4422	<i>palH(ΔBt PalFBS)::ha3::pyrGfum pacC900 nkuAΔ::bar? pyrG89? pyroA4</i>	Este trabajo
MAD4433	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palF-ub::ha3::pyroA*]</i>	Este trabajo
MAD4434	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palF-ub::ha3::pyroA*]</i>	Este trabajo
MAD4435	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*]</i>	Este trabajo
MAD4436	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*]</i>	Este trabajo
MAD4437	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*]</i>	Este trabajo
MAD4496	<i>yA2 pabaA1 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palFub::ha3::pyroA*] pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4497	<i>pantoB100 pyroA4::[gpdAmini::palFub::ha3::pyroA*] pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4498	<i>yA2 pabaA1 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palFub::ha3::pyroA*] pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4499	<i>pabaA1 pantoB100 pyroA4::[gpdAmini::palFub::ha3::pyroA*] pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4500	<i>yA2 pabaA1 pantoB100 pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*] pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo
MAD4501	<i>pabaA1 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3] pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*] pacC900 nkuA+</i>	Este trabajo

## Materiales y Métodos

MAD4502	<i>yA2 pabaA1 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3]</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[gpdAmini::palF::ha3::pyroA*] pacC900 nkuA+</i>	
MAD4546	<i>nkuAΔ::argB? pyrG89? pyroA4::[gpdAmini::palH::gfp::pyroA*] riboB2?</i>	Este trabajo
	<i>sagAΔEnd3::riboBfum</i>	
MAD4547	<i>nkuAΔ::argB? pyrG89? pyroA4::[gpdAmini::palH::gfp::pyroA*] riboB2?</i>	Este trabajo
	<i>sagAΔEnd3::riboBfum</i>	
MAD4548	<i>wA4 nkuAΔ::argB argB2? pyrG89? pyroA4 riboB2? sagAΔEnd3::riboBfum</i>	Este trabajo
	<i>gfp::synA::pyrGfum</i>	
MAD4549	<i>wA4 nkuAΔ::argB argB2? pyrG89? pyroA4 riboB2? sagAΔEnd3::riboBfum</i>	Este trabajo
	<i>gfp::synA::pyrGfum</i>	
MAD4552	<i>yA2 palH(W13L)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4553	<i>palH(L258P)::ha3::pyrGfum pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4554	<i>yA2 palH(L258P)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4555	<i>palH(Y259D)::ha3::pyrGfum pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4556	<i>yA2 palH(Y259D)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4557	<i>yA2 palH(P264L)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4558	<i>palH(Y268C)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4559	<i>palH(Y268C)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900 pyrG89?</i>	Este trabajo
MAD4560	<i>yA2 palB38 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3]</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF-ub::ha3] pacC900 pabaA6</i>	
MAD4561	<i>palB38 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF-ub::ha3] pacC900 pabaA6</i>	Este trabajo
MAD4562	<i>palB38 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF-ub::ha3] pacC900</i>	Este trabajo
MAD4563	<i>palB38 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900</i>	Este trabajo
MAD4564	<i>palB38 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::myc3]</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF-ub::ha3] pacC900</i>	
MAD4565	<i>yA2 palB38 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3] pacC900</i>	Este trabajo
MAD4566	<i>palH338::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3]</i>	
MAD4567	<i>palH338::ha3::pyrGfum inoB2 pacC900</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF::ha3]</i>	
MAD4568	<i>yA2 palH(ΔR4)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4569	<i>palH(ΔR4)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4570	<i>palH(ΔR2)::ha3::pyrGfum pacC900</i>	Este trabajo
MAD4571	<i>palH(ΔR2)::ha3::pyrGfum pacC900</i>	Este trabajo
MAD4572	<i>palH(ΔR3)::ha3::pyrGfum pabaA6 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4573	<i>palH(ΔR3)::ha3::pyrGfum pacC900</i>	Este trabajo
MAD4574	<i>nkuAΔ::argB argB2? pyrG89? sagAΔEnd3::riboBfum gfp::synA::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD4575	<i>nkuAΔ::argB argB2? pyrG89? pyroA4 sagAΔEnd3::riboBfum</i>	Este trabajo
	<i>gfp::synA::pyrGfum</i>	
MAD4576	<i>yA2 pantoB100 pyroA4 palF15 pacC900</i>	Este trabajo

## Materiales y Métodos

MAD4616	<i>wA4 myoA(S371E) gpf::synA::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD4617	<i>wA4 myoA(S371E) gfp::synA::pyrGfum pyroA4</i>	Este trabajo
MAD4618	<i>wA4 myoA(S371E) pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD4619	<i>wA4 myoA(S371E) pabaA1 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD4626	<i>wA4 myoA(S371E) pyroA4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4627	<i>wA4 myoA(S371E) pacC900</i>	Este trabajo
MAD4665	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::sgfp] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4666	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::sgfp] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4667	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::mCherry] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4668	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::mCherry] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4669	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::sgfp::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4670	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::sgfp::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4671	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4684	<i>yA2 palH(N275I)::ha3::pyrGfum pacC900 pyroA4 pabaA6</i>	Este trabajo
MAD4685	<i>palH(N275I)::ha3::pyrGfum pacC900 pabaA6</i>	Este trabajo
MAD4686	<i>yA2 pantoB100 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4762	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::sgfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4763	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::sgfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4764	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::sgfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4765	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::sgfp] pyroA4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4766	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::sgfp] pyroA4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4767	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::sgfp] pyroA4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4768	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::sgfp] pyroA4 pacC900</i>	Este trabajo
MAD4772	<i>yA2 pabaA1 pall32 argB2::[argB*::gpdAmini::pall:gfp]</i>	Este trabajo
MAD4773	<i>yA2 pabaA1 pall32 argB2::[argB*::gpdAmini::pall:gfp]</i>	Este trabajo
MAD4774	<i>yA2 pabaA1 pall32 argB2::[argB*::gpdAmini::pall:gfp]</i>	Este trabajo
MAD4775	<i>yA2 pabaA1 pall32 argB2::[argB*::gpdAmini::pall:gfp]</i>	Este trabajo
MAD4776	<i>yA2 pabaA1 pall32 argB2::[argB*::gpdAmini::pall:gfp]</i>	Este trabajo
MAD4777	<i>pacC900 pantoB100 palB38 pacX20</i>	Bussink

## Materiales y Métodos

MAD4778	<i>pacC900 pantoB100 palB38 pacX20</i>			Bussink
MAD4779	<i>yA4::pyr4 pabaA1 pacCc202 pacC+/-20205 pacX18 niaD::impala::yA+</i>			Bussink
MAD4807	<i>yA2 pantoB100 palF15 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4808	<i>yA2 pantoB100 palF15 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4809	<i>yA2 pantoB100 palF15 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4810	<i>yA2 pantoB100 palF15 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3::ub]</i>			Este trabajo
MAD4811	<i>yA2 pantoB100 palF15 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3::ub]</i>			Este trabajo
MAD4812	<i>yA2 pantoB100 palF15 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3::ub]</i>			Este trabajo
MAD4813	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(genómico)::ha3]</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>			Este trabajo
MAD4814	<i>yA2 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(genómico)::ha3]</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)] palF15 pacC900</i>			Este trabajo
MAD4815	<i>yA2 palH72 palF15? pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]</i>			Este trabajo
MAD4816	<i>yA2 palH72 palF15? pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]</i>			Este trabajo
MAD4817	<i>pantoB100 palH72 palF15? pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]</i>			Este trabajo
MAD4818	<i>pantoB100 palH72 palF15? pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]</i>			Este trabajo
MAD4839	<i>palC4 pacC900 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4840	<i>palC4 pabaA1 pacC900</i> <i>pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(cDNA)::myc3]</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4841	<i>palC4 pabaA1 pacC900</i> <i>pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(cDNA)::myc3]</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4842	<i>yA2 palA34 pantoB100 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4843	<i>yA2 palA34 pabaA1 pacC900</i> <i>pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(cDNA)::myc3]</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo
MAD4844	<i>yA2 palA34 pabaA1 pantoB100 pacC900</i> <i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::ha3]</i>			Este trabajo

## Materiales y Métodos

MAD4845	yA2	palA34	pabaA1	pacC900	Este trabajo
	<i>pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(cDNA)::myc3]</i>				
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palF(cDNA)::ha3]</i>				
MAD4846	yA2			<i>pantoB100</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>				
	<i>pacC900 palF15</i>				
MAD4847	yA2			<i>pantoB100</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>				
	<i>pacC900 palF15</i>				
MAD4848	yA2			<i>pantoB100</i>	Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>				
	<i>pacC900 palF15</i>				
MAD4863	yA2		<i>argB2::[argB*::gpdAmini::pall::gfp]</i>		Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(genómico)::ha3] pacC900 palF15?</i>				
MAD4864	yA2		<i>argB2::[argB*::gpdAmini::pall::gfp]</i>		Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(genómico)::ha3] pacC900 palF15?</i>				
MAD4865	yA2	<i>pabaA6</i>	<i>argB2::[argB*::gpdAmini::pall::gfp]</i>		Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(genómico)::ha3] pacC900 palF15?</i>				
MAD4866	yA2		<i>argB2::[argB*::gpdAmini::pall::gfp]</i>		Este trabajo
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)]pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH(genómico)::ha3] pacC900 palF15?</i>				
MAD4870	yA2	<i>pantoB100</i>	<i>palC-gfp</i>	<i>palF15?</i>	<i>pacC900?</i>
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>				
MAD4871	yA2	<i>pantoB100</i>	<i>pabaA1</i>	<i>palC-gfp</i>	<i>palF15?</i>
	<i>pacC900?</i>				
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha3]</i>				
MAD4872	yA2	<i>pantoB100</i>	<i>pabaA1</i>	<i>palC-gfp</i>	<i>palF15?</i>
	<i>pacC900?</i>				
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)-ub::ha3]</i>				
MAD4873	yA2	<i>pabaA1</i>	<i>palC-gfp</i>	<i>palF15?</i>	<i>pacC900?</i>
	<i>pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)-ub::ha3]</i>				
MAD4874	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar palH(F319A)::ha3::pyrGfum</i>				Este trabajo
MAD4875	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar palH(F319A)::ha3::pyrGfum</i>				Este trabajo
MAD4876	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar palH(F320A)::ha3::pyrGfum</i>				Este trabajo
MAD4877	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::ba palH(F320A)::ha3::pyrGfum</i>				Este trabajo
MAD4878	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar palH(W332A)::ha3::pyrGfum</i>				Este trabajo
MAD4879	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::ba palH(W332A)::ha3::pyrGfum</i>				Este trabajo
MAD4880	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar palH(W338A)::ha3::pyrGfum</i>				Este trabajo

## Materiales y Métodos

MAD4881	<i>pyroA4 pacC900 pyrG89 nkuAΔ::bar palH(W338A)::ha3::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD4882	<i>pyroA4 pacC900? palH72</i>	Este trabajo
MAD5136	<i>yA2 pyroA4 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD5137	<i>yA2 pyroA4 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD5138	<i>palH72 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD5139	<i>palH72 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::palH::gfp]</i>	Este trabajo
MAD5140	<i>pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar pyrG89 palH(F319A, W332A)::ha3::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD5141	<i>pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar pyrG89 palH(F319A, W332A)::ha3::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD5142	<i>pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar pyrG89 palH(Y259D, P264L)::ha3::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD5143	<i>pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar pyrG89 palH(Y259D, P264L)::ha3::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD5144	<i>pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar pyrG89 palH(T465A)::ha3::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD5145	<i>pyroA4 pacC900 nkuAΔ::bar pyrG89 palH(T465A)::ha3::pyrGfum</i>	Este trabajo
MAD5146	<i>yA2 pantoB100 pacC900 palF15 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF58]</i>	Este trabajo
MAD5147	<i>yA2 pantoB100 pacC900 palF15 pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF58]</i>	Este trabajo
MAD5148	<i>yA2 pacC900 palF15 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF58]</i>	Este trabajo
MAD5149	<i>yA2 pacC900 palF15 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::gfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF58]</i>	Este trabajo
MAD5150	<i>yA2 pacC900 palF15 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH::gfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF58]</i>	Este trabajo
MAD5151	<i>yA2 pyroA4 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp]</i>	Este trabajo
MAD5152	<i>yA2 pyroA4 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp]</i>	Este trabajo
MAD5153	<i>yA2 pyroA4 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp]</i>	Este trabajo
MAD5154	<i>yA2 pacC900 palF15 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF]</i>	Este trabajo
MAD5155	<i>yA2 pacC900 palF15 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF]</i>	Este trabajo
MAD5156	<i>yA2 pacC900 palF15 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF]</i>	Este trabajo
MAD5157	<i>yA2 pacC900 palF15 pantoB100::[pantoB*::gpdAmini::palH369::gfp] pyroA4::[pyroA*::gpdAmini::mCherry::palF]</i>	Este trabajo

**Tabla M&M.1- Tabla con las cepas utilizadas en esta tesis.**

### 3.2.2-Cepas de *E. coli*

Se han utilizado en esta tesis las siguientes estirpes de *E. coli*:

-DH1 *F' recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 glnV44 (rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>) λ<sup>-</sup>*  
 -DH5α *F' endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacIZYA-argF')*

Ambas cepas presentan una alta frecuencia de transformación. La estirpe DH5α se utilizó para la selección de plásmidos recombinantes utilizando *lacZ* como marcador de selección.

### 3.3-VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

#### 3.3.1-Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo, se describen en la siguiente tabla:

Plásmido	Genotipo
p1734	<i>gpdAmini::palC::mRFP::pyroA</i>
p1914	<i>gpdAmini::palF(cDNA)::ha<sub>3</sub>::pyroA*</i>
p1915	<i>gpdAmini::palF(cDNA)::ha<sub>3</sub>::Ub(K48R)::pyroA*</i>
p1943	<i>gpdAmini::palH(cDNA)::myc<sub>3</sub>::pantoB*</i>
p1949	<i>5'UTR-palH::ha<sub>3</sub>::pyrGfum-3'UTR</i>
p2024	<i>gpdAmini::gfp::rab1::argB*</i>
p2082	<i>derivado de p1949 con mutación en P316A</i>
p2083	<i>derivado de p1949 con mutación en S130, S132A, S134A, S137A y S138A</i>
p2084	<i>derivado de p1949 con mutación en H296A K298A R300A</i>
p2095	<i>derivado de p1949 con mutación D238A</i>
p2097	<i>derivado de p1949 con mutación en F319A, F320A, W332A y W338A</i>
p2098	<i>derivado de p1949 con delección de la región entre los sitios de unión a PalF I y II</i>
p2148	<i>pyrGnidulans en pGEM-T Easy</i>
p2149	<i>gpdAmini::palF(cDNA)::sgfp::pyroA*</i>
p2150	<i>gpdAmini::palF(cDNA)::mCherry::pyroA*</i>
p2151	<i>gpdAmini::sgfp::palF(cDNA)::pyroA*</i>
p2152	<i>gpdAmini::mCherry::palF(cDNA)::pyroA*</i>
p2153	<i>gpdAmini::palH(cDNA)::sgfp::pantoB*</i>
p2160	<i>gpdAmini::palH::ha<sub>3</sub>::pantoB*</i>
p2161	<i>gpdAmini::palI::gfp::argB*</i>
p2162	<i>gpdAmini::palF(cDNA)::ha<sub>3</sub>::pyroA*</i>
p2163	<i>gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha<sub>3</sub>::pyroA*</i>
p2164	<i>gpdAmini::PLCd2::palF(cDNA)::ha<sub>3</sub>::ub::pyroA*</i>
p2168	<i>derivado de p1949 con mutación F319A</i>

p2169	<i>derivado de p1949 con mutación F320A</i>
p2171	<i>derivado de p1949 con mutación W338A</i>
p2172	<i>derivado de p1949 con mutación W332A</i>
p2173	<i>gpdAmini::palH(DR1)::sgfp::pantoB*</i>
p2174	<i>gpdAmini::mCherry::PLCd2::palF(cDNA)::ha3::pyroA*</i>
p2191	<i>derivado de p1949 con las mutaciones F319A y W332A</i>
p2192	<i>derivado de p1949 con las mutaciones Y259D y P264L</i>
p2194	<i>gpdAmini::mCherry::palF58::pyroA*</i>
p2195	<i>gpdAmini::palH369::ha3::pantoB*</i>
p2196	<i>gpdAmini::palH369::sgfp::pantoB*</i>
p2197	<i>gpdAmini::mCherry::PLCd2::palF(cDNA)::ha3::ub::pyroA*</i>

**Tabla M&M.2- Tabla con los plásmidos utilizados en esta tesis.**

### 3.3.2-Oligonucleótidos

Se utilizó el programa informático VectorNti 10 para diseñar los oligonucleótidos empleados en este trabajo, que fueron posteriormente solicitados y administrados por Sigma-Aldrich. A continuación, se detallan en la siguiente tabla:

Código	Nombre	Secuencia
1	palH R1 deletion Fw	GTGGAACGTATCGAGGCTTTGG
2	palH R1 deletion Rv	CACCAACACCCACGACCGAC
3	HF1	GTCTTACCCATCTGCCTCCTCG
4	palH R4 deletion Rv	CACCAACACCCACGACCGAC
5	S130A 5' primer	CGACATGGGATGGTCGCCGGGTCCTACAGCAATAATTC
6	S130A 3' primer	GAATTATTGCTGTAGGACCCGGCGACCATCCCATGTTCG
7	H296A 5' primer	CGAAACATCGATTTCGCCTTCTTTGCTCCTAAGATGAGAAAT ATATGTCTCGTTGCGC
8	H296A 3' primer	GCGCAACGAGACATATATTTCTCATCTTAGGAGCAAAGAA GGCGAATCGATGTTTCG
9	P316A 5' primer	GTGTGCAGTGTTGATAGCCGTTGTCTTCTTTGTCC
10	P316A 3' primer	GGACAAAGAAGACAACGGCTATCAACACTGCACAC
11	S132A 5' primer	GGGATGGTCGCCGGGCCTACAGCAATAATTCG
12	S132A 3' primer	CGAATTATTGCTGTAGGCCCCGGCGACCATCCC
13	K298A 5' primer	CGCCTTCTTTGCTCCTGCGATGAGAAATATATGTCTCGTTG CGC

## Materiales y Métodos

14	K298A 3' primer	GCGCAACGAGACATATATTTCTCATCGCAGGAGCAAAGAA GGCG
15	S134A 5' primer	GTCGCCGGGGCTACGCCAATAATTCGTCGGTC
16	S134A 3' primer	GACCGACGAATTATTGGCGTAGGCCCGGGCGAC
17	R300A 5' primer	CGCCTTCTTTGCTCCTGCGATGGCAAATATATGTCTCGTTG CGC
18	R300A 3' primer	GCGCAACGAGACATATATTTGCCATCGCAGGAGCAAAGAA GGCG
19	S137A s138A 5' primer	CCGGGGCCTACGCCAATAATGCGGGCGTCTGGGTGTTGG
20	S137A S138A 3' primer	CCAACACCCACGACCGCCGATTATTGGCGTAGGCCCGG
21	End3 5' primer	GCCTGTTCTCTCACAGCAGCCAC
22	End3 3' primer	GAACGCCTGAACTCCTCGCCAAG
23	D238A Fw	AAACTGCAGTTGCGGCATGTGGATACGG
24	D238A Rv	CCAGAATCGCAAAAATAGTTGCCAGGACAATCAGCGCAA AACCC
25	F319A Fw	GTGTGCAGTGTTGATACCCGTTGTCGCCTTTGTCCTAGATA TTGCG
26	F319A Rv	CGCAATATCTAGGACAAAGGCGACAACGGGTATCAACACT GCACAC
27	F320A Fw	CAGTGTTGATACCCGTTGTCGCCGAGTCCTAGATATTGCG AAACCAG
28	F320A Rv	CTGGTTTCGCAATATCTAGGACTGCGGGCACAACGGGTAT CAACACTG
29	W332A Fw	GCGAAACCAGAAATAGCTGGTGCGGGTACATATATAAGAT GGGTTGG
30	W332A Rv	CCAACCCATCTTATATATGTACCCGCACCAGCTATTTCTGG TTTCGC
31	W338A Fw	GGTACATATATAAGAGCGGTTGGCTCCGCGGCAGC
32	W338A Rv	GCTGCCGCGGAGCCAACCGCTCTTATATATGTACC
33	EcoRI Fw	AAAGAATTCGAGAAATGGCGGGCGGTG
34	GA Fw	GCCTGCACCTGCTCCTGCTCCTGCACCTGCCTCAGAAGGCG TGACTTCAATCATCTCATC
35	GA Rv	GCAGGTGCAGGAGCAGGAGCAGGTGCAGGCCGTGATCAG CGGATGAAAGTGATTCAG
36	PstI Rv	AAACTGCAGTTGATAATGTGGGC
37	Fw sequencing PalF BS	CGACTTTATGAAGATGCTATTCCG
38	Rv sequencing PalF BS	GTGGCTTACCCGAGTACACATAGC
39	palH Fw	CCTATACCGAGCCGAGGAGACAG
40	palH 3'UTR Rv	GCCGATACTCCCCGCTAAATCC
41	gpdA Term Rv	GGCAACTTAATAGACCAAGGAG

## Materiales y Métodos

42	alcA Fw sequencing	GCACGGAGAGCCACAAACGAG
43	HR1	TCGTGAATGTCTAGTGCCGCAC
44	Sólo F320A Fw	CAGTGTTGATACCCGTTGTCTTCGCTGTCCTAGATATTGCG AAACCAG
45	Sólo F320A Rv	CTGGTTTCGCAATATCTAGGACAGCGAAGACAACGGGTAT CAACACTG
46	PalH Fw antes intron	CACAAGATCCTATGTCCCTG
47	PalF Fw antes intron	GTAACGGCGTCGCAACATTG
48	PalF Rv después intron	GTAAGAAATGGTGCCCCCTCTC
49	PalI secuencia mutación Fw	CGTTGGCAACTTTTGACAATG
50	PalI secuencia mutación Rv	CAAAGAGCAGTATATCGACC
51	NcoI_PalF Fw	AAACCATGGTTAGGGCGACGTGTTG
52	PalF_HindIII Rv	TTTAAGCTTGGCACCGGCTCCAGCGCCTG
53	HindIII_GFP Fw	TTTAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
54	GFP_EcoRI Rv	AAAGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
55	Linker Fw	GCCGCAGGATTCCGCAAGGGCG
56	NcoI mCherry mut Fw	CGTAATGCAGAAGAAGACGATGGGCTGGGAGGCCTCC
57	NcoI mCherry mut Rv	GGAGGCCTCCCAGCCCATCGTCTTCTTCTGCATTACG
58	HindIII_mCherry Fw	TTTAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
59	GFP_HindIII Rv	TTTAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
60	mCherry_HindIII Rv	TTTAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGC
61	gpdAmini_HindIII Rv	GGTCATCCTGGAGCCCGTGCATAAGCTTCCATGGTGATGT CTGCTCAAG
62	palF Fw	GTGATACTGTGAGACCCTTTACTCCTTCATGGTTAGGGCGA CGTCTTC
63	HindIII_palF Fw	TTTAAGCTTGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCAA TGTTAGGGCGACGTGTTG
64	palF_EcoRI Rv	AAAGAATTCTTAACGTTGATACCGGGTAATAG
65	palF seq2 Fw	GATATCAAGACTTCAATCC
66	palF seq3 Fw	CGGATGAGCCTATGGACG
67	STOP mCherry Fw	CAACATCAAGTTGGACATCAC
68	PLCd_5xGAs Rv	GGCACCAGCCCCTGCGCCGGCTCCCGCACCTTCTGCCGCT GGTCCATGGAG
69	5xGAs_palF Fw	GGTGCGGGAGCCGGCGCAGGGGCTGGTGCCATGGTTAGG GCGACGTGTTTCATG
70	mCherry_EcoRI Rv	AAAGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
71	NcoI_GFP Fw ok	AAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG

## Materiales y Métodos

72	NsiI_HindIII_5xGAs_ palF Fw	GCTATGCATATATATGAATTCATATATAAGCTTGGTGCGG GAGCCGGCGCAGGGGCTGGTGCCATGGTTAGGGCGACGTG TTCATG
73	sGFP_XmaI	AAACCCCGGGCTGCAGCCGGGCG
74	HindIII_PLCd Fw ok	CTTGAGCAGACATCACCATGGAAGCTATGCACGGGCTCCA GGATGACC
75	NcoI_mCherry Fw ok	AAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGC
76	Linker Rv	CGCCCTTGCGGAATCCTGCGGC
77	S86P palF Fw mod	CGCATAACACATTTGGTTATCCCTTTGCACGGCATTGTCAA AGTCTTC
78	S86P palF Rv mod	GAAGACTTTGACAATGCCGTGCAAAGGGATAACCAATGT GTTATGCG
79	NotI_pantoB Fw	AAAGCGCCGCCCCGGCTGCAGCCCGGGGATCTGAAACA GG
80	NotI_pantoB Rv	AAAGCGCCGCTCTAGAACTAGTG
81	p1949sec Fw	CGTCGGAGGTCATTGATGGCACC
82	pyr-4 Fw	CGCAGCCACACTGGTCCCTC
83	pyr-4 Rv	CTTGCGGTCCTCGAAGATGAG
84	palH NcoI Fw	CCATGGAGGATGACGGCC
85	palH ClaI Rv	ATCGATGTTTCGATAATGAG
86	palH ClaI Fw	ATCGATTGCTTCTTTTCATC
87	palH XmaI Rv	CCCGGGTCACTGAGCAGCGTAATCTG
88	Start sGFP Rv	CGGACACGCTGAACTTGTGG
89	STOP sGFP Fw	CCCAACGAGAAGCGCGATCAC
90	Start mCherry Rv	CTCGAACTCGTGGCCGTTTAC
91	KpnI_gpdAmini Fw	AAAGGTACCGGGCCCCCTCGACCCATCC
92	gdpAmini_HindIII Rv	GGTCATCCTGGAGCCCGTGCATAAGCTTCCATGGTGATGT CTGCTCAAG
93	HindIII_5xGAs_palF Fw	AAAAAGCTTGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCA ATGGTTAGGGCGACG
94	palF_XmaI Rv	AAACCCGGGTCACTGAGCAGCGTAATCTGG
95	Ubi_XmaI Rv	AAACCCGGGTCAACCACCACGAAGACGAAG
96	NsiI_PLCd Fw	AAAATGCATGGGCTCCAGGATGACCCGGAC
97	PLCd_EcoRI Rv	AAAGAATTCGCCCTTGCGGAATCCTGCGG
98	EcoRI_PLCd Fw	AAAGAATTCGCCCTTGCGGAATCCGCCGC
99	PLCd_HindIII Rv	AAAAAGCTTCTTCTGCGGCTGGTCCATGG
100	Fot1 seq Fw	CTCAACCCATTATCGAGGATG
101	Fot1 seq Rv	GACTGTGAAAGAGGCTGCGAG
102	NsiI_mCherry Fw	AAAATGCATGTGAGCAAGGGCGAGGAGGC
103	mCherry_5xGAs_NsiI Rv	AAAATGCATTGCACCGGCTCCAGCGCTGCACCAGCTCCC TTGTACAGCTCGTCCATGC

## Materiales y Métodos

104	Nkua Fw	GTCCTAGCCGAATCATCCGC
105	Nkua Rv	CCCAACGACCCTGACGCC
106	pacC Fw	GCTGATCTGTCCTCTGTTTCGGCACG
107	pacC Rv	CGCCGCTGTTGCAGTCACAGAGG
108	Delección región 1 Rv	GAAAGCGAAGATCCGCAAGGGTTGCCATGCCCTTCATGG
109	Delección región 1 Fw	CCATGAAGGGCATGGCAACCCTTGCGGATCTTCGCTTTC
110	Delección región 2 Rv	CAACCGATGGCGGTTTCATCGAGGAAGAAGGGTTCCTCTCC
111	Delección región 2 Fw	GGAGAGGAACCCTTCTTCCTCGATGAACCGCCATCGGTTG
112	Delección región 3 Rv	GAGCGGCGCCGATCAGGGCCAGGATACATGGTCACC
113	Delección región 3 Fw	GGTGACCATGTATCCTGGCCCTGATCGGCGCCGCTC
114	Delección región cola Rv	CGAGATGAGAGGAAAGACGGGGCTGGTGCAGGCGCTGGA G
115	Delección región cola Fw	CTCCAGCGCCTGCACCAGCCCCGTCTTCTCTCATCTCG
116	Delección región 4 Rv	CAAGATCCTATGTCCCTGGGGACGACGACCGAACATGCG
117	Delección región 4 Fw	CGCATGTTGCGTTCGTCGTCCTCCAGGGACATAGGATCTTG
118	5'UTR palH Fw	AGCTATGACCATGATTACGCC
119	3'UTR palH Rv	CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGGCGATCATACCCGCC CTCTTTTGTG

**Tabla M&M.3- Tabla con los distintos oligonucleótidos utilizados en esta tesis**

## 3.4-MANEJO DE *E. coli*

### 3.4.1-Transformación

Para transformar células competentes de las estirpes DH1 y DH5 $\alpha$  (ver apartado 3.2.2), se utilizó el protocolo del choque térmico descrito por Hannahan [192]. En un tubo se mezclaron 90  $\mu$ l de células competentes con la cantidad adecuada de DNA y se incubaron 30 minutos en hielo. Pasado ese tiempo, se aplicó un choque térmico de 37°C durante 2 minutos y se dejó otra vez en hielo durante 2 minutos más. A continuación, se añadió 1 ml de LB fresco y estéril a la mezcla y se cultivó con agitación (250 rpm) durante 1 hora a 37°C. Se inocularon

100 µl del cultivo, en placas con LB sólido suplementado con ampicilina, que se incubaron durante 18-24 horas a 37°C.

### **3.4.2-Extracción de DNA plasmídico de *E.coli***

Para obtener el DNA plasmídico del clon bacteriano de interés, se inoculó la colonia en 3 ml de LB líquido suplementado con ampicilina 100 µg/ml. El cultivo se creció en agitación (250 rpm), a 37°C y durante 15 horas. Posteriormente, se extrajo el DNA de plásmido con el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). La extracción fue verificada mediante electroforesis en un gel de agarosa (0.8% p/v).

### **3.4.3-Obtención de proteínas recombinantes en *E. coli***

La expresión de proteínas de fusión se llevó a cabo en la cepa DH1 de *E. coli* transformada con el plásmido de expresión adecuado derivado de pGEX-2T. Se realizó un precultivo de la bacteria en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y se dejó crecer con agitación a 37°C durante 16 horas. Posteriormente, se diluyó 50 veces ( $D.O_{600} \sim 0.1$  unidades) en un volumen final de LB de 50 ml, al que se le añadió ampicilina (100 µg/ml), y se cultivó en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.7-0.8 unidades. En ese momento, se cambió el cultivo a 15°C y se dejó atemperar durante 1 hora antes de añadir el IPTG a una concentración de 0.1 mM. El cultivo se incubó a 15°C durante 20 horas adicionales tras las cuales, se centrifugó a 16000 g durante 10 minutos. A continuación, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 ml de tampón BB50 (50 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) al que se le había añadido el cóctel de inhibidores de proteasas Complete EDTA-Free (Roche Diagnostics, 1 pastilla/50ml). Se utilizó una French Press (French Pressure Cell Press, American Instrument Company) para lisar las bacterias y los lisados se centrifugaron a 20000 g durante 30 minutos y a 4 °C (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor Sorvall SS-34) para eliminar material insoluble y restos celulares. Finalmente, las proteínas se visualizaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida que posteriormente se tiñó con Coomassie G250 (Bio-Safe, BioRad) y se guardaron en hielo previa utilización.

### **3.5-MANEJO DE *A. nidulans***

#### **3.5.1-Mantenimiento y cultivo**

Se utilizó el medio MCA sólido (véase apartado 3.1.5), con los suplementos necesarios, para el mantenimiento de cepas y la obtención de conidiosporas. Los conidios se recogieron por raspado de la superficie de las colonias con una espátula estéril y se resuspendieron en una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v).

#### **3.5.2-Transformación**

Se utilizó el protocolo de transformación de *Aspergillus nidulans* descrito por Tilburn *et al* [193]. Se inocularon  $2 \times 10^6$  esporas en un cultivo de MMA de 400 ml, con los requerimientos necesarios para cada estirpe y con D-glucosa (1% p/v) y tartrato amónico (5 mM concentración final) como fuentes respectivas de carbono y nitrógeno. Se incubó con agitación durante 14-16 h a 30°C y el micelio obtenido se recogió por filtración a través de Miracloth (muselina con un diámetro de poro de 22-25  $\mu\text{m}$ ; Calbiochem 475855) y se lavó con agua destilada estéril. Se resuspendió ~1 g de micelio en 25 ml de tampón de protoplastos ( $\text{MgSO}_4$  1.2 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5.6 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  14.4 mM; pH 5.8) esterilizado por filtración y enfriado. Para destruir la pared celular, se utilizó la enzima lítica Vinoflow<sup>®</sup> (Novozymes) a una concentración de 200 mg/g micelio. La suspensión se pre-incubó durante 5 minutos a 4°C, tras los cuales se incubó a 30°C con agitación suave durante 1:15-1:30 horas. Pasado ese tiempo, se inspeccionó al microscopio el estado de la digestión y la formación de los protoplastos.

Una vez obtenidos los protoplastos, la suspensión se agitó en vórtex para liberar aquellos protoplastos atrapados en restos de micelio. Después, se depositó 12.5 ml de la suspensión en tubos Falcon<sup>®</sup> de 50 ml estériles y se añadió el mismo volumen de la solución “colchón de flotación” (D-Sorbitol 0.6 M, Tris-HCl 0.1 M a pH 7.5) fría y estéril. La mezcla se centrifugó a 4°C durante 10 minutos y 4000 g (rotor A-4-44, centrífuga eppendorf 5810R). Tras la centrifugación, se formó un anillo de protoplastos en la interfase entre el colchón de flotación y el tampón de protoplastos. Se recogieron los protoplastos con pipeta Pasteur estéril y se diluyeron en 2 volúmenes de solución ST (D-Sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM a pH 7.5). Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 4°C y 2800 g, durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó por decantación y el “pellet” de protoplastos se lavó con 1 ml de solución ST, mediante resuspensión y posterior centrifugación en un tubo eppendorf a 12100 g durante 1 minuto. Esta operación se repitió 4 veces más, utilizando la solución STC (D-Sorbitol

1 M, Tris-HCl 10 mM a pH 7.5 y CaCl<sub>2</sub> 10 mM) en el último de los lavados. Tras el último lavado, se contaron los protoplastos en una cámara de Neubauer.

Una vez contados, se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en el volumen adecuado de solución STC para obtener  $\sim 5 \times 10^7$  protoplastos/100  $\mu$ l. Se depositaron en 2 tubos Falcon<sup>®</sup> de 50 ml estériles, 200  $\mu$ l de la anterior suspensión de protoplastos y se añadió en uno de los tubos el DNA transformante (1-3  $\mu$ g). Además, se añadió en ambos 50  $\mu$ l de solución de polietilenglicol, SPEG [PEG 6000 (Fluka) 60% (p/v), Tris-HCl 10 mM a pH 7.5 y CaCl<sub>2</sub> 10 mM]. Se homogenizó con cuidado la suspensión y se incubó a 4°C durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, se añadió 1 ml adicional de SPEG a la mezcla, se homogenizó y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 3 ml de solución STC a cada tubo y 15 ml de MMR-TOP (véase apartado 3.1.7), atemperado a 48°C y que contenía 1% de D-glucosa (p/v), 5 mM de tartrato amónico y los requerimientos adecuados. La mezcla se homogenizó con cuidado por inversión y se sembró en placas de MMR (ver apartado 3.1.7) que contenían tartrato de amonio 5 mM (concentración final), D-glucosa al 1% (p/v) y los suplementos necesarios. Las placas se cultivaron a 37°C durante 3-4 días para que los transformantes crecieran adecuadamente.

### 3.5.3-Cruces entre cepas

Muchos de los análisis genéticos realizados en esta tesis, así como estirpes obtenidas para este trabajo, se adquirieron de la progenie de diversos cruces. Mediante el ciclo sexual de *Aspergillus nidulans* es posible obtener descendencia derivada de la recombinación meiótica entre dos cepas. Inicialmente, se enfrentaron en medio MCA con los requerimientos necesarios, dos cepas parentales muy próximas entre sí. Tras dos días de crecimiento a 37°C, se recortaron pequeñas porciones de la zona de contacto entre las dos cepas y se traspasaron a placas de MMA selectivo, suplementado con D-glucosa 1% (p/v), tartrato amónico 5 mM y nitrato de sodio 10 mM (concentraciones finales), lo que permite el crecimiento de heterocariontes. Las placas se incubaron a 37°C hasta que se formaron sectores heterocarióticos. Para inducir el ciclo sexual, las placas se sellaron con el fin de conseguir las condiciones de anaerobiosis adecuadas, y se incubaron a 37°C. Los cleistotecios se formaron a los 10-15 días posteriores al sellado de las placas. Éstos, se recogieron con una aguja estéril, se depositaron en placas de agar solidificado al 3% (p/v) y se rodaron para eliminar las células de *Hülle* adheridas al cuerpo fructífero. A continuación, el cleistotecio se introdujo en un tubo eppendorf que contenía 100  $\mu$ l de agua estéril y se rompió contra las paredes del tubo para liberar las ascosporas. Se estriaron 10  $\mu$ l de la solución de ascosporas en una placa de MMA selectivo y se cultivó a 37°C durante 2

días, para comprobar si el cleistotecio era híbrido. El fenotipo de las ascosporas de los cleistotecios cruzados se estudió en placas de MMA complementadas con los requerimientos para cada uno de los marcadores de las estirpes parentales.

### **3.5.4-Aislamiento de DNA**

#### **3.5.4.A-Aislamiento “limpio” de DNA genómico**

Para poder extraer el DNA genómico de *Aspergillus*, se recolectaron 200-300 mg de micelio por filtración en Miracloth, de un cultivo de 20 ml de MMA con D-glucosa (1% p/v), tartrato amónico (5 mM concentración final) y los suplementos necesarios para la cepa en cuestión. Una vez recolectado el micelio, se prensó, se congeló en nieve carbónica y se liofilizó en un liofilizador Cryodos (Telstar) durante 10 horas. La masa de micelio liofilizado se pulverizó utilizando un molino FP120 Fast Prep Cell Disruptor (BIO101/Savant) a potencia 4.0 durante 10 segundos, usando una bola de cerámica del kit comercial FastDNA<sup>®</sup> Kit de BIO101 (Q-Biogen). El polvo de micelio se resuspendió en 1 ml de solución de lisis (0.25 M sacarosa, 25 mM Tris-HCl a pH 8 y 20 mM EDTA) y se agitó en vórtex para homogenizar la mezcla. A continuación se añadió 100 µl de SDS 10% (p/v) y se incubó a 65°C durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, se añadió a la mezcla 1 ml de solución Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión vigorosa para eliminar las proteínas y otros compuestos orgánicos. Se separaron las fases acuosa y orgánica por centrifugación a 16100 g durante 5 minutos. Posteriormente, se recolectó la fase acuosa y se volvió a someter al mismo proceso anterior con la solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Después de centrifugar otra vez a 16100 g por 5 minutos, se volvió a recolectar la fase acuosa y los ácidos nucleicos que contenía se sometieron a un proceso de precipitación, añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y pH 7, y 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por agitación y se centrifugó a durante 5 minutos a 16100 g para sedimentar el DNA precipitado. Una vez descartado el sobrenadante, el “pellet” se lavó con 1 ml de etanol al 80% (v/v) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que las anteriores veces. Se eliminó por decantación el sobrenadante, el sedimento se secó y se añadieron 300 µl de agua MiliQ y 5 mg/ml de RNasa-A (Roche), y se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora para eliminar posibles restos de RNA. Pasado ese tiempo, se volvió a precipitar el DNA como la vez anterior, se lavó con 500 µl de etanol al 80% y una vez seco, se resuspendió el DNA en 50-200 µl de agua MiliQ, momento en el que se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **3.5.4.B-Aislamiento de DNA genómico de esporas**

Este protocolo se utilizó como método rápido de extracción de DNA para el genotipado de estirpes mediante PCR. Se resuspendieron en 100 µl de “Breaking Buffer” (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl a pH 8 y 1 mM EDTA a pH 8), conidiosporas recogidas con un palillo estéril de la estirpe problema. Posteriormente, se añadieron 150 mg de esferas de vidrio de 0.45-0.60 mm de diámetro (Sartorius) y la suspensión se incubó a 70°C durante 30 minutos con una agitación de 30 segundos cada 10 minutos, en agitador de mesa. A continuación, se añadió 100 µl de la solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico descrita en el apartado anterior y se agitó la mezcla durante 5 minutos de forma vigorosa con un vórtex. Para finalizar, se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 16100 g y se recogieron 15 µl de la fase acuosa que contiene el DNA para su posterior uso en las PCR. Si su utilización no fue inmediata, El DNA se almacenó a -20°C.

### **3.5.5-Método de extracción de proteína total**

Para la extracción de proteínas totales en *Aspergillus*, se utilizó una variación descrita por Hervás *et al.* [170], del protocolo de lisis alcalina utilizado en levaduras [194]. Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de 200-300 mg de micelio filtrado en Miracloth, prensado, depositado en tubo de rosca de 2 ml, congelado en nieve carbónica y liofilizado. El micelio liofilizado se rompió utilizando una bola de cerámica, con un pulso de 10 segundos a velocidad 4.0, en el molino FP120 FastPrep. Posteriormente, se depositaron 6-7 mg de micelio en tubos eppendorf de 2 ml y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis [0.2 M NaOH y 0.2% (v/v) β-mercaptoetanol]. Se agitó en un vórtex y se añadió TCA a una concentración final de 7.5% (v/v). A continuación los extractos se incubaron en hielo durante 10 minutos y después se centrifugaron a 16000 g y 4°C, durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se descartó por aspiración mediante bomba de vacío y se añadieron 100 µl de Tris 1 M y 200 µl de tampón de Laemmli [62,5 mM Tris-HCl a pH6.8, 2% SDS (p/v), 5% β-mercaptoetanol (v/v), 6 M urea, 0.05% y azul de bromofenol (p/v)] al sedimento obtenido. Para finalizar, el precipitado se resuspendió, las muestras se calentaron a 90°C durante 2 minutos y se centrifugaron a 16100 g durante 1 minuto, operación que se volvió a repetir previamente a cargar un gel de electroforesis SDS-PAGE. Si el gel no se cargó inmediatamente después de la operación de calentado-centrifugado, las muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

### 3.5.6-Método de extracción de proteína soluble

Este método se utilizó para obtener proteína que más tarde se emplearía en ensayos de interacción proteína-proteína o *pull down* (véase apartado 3.6.7). Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de 200-250 mg de micelio filtrado con Miracloth, prensado, congelado en nieve carbónica y liofilizado. Una vez liofilizado, se repartieron cantidades equitativas de micelio en diferentes tubos de rosca de 2 ml y se procedió a su pulverización mediante bola de cerámica, utilizando el molino FastPrep con fuerza 4.0, durante 10 segundos. A continuación se añadió 1 ml de tampón A50 [HEPES 25 mM pH 7,5; KCl 50 mM; Mg Cl<sub>2</sub> 5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol 10% (v/v); 0,5 mM ditiotreitól (DTT); 1 μM pepstatina (Roche); 0,6 μM leupeptina (Roche), 1 mM Pefablock (Roche), 2 μM MG132 (Peptide institute), 50 mM N-etilmaleimida y 0.5% Triton X100]. A la suspensión se añadieron 0,3 g de bolas de vidrio de un diámetro de 0,40 a 0,60 mm (Sartorius) y se sometió a un pulso de 10 segundos a fuerza 4.0 en el Fast Prep Cell Disruptor, operación que se repitió tres veces más con pasos de incubación en hielo de un minuto entre pulso y pulso para evitar el sobrecalentamiento mecánico. Esta operación se repitió durante dos veces más, con un minuto de incubación en hielo de las muestras entre cada pulso para evitar su calentamiento. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 16100 g, a 4°C, durante 30 minutos. Una vez centrifugadas, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford, utilizando una recta patrón de concentraciones conocidas de lisozima (Sigma, rango de valores de 1 a 10 μg/μl). Las muestras se guardaron en hielo previo uso.

### 3.5.7-Obtención de extractos de membrana

Se utilizó este protocolo para poder realizar los ensayos de defosforilación de PalH. Debido a que no se puede cuantificar la proteína, se decidió procesar la misma cantidad de micelio liofilizado y pulverizado (80 mg) en todas las muestras. Los volúmenes de solución MPE (para 5 ml: 0.5 ml de Tris-HCl 1 M a pH 7.5, 0.15 ml de Nalco<sup>®</sup> 5 M, 0.05 ml de EDTA 0.5 M, 0.20 ml de mezcla inhibidora de proteasas libre de EDTA (1 pastilla/2 ml agua MiliQ, Roche), 0.125 ml de N-etilmaleimida (NEM-Sigma ultra E1271-1G) 1 M y hasta 5 ml con agua MiliQ) y de tampón de Laemmli se especifican en cada caso. La extracción consta de los siguientes pasos:

### ***3.5.7.A-Preparación de extractos crudos***

Se procedió a pulverizar el micelio liofilizado mediante bola de cerámica en el molino FP120 FastPrep durante 10 segundos a una velocidad de 4.0 m/s. Una vez pulverizado, se pesaron 80 mg de micelio por muestra y se añadió bolas de vidrio de 0,45-060 µm de diámetro. Las muestras se resuspendieron utilizando el vórtex en 1 ml de tampón MPE. A partir de este punto, las muestras se mantuvieron en hielo tanto como fue posible, para evitar la degradación de las proteínas. Las muestras se mezclaron en el molino FastPrep con 4 pulsos de 45 segundos, con periodos de descanso en hielo de 1 minuto para evitar el sobrecalentamiento. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 3 minutos y a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo y el precipitado se volvió a resuspender en tampón MPE. Se repitió el paso de centrifugación anterior y se recogieron los sobrenadantes que se mezclaron con los obtenidos anteriormente. Por último, se centrifugaron los sobrenadantes a 3000 rpm, 3 minutos y 4°C y se transfirieron a tubos nuevos. De esta manera se obtuvieron los extractos crudos.

### ***3.5.7.B-Obtención de fracciones de membrana***

Los extractos crudos se centrifugaron a 14000 rpm y 2°C durante 45 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón MPE con 5 M urea. Las muestras se dejaron en rotación en una noria a 4°C, durante 30 minutos. Posteriormente, las fracciones de membrana se recolectaron por centrifugación a 14000 rpm y 2°C durante 45 minutos. El precipitado se resuspendió en 1 ml de MPE sin urea.

### ***3.5.7.C-Precipitación de las proteínas de membrana***

Las proteínas de membrana se precipitaron añadiendo un 10% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA). Las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 14000 rpm, 5 minutos a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y los precipitados se lavaron con dos mezclas diferentes de etanol:éter, 1:3 y 1:1 respectivamente, con pasos de centrifugación a 14000 rpm, 3 minutos y a 4°C. Tras la última centrifugación y eliminación del sobrenadante, los precipitados se dejaron secar al aire para eliminar los restos de la solución de etanol:éter y se resuspendieron en tampón de Laemmli o se con tampón MPE para proceder con el ensayo de defosforilación (véase punto 3.6.6).

### **3.5.8-Obtención de transformantes para transgenes integrados en los loci *pyroA*, *pantoB* o *argB***

El plásmido empleado para la integración de un transgén en el locus *argB* fue derivado de p2024, y la estirpe receptora fue MAD976, que lleva el alelo mutante *argB2*. Para transformarla, se utilizó la forma circular del plásmido que contenía una copia del gen *argB* mutada en un sitio BglIII, de manera que únicamente se precisó un único suceso recombinatorio para la integración, recuperándose así la prototrofia para arginina gracias a que las dos mutaciones en *argB* dejan una ventana de recombinación de 150 pb para reconstruir el gen silvestre. Los transformantes se seleccionaron en placas de MMR, con 1% de glucosa (p/v) y 5 mM de tartrato amónico como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, y sin arginina. Los transformantes obtenidos se purificaron para evitar la heterocariosis estriando conidiosporas en medio sin arginina. Se identificaron los transformantes portadores de una única copia del transgén mediante *Southern blot*, a partir de digestiones con la enzima de DNA genómico obtenido de los distintos transformantes y utilizando una sonda radiactiva (marcada con [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP) que hibridaba con el gen *argB*.

En el caso de la integración el locus *pyroA*, los vectores empleados derivaron del p1734 o p1914 y p1915, y las estirpes receptoras fueron MAD2743 o MAD4576. En este caso, los plásmidos contienen un copia truncada de *pyroA*, mientras que las estirpes indicadas, auxótrofas para piridoxina, llevan el alelo *pyroA4*. Al igual que en el caso anterior, ocurre un único suceso de recombinación que restaura la prototrofia para piridoxina y permite integrar el transgén deseado. Los transformantes se obtuvieron en placas de MMR suplementadas con las mismas fuentes de carbono y nitrógeno que en el caso anterior, pero sin piridoxina. La selección de transformantes se llevó a cabo, como la vez anterior, en placas de MMA pero en este caso sin piridoxina. El análisis de los transformantes se realizó mediante *Southern blot*, utilizando una sonda radiactiva que hibridaba en el gen *pyroA*.

En la integración en el locus *pantoB*, los plásmidos derivaron del p1943, y las cepas receptoras fueron MAD2743 y MAD4576. Como en el caso anterior, los plásmidos contienen una copia truncada de *pantoB*, mientras que las estirpes indicadas llevan el alelo mutado *pantoB100* y son auxótrofas para pantotenato de calcio y pantolactona. Los transformantes se obtuvieron en placas de MMR con las mismas fuentes de carbono y nitrógeno que en ocasiones anteriores y sin pantotenato cálcico. Una vez obtenidos, se realizó su purificación en placas de MMA sin pantotenato. El análisis de los transformantes se realizó por *Southern blot*, con el uso de una sonda radiactiva que hibridaba en el gen *pantoB*.

### **3.5.9-Obtención de transformantes por remplazamiento génico en el locus de *palH***

Para obtener el etiquetado de PalH con el epítipo triple de HA (HA<sub>3</sub>) así como los distintos mutantes de sustitución en PalH y expresarlos a niveles fisiológicos, se utilizó la construcción p1949 [ésta contiene el gen *palH* con la secuencia codificante para el triple HA situada en el extremo C-terminal, seguido por el gen *pyrG* de *A. fumigatus* (*pyrGfum*) y todo ello flanqueado por las regiones 5'UTR y 3'UTR de *palH*, véase figura R.1.A] y derivadas, linealizándola previamente con la enzima NotI. Las distintas construcciones se introdujeron por reemplazamiento génico en la cepa MAD2668. Esa estirpe se había obtenido previamente de la MAD1737 (*pyroA4 pyrG89 ΔnkuA::bar*), donde se había eliminado la secuencia codificante del gen *palH* mediante su sustitución con la secuencia del gen *pyroA* de *A. fumigatus* (*pyroAfum*), flanqueado por las regiones 5'UTR y 3'UTR de *palH*, lo que permitía asegurar el reemplazamiento del gen *palH* por las construcciones deseadas. En todos los eventos de integración génica se produjo una doble recombinación entre los extremos 5' y 3' UTR del vector y los del locus *palH*. El análisis de los transformantes se realizó por *Southern blot*, con el uso de una sonda radiactiva que hibridaba con el gen *palH*.

### **3.5.10-Cultivos para ensayo de respuesta a pH alcalino**

Este tipo de ensayos permiten estudiar la respuesta a corto plazo de la activación de la ruta de pH, mediante el análisis de la activación y cinética del procesamiento de PacC. Para ello, se cultivó la cepa de interés además de una cepa control (MAD4256) en medio MFA o MMA líquido, suplementado tal y como se indica en los apartados 3.1.6 y 3.1.2, respectivamente. El pH inicial se ajustó a ~4.3 con citrato de sodio 50 mM (concentración final). Se inoculó en el cultivo  $3 \times 10^7$  esporas, resuspendidas en Tween 80 (0.01% v/v) y se creció a 37°C (MFA) o a 30°C (MMA) durante 15 horas. Pasado ese tiempo, se recogió el micelio por filtración a través de Miracloth, se guardó una pequeña porción (tiempo 0) que se prensó, se introdujo en un tubo de rosca de 2 ml y se congeló en nieve carbónica, y se pasó el resto del micelio a otro cultivo de MFA o MMA líquido con los mismos requerimientos, pero cuyo pH se ajustó a ~7 con tampón fosfato o a ~8 con HEPES 100 mM y NaOH. Se recogieron muestras de micelio a intervalos de tiempo estandarizados, se prensaron, se introdujeron en tubos de rosca de 2ml y se congelaron en nieve carbónica. Una vez realizado el experimento, se liofilizaron todas las muestras durante 10 horas.

El medio MFA se utilizó en las etapas iniciales de este trabajo, como se indica en cada caso en particular. Para el resto, se utilizó el medio MMA líquido.

### **3.5.11-Tests fenotípicos de crecimiento en medio sólido para la ruta de *pH***

Los tests fenotípicos de crecimiento para comprobar el estado de la ruta, se realizaron en placas de MMA sólido, con glucosa 1% (p/v) y tartrato de amonio 5 mM, además de los requerimientos necesarios para cada estirpe. El crecimiento se evaluó a las 48 horas de crecimiento a 37°C. Los principales tests que se llevaron a cabo son los siguientes:

- Ensayo de sensibilidad al pH ácido:** mediante la adición de 200 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dejando un pH aproximado de 5.
- Ensayos de sensibilidad al pH alcalino:** se utilizó el MMA-pH 8.3.
- Ensayo de sensibilidad a litio:** se añadió cloruro de litio 300 mM (Merck) al medio.
- Ensayo de sensibilidad a molibdato:** se añadieron 2.5 mg/ml (10 mM) o 5 mg/ml (20 mM) de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck) al medio.
- Ensayo de sensibilidad a neomicina:** se añadieron 1 o 2 mg/ml de sulfato de neomicina (Sigma) al medio.

## **3.6-TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **3.6.1-Genotipado de estirpes por PCR**

Para genotipar los descendientes de los cruces realizados en este trabajo, se utilizó 1 µl del DNA obtenido mediante esporas (véase el apartado 3.4.4.B), como molde para la reacción de PCR. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µl con una concentración de 200 µM de los distintos dNTP, 6 mM de la pareja correspondiente de oligonucleótidos y 0.5 ml de la Taq DNA polimerasa (obtenida y purificada como aparece en). Previamente a la adición de la polimerasa todas las reacciones se calentaron 2 minutos a 94°C (Hot-Start). Los ciclos, así como las temperaturas de anillamiento y extensión se fijaron según cada caso, dependiendo de la longitud del DNA a amplificar y de las características de cada pareja de cebadores. Sin embargo, las condiciones de referencias son las siguientes:

- Desnaturalización: 94°C, 15 segundos.
- Hibridación: 55°C, 30 segundos.
- Extensión: 72°C. 1 kb/min
- Número de ciclos: 30

Se programó un último ciclo de elongación de 7 minutos a 72°C para finalizar el máximo número posible de reacciones inacabadas.

### **3.6.2-Mutagénesis dirigida**

Se utilizó esta técnica para generar deleciones o sustituciones dentro de la secuencia de *palH*. El primer paso fue diseñar los oligonucleótidos mutagénicos, los cuales deben contener la mutación, y su secuencia debe ser igual entre ellos y a la del DNA molde al que se vayan a hibridar, pero inversa. Los cebadores deben tener una longitud entre 25 y 45 pares de bases, deben contener la mutación deseada en la zona central del oligonucleótido y deben dejar al menos 10-15 nucleótidos a ambos lados de la mutación. Además, la  $T_m$  debe ser mayor o igual a 78°C, deben tener un contenido en guanina-citosina igual o superior al 40% y sus extremos deben ser ricos en estos nucleótidos.

Utilizando la pareja de cebadores mutagénicos, se realizó una PCR de 16 ciclos empleando la polimerasa Pfu Turbo (Agilent), en la que el paso limitante fue el tiempo de extensión, el cual debe ser lo suficientemente largo como para poder replicar el plásmido que se utiliza como DNA molde.

Una vez realizada la PCR, su producto se digirió con la enzima DpnI, que reconoce el DNA metilado (en este caso el plásmido molde o parental utilizado en la reacción de PCR) y lo digiere, dejando de esta manera, las cadenas de DNA de nueva síntesis intactas. Así, el plásmido portador de la mutación en ambas hebras de DNA quedó abierto y listo para ser transformado en *E. coli* (*vide supra*). Una vez realizada la transformación en *E. coli*, se extrajo el DNA plasmídico (apartado 3.4.2) y se comprobó por secuenciación la presencia de la mutación.

### **3.6.3- PCR de fusión**

Esta técnica se utilizó para generar las distintas deleciones en PalH (véase resultados, apartado 4.5 y derivados). Se usó la construcción p1949 como base para generar las deleciones por este método. El protocolo que se empleó fue el descrito por Yang y colaboradores [195]. El fragmento de PCR obtenido contenía en sus extremos dianas de restricción, volviéndose a

clonar mediante digestión y ligación en el mismo vector base. En la figura se muestra un esquema representativo del proceso seguido para generar las deleciones. Se obtuvieron por PCR, dos fragmentos distintos que más tarde se fusionaron en un solo. Para la obtención de los distintos fragmentos, se utilizó la polimerasa *Pfu* DNA Polymerase (Promega), mientras que para la fusión de los fragmentos, se utilizó la polimerasa Prime Star<sup>®</sup> HS DNA polymerase (Takara). Se utilizaron en cada caso las condiciones de PCR indicadas por el fabricante, con pequeñas variaciones que dependieron de los oligonucleótidos empleados y del tamaño del amplicón.

### **3.6.4-Southern blot**

Se utilizó el protocolo descrito por Sambrook *et al.* [192], para comprobar la correcta inserción de los diferentes transgenes que se transformaron en *A. nidulans*. Los DNA aislados por el protocolo del apartado 3.4.4.A, se digirieron con una enzima de restricción para obtener un patrón diferencial de bandas que permitiese distinguir la alteración en el locus de interés. Posteriormente, el producto digerido se separó en un gel al 0.8% agarosa/TAE y el DNA se fragmentó con un tratamiento de luz UV en un transiluminador Biorad GelDoc System, con  $\lambda$  de 320 nm durante 5 minutos. El DNA digerido y fragmentado se desnaturalizó sumergiendo el gel en una solución desnaturalizante (1.5 M NaCl y 0.5 M NaOH) durante 45 minutos. Posteriormente, se neutralizó el pH del gel utilizando solución neutralizante (0.5 M Tris-HCl a pH 7.5 y 3 M NaCl). Este paso se llevó a cabo por dos veces con incubaciones de 20 minutos cada vez. Realizado el paso anterior, el gel se lavó en solución 2xSSC (3 M NaCl y 300 mM citrato trisódico a pH 7.4) y se preparó la transferencia de los fragmentos de DNA a una membrana de Nylon (Nytran SPC, Whatman), usando el protocolo de transferencia por capilaridad. El DNA se fijó a la membrana exponiéndola a luz UV y la membrana se incubó en la solución de hibridación Church (para 200 ml: 2 g BSA, 70 ml de SDS 20%, 60 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, 40 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y 400  $\mu$ l de EDTA. El volumen se completó con agua destilada), durante 3 horas antes de proceder a la hibridación de la sonda específica de DNA marcada con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Perkin Elmer).

El marcaje de la sonda radiactiva, se llevó a cabo con el kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó la membrana con la sonda durante 15 horas a 55°C. Posteriormente, la membrana se lavó por 15 minutos y dos veces, con 30 ml de una solución de 2xSSC-0.1% SDS y con 30 ml de una solución 0.2xSSC-0.1%SDS por dos veces más, 10 minutos cada vez. Tras este último lavado, se monitorizó la radiactividad con un contador Geiger. Una vez realizados los lavados, se utilizó

una película sensible a radiactividad Curix RP2 Plus (AGFA HealthCare) para detectar el patrón de bandas esperado. Para incrementar la señal, se utilizó una pantalla intensificadora.

### 3.6.5- Inmunodetección de proteínas: ensayos de *western blot*

Los extractos proteicos de *A. nidulans* resuspendidos en tampón de Laemmli se resolvieron en geles del 8 al 10% de poli(acrilamida (dependiendo del tamaño de la proteína de interés) con 0.1% SDS, para lo que se utilizó el sistema Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra Cell de BioRad. Los geles se polimerizaron durante una hora a temperatura ambiente antes de cargar las muestras. Se realizó la electroforesis fijando el amperaje a 15 mA/gel hasta que las muestras pasaron por el gel apilador y entraron en el gel separador, momento en el que se subió el amperaje a 30 mA/gel. Una vez resueltos los geles, se utilizó el sistema de transferencia Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System de BioRad para transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa, el tiempo de transferencia fue de 15 minutos. Las proteínas se revelaron, según el caso, con un anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -cMyc (9E10, Sigma), con un anticuerpo monoclonal de rata  $\alpha$ -HA (3F10, Roche) o con un anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -SlaB (Davids Biotechnology [170]) (Tabla M.-7). Para los controles de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -actina (clon C4, ICN Biomedicals Inc.) o un anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -Hexoquinasa (AB1807, CHEMICON international, Inc.). Los anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano que se usaron fueron, según el caso, un anticuerpo de cabra contra inmunoglobulina IgG de ratón (H & L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) o contra inmunoglobulinas de rata (3010-05, Southern Biotech) y un anticuerpo de asno contra IgG de conejo. La actividad de la peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante, por exposición a películas Curix RP2 Plus (AGFA HealthCare).

Anticuerpos	Dilución	Origen	Referencia
<b>Primarios</b>			
$\alpha$ -HA	1:1000	Rata	3F10, Roche
$\alpha$ -myc	1:2000	Ratón	9E10, Sigma Aldrich
$\alpha$ -actina	1:20000	Ratón	Clon C4, ICN Biomedicals Inc
$\alpha$ -hexoquinasa	1:20000	Conejo	AB1807, CHEMICON international, Inc.
$\alpha$ -SlaB	1:10000	Conejo	Davids Biotechnology
<b>Secundarios</b>			
$\alpha$ -ratón <sup>1</sup> ( $\alpha$ -mouse IgG)	1:5000	Oveja	NA931, Amersham Biosciences
$\alpha$ -ratón <sup>2</sup> ( $\alpha$ -mouse IgG)	1:8000	Cabra	Jackson Immunoresearch Laboratories
$\alpha$ -conejo ( $\alpha$ -rabbit IgG)	1:10000	Asno	NA934, Amersham Biosciences
$\alpha$ -rata ( $\alpha$ -rat IgM+G)	1:4000	Cabra	3010-05, Southern Biotech

**Tabla M&M.4- Tabla con los anticuerpos utilizados para este trabajo.**

### 3.6.6-Ensayo de defosforilación con fosfatasa del fago $\lambda$

El bacteriófago  $\lambda$  contiene el ORF221, el cual codifica para una fosfatasa de 221 residuos conocida como  $\lambda$ -fosfatasa ( $\lambda$ -PP). Esta fosfatasa es capaz de liberar los grupos fosfato que pueden estar presentes en residuos de tirosina, treonina o serina, de manera  $Mn^{2+}$  dependiente. Este tipo de ensayo se llevó a cabo para comprobar si alguna de las dos bandas de PalH presentes en condiciones alcalinas podía ser debida a la fosforilación. El protocolo se combinó con la extracción de fracciones de membrana, en el paso posterior a que las muestras fueran tratadas después de la segunda centrifugación durante 45 minutos a 16100 g y antes de la precipitación con TCA. El precipitado obtenido después de esa centrifugación de 45 minutos se resuspendió en el tampón MPE sin urea y 180  $\mu$ l se guardaron en hielo. En ese momento, la muestra se dividió en cuatro alícuotas:

**1-Control negativo:** Fracción de membrana+H<sub>2</sub>O MQ.

**2-Control de tampón:** Fracción de membrana+ tampón de  $\lambda$ -PP+ $Mn^{2+}$ +H<sub>2</sub>O MQ.

**3-Ensayo:** Fracción de membrana+ tampón de  $\lambda$ -PP+ $\lambda$ -PP+ $Mn^{2+}$ +H<sub>2</sub>O MQ.

**4-Control con inhibidor:** Fracción de membrana+ tampón de  $\lambda$ PP+ $\lambda$ -PP+ $Mn^{2+}$ +inhibidor de  $\lambda$ -PP+H<sub>2</sub>O MQ.

Las muestras preparadas con los distintos controles se incubaron a 30°C durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, las proteínas se precipitaron en hielo con TCA a una concentración final de 10% (v/v). Los siguientes pasos son los mismos que en el apartado 3.5.7.C. Finalmente, a los precipitados secados al aire se les añadió 30  $\mu$ l de tampón de Laemmli.

### 3.6.7-Ensayos de *pull down* con extractos solubles de *A. nidulans*

Se mezclaron extractos proteicos de *E. coli* que expresaban proteínas fusionadas a la GST (300  $\mu$ g de proteínas procedentes de la fracción soluble de extractos de *E. coli*, véase el punto 3.4.3) con 1 mg de proteína soluble de *A. nidulans* (véase apartado 3.5.6), en columnas Handee™ Centrifuge columns de 0,8 ml (Pierce). Los micelios de *A. nidulans* procedían de cultivos en MFA ácido (ajustado con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaCl, véase apartado 3.1.8) o alcalino (ajustado con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaCl, obsérvese punto 3.1.8), y expresaban las proteínas PalF::HA<sub>3</sub> y

Vps41::HA<sub>3</sub> reguladas por el promotor moderadamente fuerte, *gpdA<sup>mini</sup>*. La mezcla se ajustó a un volumen final de 800 µl en tampón de unión III [10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 5 mM DTT, cóctel inhibidor de proteasas “Complete EDTA-Free” de Roche (1 pastilla/50 ml), 1 mM Pefabloc, 0.3 µg/ml leupeptina, 0.3 µg/ml pepstatina y 2 µM MG132], y se incubó durante una hora a 4°C con agitación. Posteriormente, se añadieron 12,5 µl de glutatión-Sepharose (Roche), equilibrada en tampón de unión III, por columna. Las columnas cargadas con la resina, se incubaron durante una hora a 4°C en agitación y a continuación, se centrifugaron a 100·g, durante 1 minuto y a 4°C para eliminar el sobrenadante. Para eliminar interacciones inespecíficas, se lavó la resina con 6 lavados de 0,8 ml de tampón de unión III cada uno. Finalmente, la elución se llevó a cabo mediante la adición de 50 µl de tampón de Laemmli. Se cargaron dos geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% con 20 µl del eluato de las columnas en cada uno. Uno de ellos se tiñó con Coomassie G250, para visualizar las proteínas fusionadas a la GST que habían sido usadas como cebo, y el otro se transfirió mediante el sistema Trans-Blot® Turbo™ (BioRad) para la inmunodetección de las presas por *western blot*.

### 3.7-MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La mayoría de experimentos de microscopía fueron llevados a cabo en un microscopio invertido LEICA DMI6000B con el eje Z motorizado, equipado con objetivos 63x y 100x con una apertura numérica de 1.4, una lámpara Leica EL6000, un filtro TXRED-4040B (Semrock, Rochester) para la detección de fluorescencia emitida por mCherryFP y un filtro Semrock Brightline GFP-3035B (Semrock, Rochester) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP. Además, el microscopio estaba equipado con una cámara ORCA-ERII (Hamamatsu Photonics) para la obtención de imágenes digitalizadas.

Los experimentos de PalC::GFP fueron realizados en un microscopio de epifluorescencia Eclipse E-600 de Nikon, equipado con objetivos de 20x, 60x y 100x con una apertura numérica de 1.4, una lámpara de mercurio de 100 W, un filtro GFP-3035B (Semrock Brightline) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP y un filtro TXRED-4040B (Semrock Brightline) para la detección de la fluorescencia emitida por mCherryFP. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics).

En todos los casos se utilizó el programa MetaMorph (Molecular Devices) para controlar los microscopios y para la manipulación de imágenes.

### 3.7.1-Medios de observación para el microscopio y condiciones de cultivo

En este caso se utilizó el WMM (*Watch Minimal Medium*, véase apartado 3.1.4), una versión del MMA de Cove [189] que no contenía fosfatos, con objeto de evitar la precipitación de las sales de fosfato presentes en los elementos traza y su interferencia en la observación al microscopio. Ese medio se suplementó con 25 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (deja un pH~5.1-5.2), los requerimientos necesarios de cada estirpe y distintas fuentes de carbono (véase el siguiente apartado) además de, a no ser que se indique lo contrario, 5 mM de tartrato de amonio.

Para la obtención de imágenes en el microscopio invertido LEICA DMI6000B, se utilizaron cámaras de incubación multipocillo con fondo de plástico y superficie hidrofóbica (*uncoated  $\mu$ -Slide 8 well*, Ibidi GmbH, Germany), utilizando 300  $\mu\text{l}$  de WMM e inoculando una solución de conidiosporas resuspendida en Tween 80 al 0.01% (v/v). Los cultivos se incubaron a 25°C por 14-16 horas.

En las preparaciones para la observación al microscopio Nikon Eclipse E-600, las células se cultivaron sobre la superficie de cubreobjetos Menzel-Gläser redondos (14x14 mm) o cuadrados (18x18 mm), previamente colocados en placas de 6 o 12 pocillos (Falcon) y sumergidos en 1.5 o 2.5 ml de WMM. Las muestras se incubaron a 25°C durante 14-16 horas. Para la observación de las células, el cubreobjetos se escurrió sobre una servilleta para eliminar el exceso de medio y se colocó encima de un portaobjetos, quedando las germínulas entre el porta y el cubre. La observación debía ser relativamente rápida, ya que al cabo del tiempo se generaba un estado de anaerobiosis en la zona central que perjudicaba la observación de determinados procesos fisiológicos.

### 3.7.2-Uso de las distintas fuentes de carbono en microscopía

Se empleó 0.1% (p/v) de glucosa como fuente de carbono en las preparaciones para la observación al microscopio de proteínas expresadas en condiciones fisiológicas o bajo la regulación del promotor de la *glicerol-3-fosfato deshidrogenasa* en su versión corta, *gpdA<sup>mini</sup>*.

En los experimentos en los que se utilizó el promotor de la *alcohol deshidrogenasa*, *alcA*, el cual es un promotor regulable por la fuente de carbono, se utilizó 0.1% de fructosa (p/v) para las condiciones de no inducción-no represión, dejando crecer los cultivos durante 14 horas. Para la obtención de niveles altos de expresión, se utilizó 1% (v/v) de etanol como fuente de carbono, que se añadió como medio fresco en cultivos crecidos previamente en fructosa,

incubándolos durante 4 horas más (por ejemplo, la estirpe *alcA::gfp::synA*, véase resultados 4.6.2).

### **3.7.3-Experimentos de cambio de pH al microscopio**

En los experimentos de cambio de pH al microscopio, las conidiosporas se germinaron en el medio WMM ajustado a un pH 5,1-5,2 con 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, durante 14-16 horas. Posteriormente, se tomaron distintas imágenes en esas condiciones y se cambió el medio ácido por un medio cuyo pH estaba ajustado a 7 con 12.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 12.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. En esas condiciones, se tomaron imágenes a los 15 minutos, media hora y/o una hora.

El conteo de los focos corticales de PalC::GFP se realizó en medio ácido (pH~5.1-5.2) ajustado con 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se analizaron al menos 20 germínulas en cada caso y las estructuras contadas se normalizaron con respecto a la longitud de la germínula.

## **3.8-HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS**

Para la búsqueda de secuencias se utilizaron las bases de datos del Broad Institute, del NCBI y la *Aspergillus Genome DataBase* (Aspgd, <http://www.aspgd.org/>). El diseño y el análisis de las diferentes construcciones se llevaron a cabo mediante el programa Vector NTI (Invitrogen). Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa Clustal X o W [196] y su manipulación mediante el programa GeneDoc [197]. Los datos para los distintos análisis estadísticos se realizaron con el programa Excel 2010 (Microsoft Office) y se analizaron con el programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software).

## **3.9-OTROS**

### **3.9.1-“Kits” comerciales de bioquímica y biología molecular empleados**

Los diferentes “kits” se utilizaron siguiendo en todo momento las instrucciones de los respectivos fabricantes:

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

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

**-QIAprep® Spin Miniprep Kit** (Qiagen): se utilizó para la purificación de plásmidos procedentes de *E. coli* con alto grado de pureza y concentración.

**-High Pure Plasmid Isolation Kit** (Roche): se utilizó para la purificación rutinaria de plásmidos procedentes de *E. coli*.

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

**-pGEM T-Easy Vector System** (Promega): Se utilizó para la clonación rápida de productos de PCR en el vector pGEM T-Easy mediante ligación por topoisomerasas.

**-Rediprime™ II Random Prime Labelling System** (GE Healthcare): se utilizó para el marcaje de fragmentos de DNA con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP que fueron posteriormente utilizados como sondas en ensayos de *Southern blot*.

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

**-ECL Western Blotting Detection Reagents** (GE Healthcare): se utilizó para la detección de anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano en ensayos de *western blot*.

### 3.9.2-Productos radiactivos

Se empleó [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP en las hibridaciones DNA-DNA, que tenía una actividad específica de 3000 Ci/mmol (Amersham Biosciences Redivue Deoxycytidine 5'-triphosphate, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]).

### 3.9.3-Reactivos y enzimas de biología molecular

Los reactivos químicos utilizados y los suplementos de los medios de cultivo fueron generalmente de las marcas Sigma, Fluka y Merck. Los componentes de origen microbiológico de los medios de cultivo utilizados fueron suministrados por Difco Laboratories o Pronadisa. La calidad de los productos empleados fue siempre calidad analítica.

Las enzimas de restricción utilizadas procedían de New England Biolabs, Roche o Takara. Los reactivos empleados en las reacciones de PCR fueron suministrados por Agilent (Pfu Turbo DNA polymerase), Promega (*Pfu* DNA polymerase) y Takara (Prime Star® HS DNA polymerase). La DNA Ligasa del fago T4 fue adquirida a Takara.

## ***RESULTADOS***

## 4-RESULTADOS-CAPÍTULO I

### 4.1-CONTEXTO PREVIO

Como se ha comentado en la introducción (ver apartado 1.4 y derivados), el factor de transcripción PacC existe en 3 formas dentro de la célula. PacC<sup>27</sup> es la forma activa que actúa como regulador transcripcional de ciertos “genes ácidos” y “alcalinos”. Se obtiene a través de dos eventos proteolíticos de la forma PacC<sup>72</sup>, la forma inactiva de la proteína. El primer corte es dependiente de pH alcalino y da lugar a la forma intermedia PacC<sup>53</sup>. El segundo, es independiente de pH y está mediado por el proteasoma. Es en el primer paso proteolítico donde participan el conjunto de proteínas codificadas por los seis genes *pal* (*palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *pall*, véase figura I.5).

Los estudios de PalH, PalF y PalI, los elementos del complejo sensor de la ruta de señalización por pH, no se han iniciado con esta tesis. Los primeros trabajos se centraron en conocer qué genes estaban implicados en la ruta y en resolver la posición (el orden) de cada proteína Pal en ella. Los estudios iniciales sobre PalH [11], se centraron en caracterizar el gen y, *grosso modo*, la proteína de 760 aminoácidos. Mediante el análisis de mutantes que generaban truncamientos de mayor o menor longitud en la proteína, se concluyó que PalH es imprescindible para la activación de la señalización. Además, a través del uso de herramientas bioinformáticas, se predijo que PalH es una proteína con 7 hélices transmembrana conectadas por regiones intra y extracelulares, una región N-terminal que precede al primer dominio transmembrana expuesta al medio extracelular y una región C-terminal corriente abajo de la séptima hélice transmembrana, expuesta al citosol. Asumiendo que PalH es una proteína con siete dominios transmembrana, ésta se asemejaría topológicamente a los receptores de tipo GPCR [3]. Por último, en el mismo estudio fueron descritas algunas regiones necesarias para el correcto funcionamiento de la proteína. Por ejemplo, se observó que el alelo *palH47* que genera un truncamiento después del residuo 377, lo que elimina casi toda la región hidrofílica C-terminal, conocida como cola citosólica, es de pérdida parcial de función. En cambio, el alelo *palH17* que genera un truncamiento después del aminoácido 286, en el que se eliminan los 2 últimos residuos del putativo 5º dominio transmembrana, los dominios 6 y 7 y la región carboxilo terminal citoplasmática, es de pérdida total de función. Ello indica que las regiones transmembrana putativas TM6 y TM7 son necesarias, además de una porción de la cola citosólica posterior al 7º dominio transmembrana.

## Resultados

En otro trabajo clave, se demostró que PalF se asemeja a las  $\beta$ -arrestinas [19]. Asimismo, en ese estudio se descubrió que la interacción de PalF con PalH ocurre a través de dos regiones que contiene este último en su cola citoplasmática y que fueron nombradas como “Dominios de Unión a PalF I y II”. Este hecho delimitaba en mayor medida alguna de las regiones de importancia que se descubrieron en el trabajo anterior. Del mismo modo, se definió el dominio de unión a PalF I, que está situado más al extremo amino terminal de la cola citoplasmática de PalH, como el elemento crucial para la interacción entre ambas proteínas y para la activación de la ruta.

En un estudio posterior [13], se realizaron las primeras observaciones sobre la localización subcelular de PalH, gracias a un transgén que dirige la sobreexpresión de PalH etiquetado en su extremo C-terminal con la proteína verde fluorescente (GFP), para su observación por microscopía de fluorescencia (PalH::GFP expresado a niveles endógenos es indetectable por microscopía de fluorescencia). En ese trabajo, se describió que PalH sobreexpresado se localiza en la membrana plasmática de la zona del ápice pero predomina en el sistema endovacuolar. Además, la co-sobreexpresión de PalI, proteína accesoria del complejo sensor, que contiene 3 dominios transmembrana predichos y que se localiza robustamente en la membrana plasmática, promueve la relocalización de PalH a ésta desde el sistema endovacuolar.

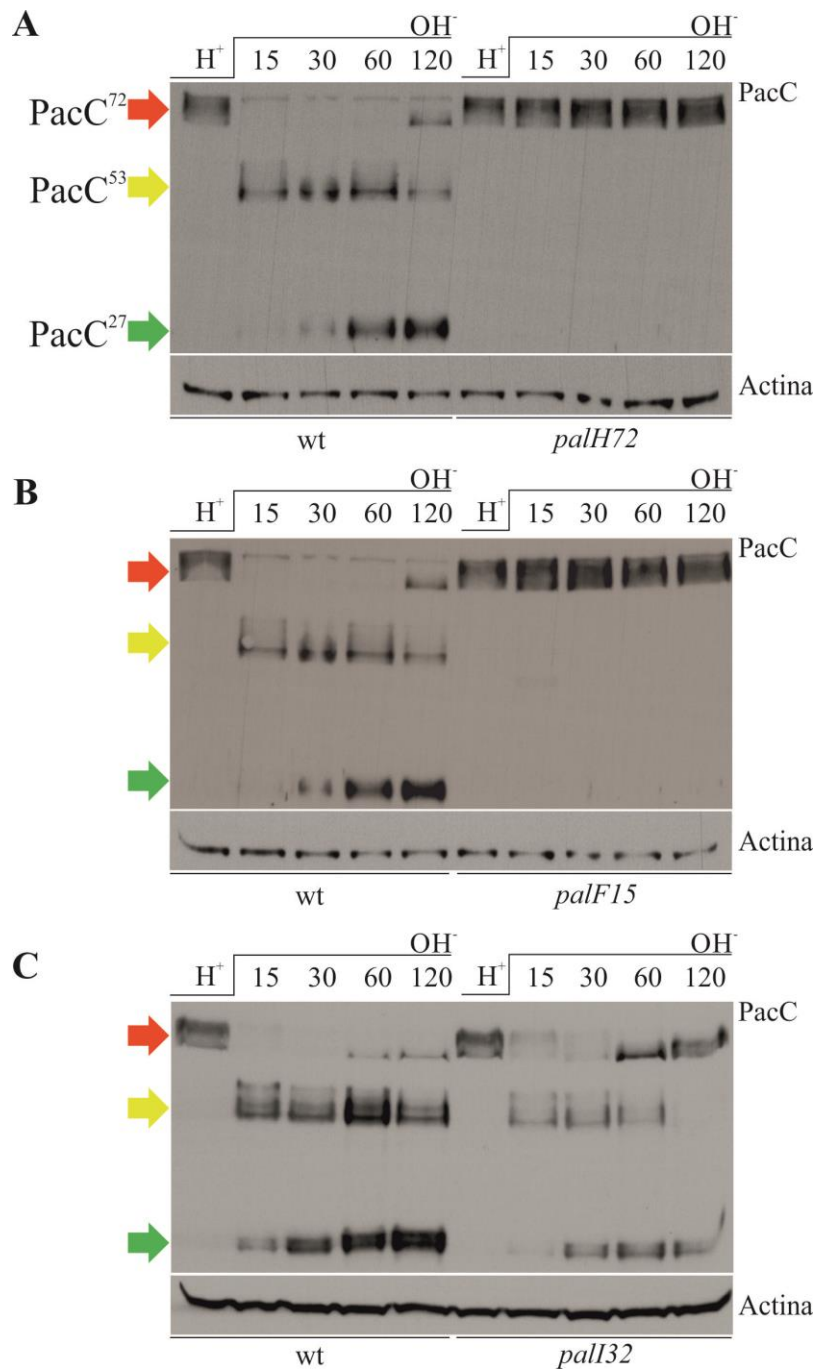
En un último trabajo [20], se demostró que la ubiquitinación de PalF es la clave para la activación de la ruta y que esta modificación post-traducciona es dependiente del pH alcalino y de PalH. Este hallazgo arrojó más luz sobre la posible función de PalH como receptor.

## **4.2-LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO SENSOR AFECTAN DE MANERA DIFERENTE A LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA**

Como se ha descrito en el apartado anterior, tres son las proteínas de la ruta *pal* que forman el complejo sensor para detectar los cambios en el pH ambiental; PalH, el cual actúa hipotéticamente como receptor; PalF, una proteína similar a las  $\beta$ -arrestinas que actúa como transductor y PalI, una proteína accesoria con 3 dominios transmembrana que facilita la “expresión” del receptor en la membrana. Estudios realizados anteriormente a este trabajo con alelos nulos de cada uno de los tres genes, demostraron la importancia clave tanto de PalH como de PalF en la señalización. El alelo nulo *palH72* que contiene una mutación que trunca la proteína tras el residuo 12, se comporta como un mutante de mimesis de acidez, al igual que el mutante *palF15* que contiene una mutación sin sentido que trunca la proteína de 776 residuos tras el aminoácido 188. Asimismo, al estudiar la cinética del procesamiento de PacC en estos dos mutantes tras un cambio a pH alcalino, se observó que el procesamiento está totalmente

## Resultados

bloqueado, incluso a ese pH. En cambio, un mutante nulo *palI32*, que trunca a PalI en el residuo 83 de los 536 que tiene, y que da lugar a un fenotipo parcial de mimesis de acidez, se observó que el procesamiento de PacC procede, pero su cinética es más lenta.



**Figura R.1-Análisis de la activación de PacC en fondos nulos para las proteínas del complejo sensor.** Todas las cepas fueron crecidas a 30°C en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 horas y posteriormente transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En los western-blot se utilizó la actina como control de carga. **A.-** Procesamiento de PacC en una cepa *palH72*. **B.-** Procesamiento de PacC en una cepa *palF15*. **C.-** Procesamiento de PacC en una cepa *palI32*. Flecha roja: PacC<sup>72</sup>. Flecha amarilla: PacC<sup>53</sup>. Flecha verde: PacC<sup>27</sup>.

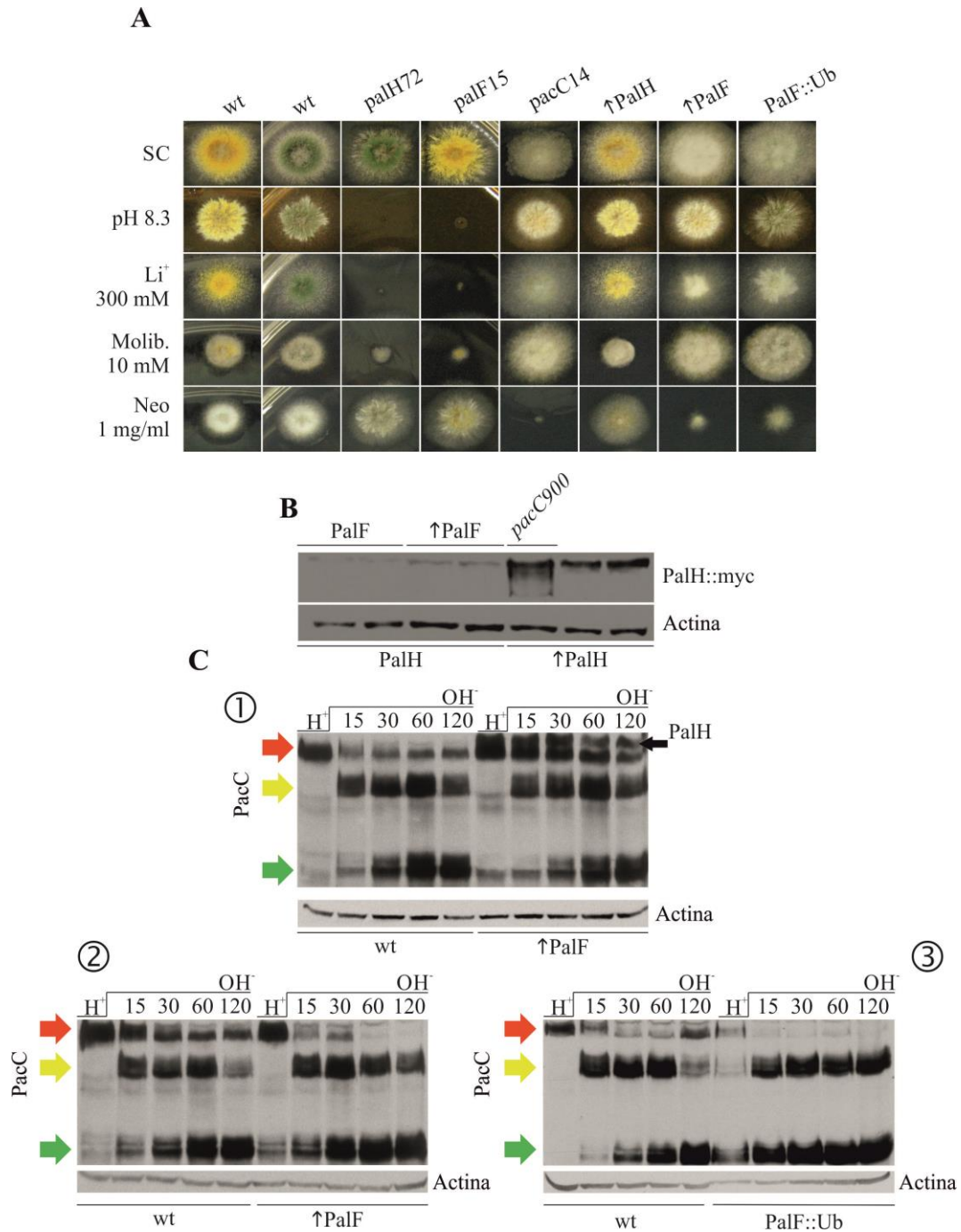
La obtención de extractos de proteína total ha mejorado de forma considerable la calidad de los datos de los *western blots* usados para visualizar el procesamiento de PacC. Debido a ello, se decidió realizar de nuevo los experimentos de procesamiento de PacC en respuesta al pH alcalino, que no mostraron diferencias con los anteriores en los fondos nulos de *palH* y *palF* (panel A y B, figura R.1), respecto a lo que ya se conocía. Sin embargo, sí hubo diferencias a lo observado previamente con el mutante *palI32* [13]. En los nuevos ensayos de procesamiento de PacC a pH alcalino, se observaron, a diferencia de la cepa silvestre, niveles detectables de PacC<sup>72</sup> a tiempos tempranos tras el cambio de pH y un déficit parcial en el procesamiento a PacC<sup>27</sup>, junto con la recuperación prematura de los niveles de PacC<sup>72</sup> (panel C, figura R.1). Estos resultados, ponen de manifiesto de manera muy ostensible que de las dos proteínas de membrana que presenta la ruta de señalización por pH, PalH tiene un papel clave mientras que PalI es relativamente prescindible.

### **4.3-PalF TIENE EL PAPEL CLAVE PERO PalH TAMBIÉN CONTRIBUYE A LA ACTIVACIÓN**

Uno de los hechos demostrados por Hervás-Aguilar y colaboradores [20], fue que la sobreexpresión de la arrestina PalF activa débilmente la señalización en condiciones ácidas, mientras que la unión covalente de ubiquitina a la arrestina activa fuertemente la ruta sin necesidad del receptor [20], lo que define la ubiquitinación de PalF como el paso clave para la activación de la ruta, que en condiciones normales requiere tanto la alcalinización del medio como la presencia de PalH para que la arrestina PalF sea ubiquitinada [19]. Hasta ahora, nunca se había analizado qué efecto tiene el incremento de los niveles de PalH sobre la ruta, ni qué implicación sobre la cinética del procesamiento ejerce tanto la sobreexpresión de PalF, como la expresión de PalF ubiquitinado.

#### **4.3.1-Análisis de la sobreexpresión del receptor PalH o de la arrestina PalF por separado**

Para analizar el efecto de la sobreexpresión del receptor sobre el estado de activación de la ruta, se integró en el locus *pantoB* una copia de un transgén que contenía el cDNA de PalH etiquetado en su extremo C-terminal con 3 copias del epítipo c-myc, todo ello bajo el control del promotor *gpdA<sup>mini</sup>* (véase la figura R.2, panel B, para hallar los niveles de sobreexpresión de PalH::myc<sub>3</sub> obtenidos por la regulación bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*) La cepa contenía además, el



**Figura R.2-Análisis de la sobreexpresión de los componentes del complejo sensor por separado.**

**A.-** Tests fenotípicos en placa realizados para comprobar el efecto de la sobreexpresión de receptor, arrestina o arrestina ubiquitinada. **B.-** Procesamiento de PacC en los distintos fondos genéticos comparados con un silvestre en cada caso. Las cepas se cultivaron en medio de fermentación a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3) durante 15 horas. Pasado ese tiempo se realizó el experimento de cambio de pH en medio de fermentación a pH alcalino ajustado con HEPES (8) y se recogieron muestras de micelio a tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Para los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. **B.1-**Análisis de la sobreexpresión del receptor. La flecha indica la presencia del receptor etiquetado con myc. **B.2-**Análisis de la sobreexpresión de la arrestina. **B.3-**Análisis de la expresión de la arrestina ubiquitinada.

## Resultados

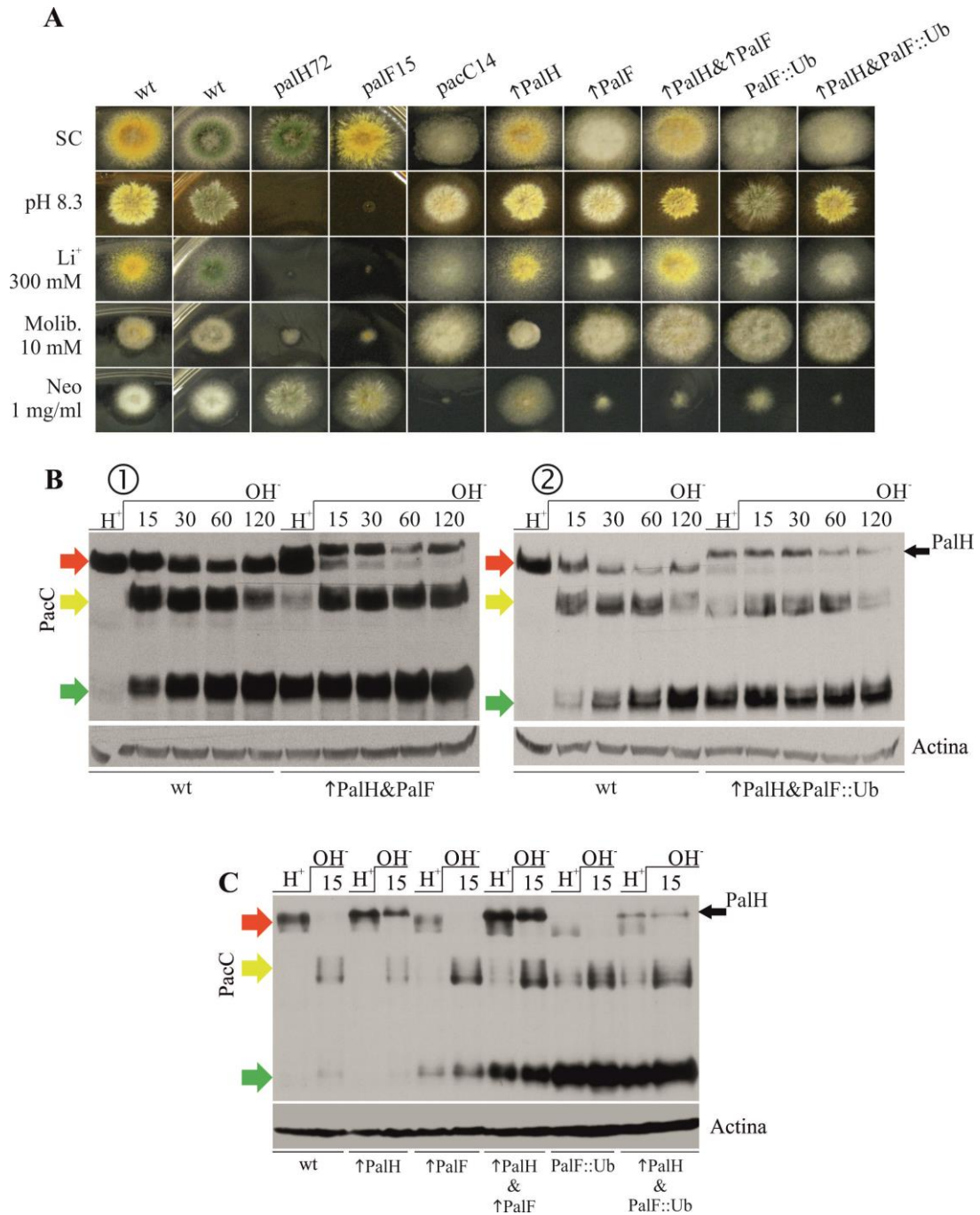
alelo *pacC900*, descrito con anterioridad. En un experimento de respuesta a pH alcalino, se vio que aunque el procesamiento de PacC se activa ligeramente a pH ácido, el patrón cinético es muy similar al del silvestre (panel C.1, figura R.2). Tampoco, el análisis fenotípico mediante ensayos en placa mostró diferencias en el crecimiento en molibdato ni neomicina en comparación con cepas silvestres (panel A, figura R.2).

Por otra parte, se examinó el efecto de la sobreexpresión de PalF sobre la cinética del procesamiento de PacC. Para ello, se realizó un experimento de respuesta a pH alcalino con una cepa *pacC900* que sobreexpresa PalF mediante la integración en el locus *pyroA* de un transgén que contiene el cDNA de PalF etiquetado en su extremo C-terminal con 3 copias del epítipo HA, bajo el control del promotor *gpdA<sup>mini</sup>* (véase la referencia [20] para hallar los niveles de sobreexpresión de PalF obtenidos por el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*). En un ensayo de respuesta a pH alcalino se observó que hay un cierto grado de activación en condiciones ácidas, además de obtenerse un procesamiento más rápido en la cepa que sobreexpresa PalF (panel C.2, figura R.2), hechos que concuerdan con el fenotipo de cierta mimesis de alcalinidad detectado en placa (panel A, figura R.2). Estos resultados sugieren que los niveles de PalF de la célula limitan la capacidad sensora.

### **4.3.2-La ubiquitinación artificial de PalF promueve el procesamiento de PacC independientemente del pH**

Aunque el análisis de los efectos fenotípicos de la expresión de PalF ubiquitinado se realizó con anterioridad, al igual que pasaba con la sobreexpresión de la arrestina, faltaba por estudiar qué ocurría con el procesamiento de PacC en un análisis de respuesta a un cambio agudo a pH alcalino. Para ello, se procedió a analizar la cinética del procesamiento de una cepa *pacC900* que contenía el transgén para la expresión de PalF::Ub::HA<sub>3</sub> integrado en el locus *pyroA* y regulado bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*. El control bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>* en este caso no confiere sobreexpresión, sino que da lugar a niveles estacionarios de PalF::Ub similares a los fisiológicos de PalF. Ello es debido a que, fisiológicamente, la ubiquitinación es un sistema de marcaje de proteínas para su degradación en el proteasoma, por lo que PalF::Ub es intrínsecamente inestable, lo que se traduce en una reducción de sus niveles estacionarios.

En un experimento de respuesta a pH alcalino se observó que la presencia de la ubiquitina covalentemente unida a PalF permite una activación casi total de la ruta en condiciones ácidas. Además, PalF::Ub acelera el procesamiento del PacC<sup>72</sup> “residual”, mucho más que el observado en la cepa que únicamente sobreexpresa la arrestina sin ubiquitinar (panel B.3, figura R.2). Estos resultados, refuerzan la conclusión de que PalF es la clave para la activación de la ruta.



**Figura R.3-Análisis de la co-sobreexpresión de los componentes del complejo sensor. A.-** Test fenotípicos en placa realizados para comprobar el efecto de la sobreexpresión conjunta de receptor y arrestina o arrestina ubiquitinada. **B.-** Procesamiento de PacC en (1) PalH y PalF sobreexpresados y (2) PalH sobreexpresado en un fondo PalF-Ub. Se ha comparado con un silvestre en cada caso. Las cepas se cultivaron a 37°C en medio de fermentación a pH ácido ajustado con citrato de sodio (pH 4.3) durante 15 horas. Pasado ese tiempo se realizó el experimento de cambio de pH en medio de fermentación a pH alcalino ajustado con HEPES (pH 8) y se recogieron muestras de micelio a tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Para los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. **C.-** Análisis comparativo entre las cepas que sobreexpresan a los componentes por separado y las que lo hacen conjuntamente. En este caso, las estirpes se cultivaron a 30°C en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio durante 15 horas y se realizó el cambio de pH en medio mínimo ajustado con HEPES. Se recogieron muestras de los tiempos 0 y 15 minutos que reflejan el paso de activación de la ruta.

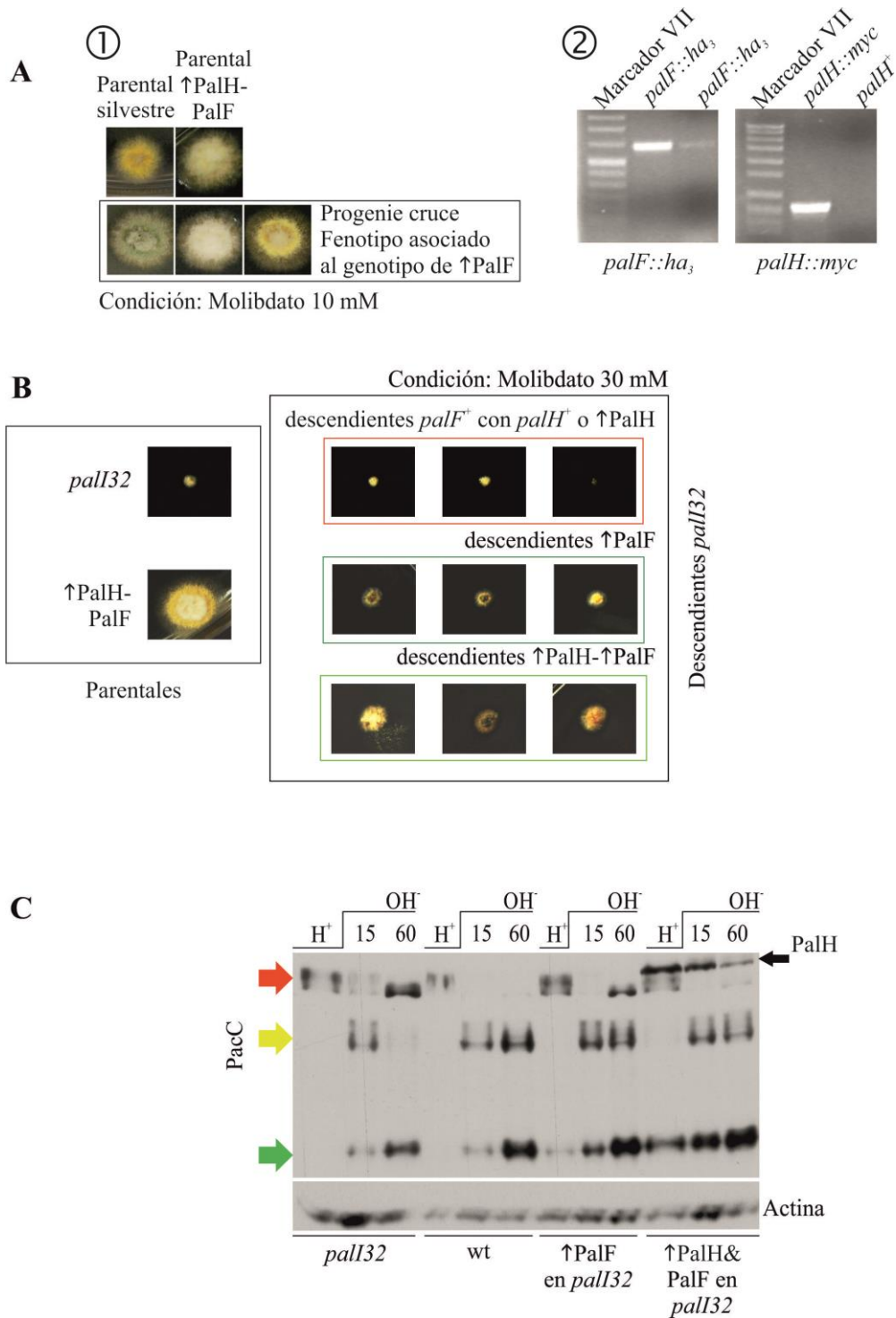
### 4.3.3-Análisis de la sobreexpresión conjunta de PalH y PalF

Una vez estudiado que la sobreexpresión del receptor PalH por sí solo tiene un efecto menor, y la sobreexpresión de la arrestina PalF activa ligeramente la señalización, se analizó si la co-sobreexpresión tenía efectos aditivos. Por ello, se obtuvieron mediante transformación cepas *pacC900* que sobreexpresaban tanto PalH como PalF, en las que se analizó la cinética del procesamiento. El procesamiento proteolítico de  $PacC^{72}$  resultó ser más eficiente que en los correspondientes mutantes simples de sobreexpresión y que en la cepa silvestre (panel B.1, figura R.3, comparar con paneles B. 1 y B.2 de la figura R.2). Además, se detectó activación del procesamiento en condiciones ácidas respecto a la cepa silvestre y, al compararlo con la cepa que sobreexpresa únicamente la arrestina, se observó un incremento de  $PacC^{27}$  tanto a pH ácido como en condiciones de alcalinidad (panel C, figura R.3). En cambio, los tests fenotípicos que se realizaron (panel A, figura R.3) no mostraron diferencias en el crecimiento respecto al mutante simple de sobreexpresión de PalF, debido posiblemente a un nivel de sensibilidad menor de estos tests respecto al análisis molecular del procesamiento de PacC por *western blot*.

Para comprobar si había o no un efecto fenotípico aditivo, se realizó un análisis genético tras cruzar la cepa que sobreexpresaba ambas proteínas con una cepa silvestre, con el objetivo de mejorar la comparación directa de fenotipos que segregarían potencialmente en la progenie. Se analizaron 48 estirpes descendientes del cruce, en las que se comprobó el crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de molibdato y se realizó el genotipado mediante PCR de cepas representativas de las clases fenotípicas encontradas. En el análisis se obtuvieron únicamente dos clases fenotípicas (panel A.1, figura R.4), una más resistente a molibdato que contiene el transgén para la sobreexpresión de PalF (panel A.1, figura R.4) y en algunos descendientes, además, el transgén para la sobreexpresión de PalH, y otra igual de resistente que el parental silvestre sólo formada por descendientes silvestres o que contienen el transgén para sobreexpresar PalH. En ningún caso se vieron diferencias entre cepas que sobreexpresan ambas proteínas o que únicamente sobreexpresan PalF.

Para incrementar el nivel de resolución del análisis, se decidió estudiar el efecto que tenía la sobreexpresión de ambas proteínas, juntas o por separado en un fondo genético *pall32*. Ya se ha explicado en los apartados 4.1 y 4.2, qué rol tiene la proteína Pall en el complejo sensor y como ésta no resulta imprescindible para la señalización. Debido a ello, se pensó que el efecto fenotípico del déficit completo de Pall podría ser compensado por la sobreexpresión de PalH y/o PalF. Por ello se cruzó una cepa que sobreexpresa ambas proteínas con una cepa que contiene el alelo *pall32*. Se examinó el crecimiento en molibdato de 48 clones, los cuales se genotiparon por PCR para comprobar la presencia de los transgenes que sobreexpresaban PalH

## Resultados



**Figura R.4.-Análisis de la co-sobreexpresión de PalF y PalH.** **A.-** Progenie del cruce entre un silvestre y una cepa que sobreexpresa PalH y PalF y que muestra igual resistencia al compuesto que el parental con ambos transgenes. El análisis se realizó en placas de Molibdato de Sodio 10 mM que se dejaron crecer durante 48 horas. a 37°C . **B.-** Análisis en placa de molibdato de sodio 30 mM, crecidas a 37°C durante 48 horas, de los descendientes del cruce entre una cepa que sobreexpresa PalH y PalF, y una cepa con el alelo *palI32*. **C.-**Procesamiento de PacC en los distintos fondos genéticos comparados con un silvestre y una cepa *palI32*. Las cepas se cultivaron en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio (pH 4.3) durante 15 horas. Pasado ese tiempo se realizó el experimento de cambio de pH en medio de fermentación a pH alcalino ajustado con HEPES (pH 8) y se recogieron muestras de micelio a tiempos 0, 15 y 60 minutos. Para los *western-blot*s se utilizó la actina como control de carga.

## Resultados

o PalF (panel B, figura R.4). En el análisis se observaron 5 clases fenotípicas. Cuatro de ellas corresponden a la presencia o ausencia del transgén para la sobreexpresión de PalF en fondos silvestre o *palI32*. Se observó que las cepas *palI32* que sobreexpresan la arrestina PalF crecen mejor que las estirpes que no contienen el transgén para la sobreexpresión, hecho que demuestra que la sobreexpresión de PalF es epistática sobre la mutación *palI32*. En cambio, la sobreexpresión del receptor PalH por sí sola no es capaz de mejorar el efecto negativo sobre el crecimiento provocado por el alelo *palI32* en medio con molibdato. Además, se aisló una quinta clase fenotípica que mostró una mayor resistencia al molibdato que las cepas que únicamente sobreexpresaban la arrestina PalF y que corresponde a la sobreexpresión conjunta de PalH y PalF, lo que demuestra que sí que existe un efecto aditivo cuando co-sobreexpresamos receptor y arrestina.

Finalmente, se estudió el procesamiento de PacC en estos mutantes (panel C, figura R.4). En un mutante *palI32* el procesamiento es posible, pero cuando en ese fondo genético co-sobreexpresamos a PalH y PalF, se observa una mejoría en el procesamiento que es incluso mayor que cuando sobreexpresamos PalF por sí sola.

Este resultado demuestra que hay un efecto aditivo sobre la eficiencia de señalización como resultado de la sobreexpresión conjunta de ambas proteínas, lo que indica una vez más que la señalización óptima requiere de la asociación entre PalH y PalF. Además, estos resultados son congruentes con la conclusión de que PalI mejora la localización en membrana del complejo sensor.

### **4.3.4-Análisis de la sobreexpresión de PalH en un fondo PalF::Ub**

La señalización constitutiva mediada por PalF::Ub no requiere la presencia de PalH [20]. Sin embargo, no se había estudiado si la sobreexpresión del receptor tenía algún efecto aditivo con el alelo *palF::ub*. Para ello, se obtuvo una cepa mediante transformación en la que, en un fondo genético *palF::ub* y *pacC900*, se sobreexpresó PalH.

En primer lugar, se determinó la cinética del procesamiento de PacC en esa cepa comparada con una estirpe silvestre (panel B.2, figura R.3). Hay un aumento muy evidente en la eficiencia del procesamiento de PacC en la cepa que lleva ambos transgenes y además se observa una activación prácticamente total a pH ácido. A continuación, se estudió si había efectos aditivos debidos a la sobreexpresión de PalH. En un experimento de respuesta a pH alcalino (panel C, figura R.3), no se observó ninguna mejora detectable ni en la activación a pH ácido, ni en la eficiencia del procesamiento. Además, los tests en placa no mostraron ninguna mejora en el crecimiento en presencia de molibdato respecto a la cepa que únicamente expresa la arrestina ubiquitinada (panel A, figura R.3). A continuación, se cruzó la cepa que se había

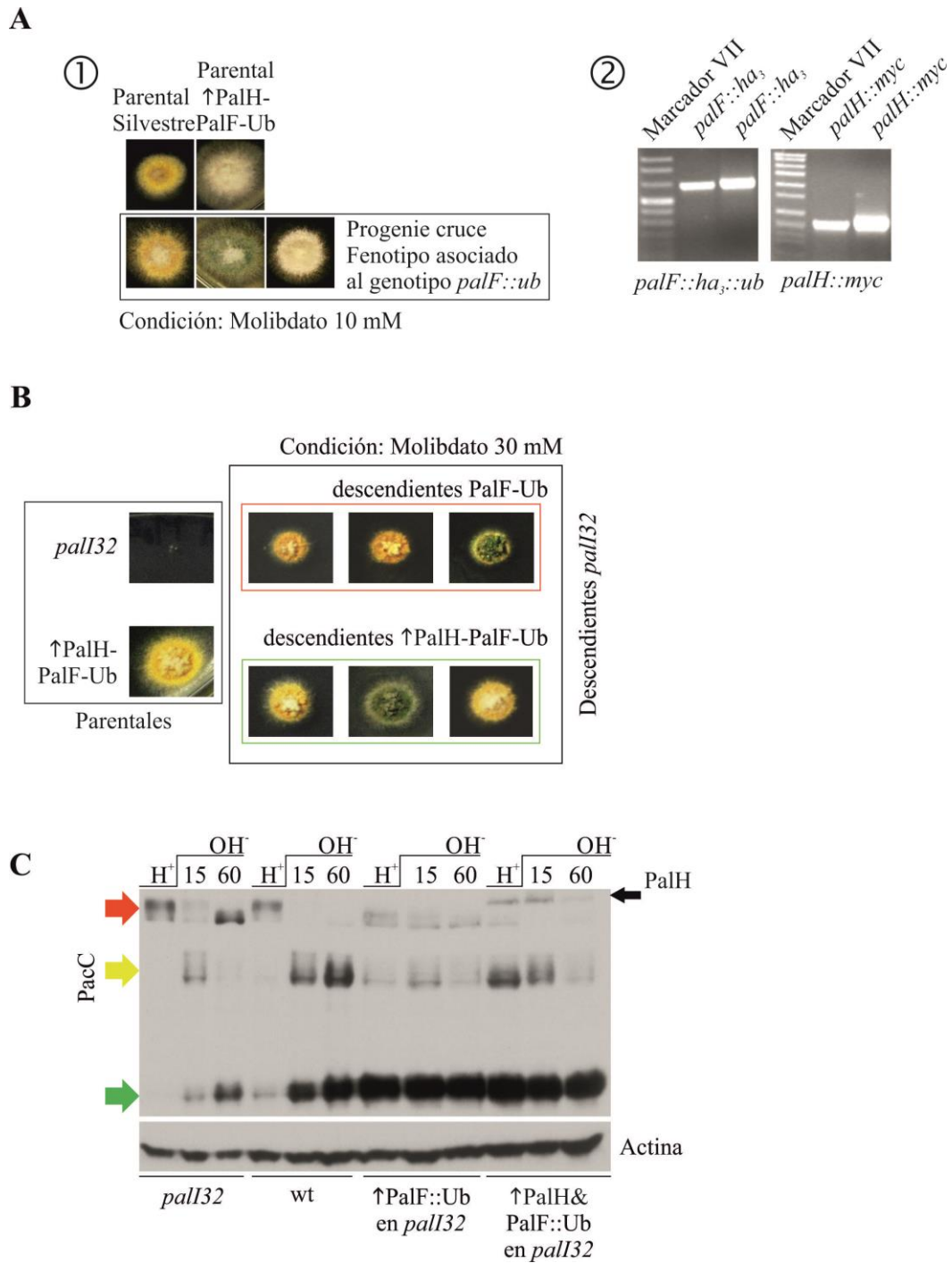
## Resultados

obtenido por transformación con una cepa silvestre, para mejorar la detección de posibles efectos aditivos. Se analizaron 48 descendientes del cruce mediante la comprobación de su crecimiento en presencia de molibdato. Únicamente se detectaron dos clases fenotípicas, una clase que presenta mayor resistencia a molibdato (panel A.1, figura R.5) y otra que presenta la misma resistencia al molibdato que la silvestre. Se genotiparon diversas estirpes que presentaban mayor resistencia al molibdato, las cuales todas contienen el transgén para la expresión PalF::Ub y además algunas llevan el transgén para la sobreexpresión de PalH (panel A.2, figura R.5), hecho que indicó que la sobreexpresión del receptor en ese fondo PalF::Ub parecería no producir ningún efecto adicional.

Para incrementar la resolución del análisis, se procedió del mismo modo que en el punto anterior y se cruzó la cepa que sobreexpresaba PalH y que expresaba PalF::Ub con una estirpe *pall32*. Se obtuvieron 4 clases fenotípicas tras el análisis del crecimiento en molibdato de 48 descendientes del cruce (panel B, figura R.5) y se genotiparon los 48 clones para comprobar la presencia de los transgenes. Además, en algunos descendientes se determinó por secuenciación la presencia de la mutación *pall32*. En este caso, la expresión de PalF::Ub siempre fue epistática sobre la mutación *pall32* y además la co-expresión junto con PalF::Ub del transgén para la sobreexpresión de PalH tiene efectos aditivos, de manera que dicha progenie crece tan bien sobre molibdato como una cepa silvestre. Asimismo, la expresión de PalF::Ub o la co-expresión de ésta junto al transgén para la sobreexpresión de PalH, atenúa aún más el efecto de la mutación *pall32* (paneles B y C, figura R.5) que cuando se sobreexpresa la arrestina sin ubiquitina con o sin sobreexpresión de PalH (paneles B y C, figura R.4).

Para finalizar el estudio, se llevó a cabo un experimento para examinar el procesamiento de PacC en las diversas cepas con fondo *pall32* (panel C, figura R.5). Se determinó que hay una mayor eficiencia del procesamiento en la cepa PalF::Ub, cuyos efectos sobre la activación parecen ser mayores cuando además se sobreexpresa PalH, ya que en esas condiciones prácticamente no existe PacC<sup>72</sup> ni siquiera a pH ácido. Estos resultados, podrían implicar que PalF::Ub pudiera ser más estable en presencia de mayores niveles del receptor, cuya interacción en la membrana la sustraería de la acción del proteasoma, aumentando así sus niveles aunque esta interpretación no se ha verificado experimentalmente.

Resultados



**Figura R.5-Análisis de la sobreexpresión de PalH en un fondo PalF-Ub.** **A.-** Progenie del cruce entre un silvestre y una cepa que sobreexpresa PalH y expresa PalF-Ub y que muestra igual resistencia al compuesto que el parental con ambos transgenes. El análisis se realizó en placas de Molibdato de Sodio 10 mM que se dejaron crecer durante 48 horas a 37°C. **B.-** Análisis en placa de molibdato de sodio 30 mM, de los descendientes del cruce entre una cepa que sobreexpresa PalH y expresa PalF-Ub, y una cepa con el alelo *palI32*. Las estirpes se dejaron crecer a 37°C durante 48 horas. **C.-** Procesamiento de PacC en los distintos fondos genéticos comparados con un silvestre y una cepa *palI32*. Las cepas se cultivaron a 30°C en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio (pH 4.3) durante 15 horas. Pasado ese tiempo se realizó el experimento de cambio de pH en medio de fermentación a pH alcalino ajustado con HEPES (pH 8) y se recogieron muestras de micelio a tiempos 0, 15 y 60 minutos. Para los *western-blot*s se utilizó la actina como control de carga.

## 4.4-PalH ES EL RECEPTOR DE pH AMBIENTAL

### 4.4.1-Construcción y funcionamiento del alelo *palH::ha<sub>3</sub>*

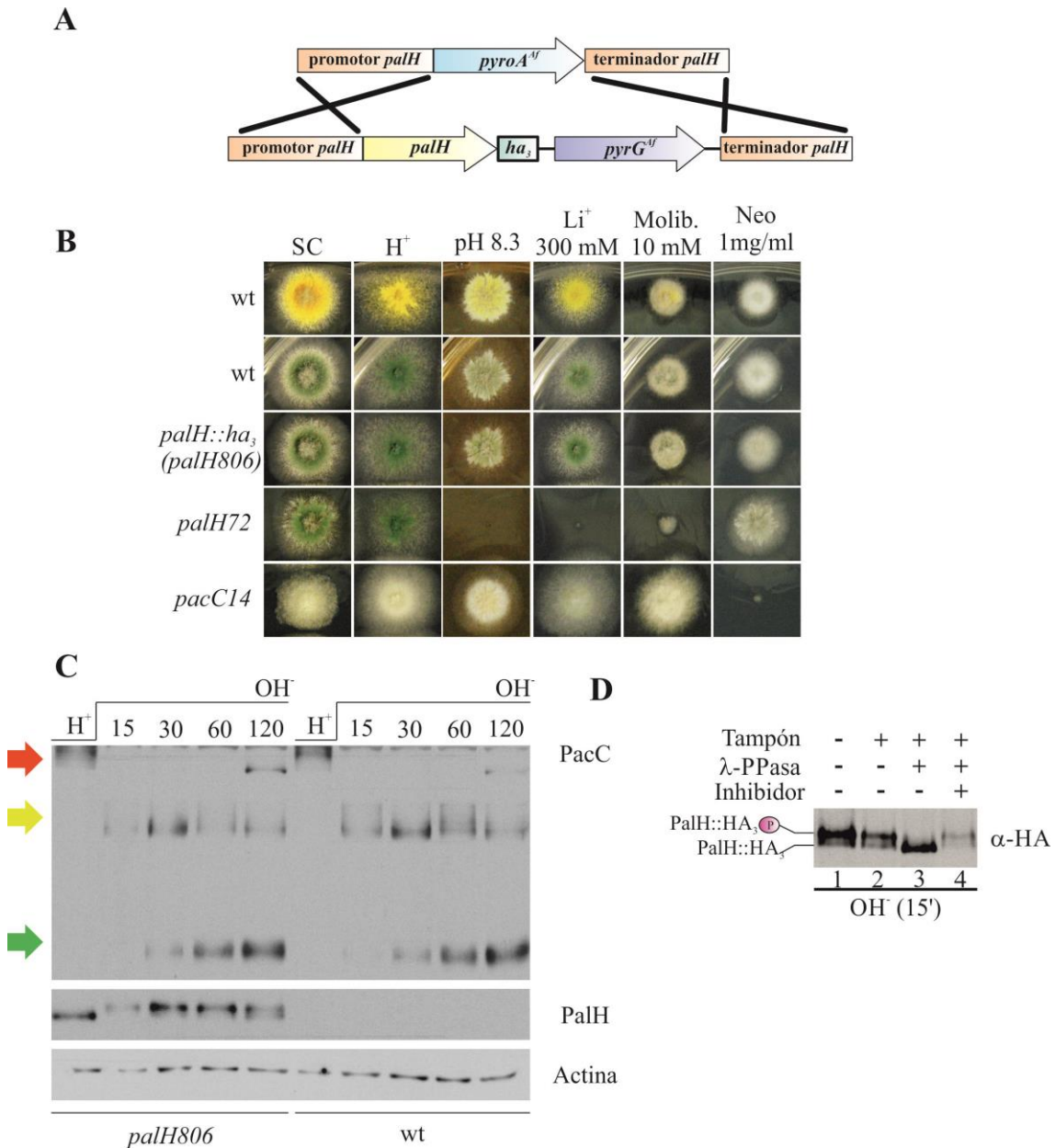
Para poder realizar estudios a nivel molecular del funcionamiento, comportamiento y niveles de PalH, se etiquetó al receptor con un epítipo reconocible por un anticuerpo comercial. Anteriormente se intentaron dos etiquetados distintos, con c-myc y con GFP, en la región c-terminal de la proteína. Sin embargo, el marcado de la proteína con c-myc<sub>3</sub> queda en parte enmascarado en un *western blot* en el que se observe PacC, debido a que éste también está etiquetado con el mismo epítipo. Además, la variabilidad entre lotes de anticuerpo  $\alpha$ -myc y su reactividad en *western blot* basados en extractos alcalinos fue insuficiente para detectar PalH con la sensibilidad necesaria. Asimismo, el etiquetado con GFP, está orientado para hacer microscopía de PalH. Debido a ello, se generó por ingeniería genética una construcción que contenía parte de la región 5'UTR del gen *palH* (1531 pb), seguido de la versión genómica de su ORF y el triple etiquetado con el epítipo de la hemaglutinina (HA), seguida por el gen *pyrG* de *A. fumigatus* y un fragmento (1522 pb) de la región 3'UTR de *palH* para dirigir la recombinación (véase panel A, figura R.6, y el apartado 3.5.9 de Materiales y Métodos).

Para facilitar el remplazamiento génico con el nuevo alelo etiquetado, se generó una cepa nula para el gen *palH*. Para ello, se sustituyó la copia genómica del receptor por el gen *pyroA* de *A. fumigatus*, en una cepa auxótrofa para piridoxina, *pyroA4*, y para uracilo y uridina, *pyrG89* (véase el punto 3.5.9 de Materiales y Métodos). Además, contenía el alelo *pacC900* que dirige la expresión de Myc<sub>3</sub>-PacC, y el alelo disrupto *nkuAΔ::bar*, lo que previene la recombinación por la ruta NHEJ, facilitando la recombinación homóloga. Se analizaron por *Southern blot* aquellos transformantes que eran protótrofos para piridoxina y que a pH alcalino no crecían. La generación previa de la cepa nula para *palH* es una estrategia para asegurar la selección posterior de reemplazantes génicos.

Una vez obtenida la cepa nula de *palH*, se transformó para introducir el alelo etiquetado mediante reemplazamiento génico. De este modo se obtuvieron reemplazantes, que se reconocieron porque las estirpes se convirtieron en auxótrofas para piridoxina y protótrofas para uracilo y uridina. Como en el caso anterior, los transformantes se genotiparon por *Southern blot* para comprobar la correcta integración en una sola copia del alelo. De esta forma, se obtuvieron cepas en las que se puede detectar por *western blot*, tanto a PalH como a PacC (panel C, figura R.6).

Para demostrar que el alelo *palH::ha<sub>3</sub>* no afecta al funcionamiento de la ruta de pH, se realizaron diversos ensayos diagnósticos en placa con las cepas reemplazantes, en los que no se

## Resultados



**Figura R.6-PalH se fosforila en condiciones alcalinas.** **A.-** Esquema representativo del evento de reemplazamiento génico para introducir el alelo *palH::ha<sub>3</sub>* en el locus de *palH*. **B.-** Tests fenotípicos de crecimiento en placa para comprobar que el alelo *palH::ha<sub>3</sub>* no afecta a la activación de la ruta. Las placas se crecieron a 37°C durante 48 h. Li= Cloruro de litio. Molib=Molibdato de Sodio. Neo=Neomicina sulfato. **C.-** Procesamiento de PacC y visualización de PalH de la cepa que expresa el alelo etiquetado. Ensayo de respuesta a pH alcalino en el que queda evidente que el procesamiento de la cepa con el alelo de *palH* etiquetado es igual al de la cepa silvestre. Todas las cepas fueron crecidas a 30°C en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 horas y posteriormente transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En los western blots se utilizó la actina como control de carga. **D.-** Experimento con λ-fosfatasa que demuestra que PalH es fosforilado (carril 3). Este ensayo se realizó con extractos de proteína de membrana de una cepa crecida en condiciones alcalinas.

## Resultados

encontraron diferencias en el crecimiento respecto a una estirpe silvestre (panel B, figura R.6). Para acabar de reforzar esta conclusión, se cruzó la cepa portadora del receptor etiquetado, con una silvestre. Se realizó un análisis de crecimiento en placa con presencia de litio, un test diagnóstico muy sensible a leves pérdidas de función de la ruta de pH, en el que no se observaron diferencias fenotípicas respecto al parental silvestre. Se genotiparon diversas cepas por PCR, y se seleccionaron aquéllas que contenían el alelo etiquetado de *palH*, además del alelo *pacC900* y que eran *nkuA*<sup>+</sup>, para evitar efectos no deseados de *nkuAΔ*.

Por último, se realizó un ensayo de respuesta a pH alcalino para estudiar el procesamiento de PacC y el comportamiento de PalH::HA<sub>3</sub>. En el *western blot* no se hallaron diferencias respecto a una estirpe silvestre en el procesamiento de PacC (panel C, figura R.6). Este resultado, junto al análisis fenotípico anterior, indica que la introducción del epítipo no produce ningún tipo de disfunción en PalH que afecte a la activación de la ruta. Asimismo, se estudió el comportamiento de PalH, el cuál presenta una única forma a pH ácido y dos formas con diferente movilidad electroforética a pH alcalino, cuyos niveles relativos varían a lo largo del tiempo (figura R.6, panel C). Este hecho, indicó que PalH sufre algún tipo de modificación post-traduccional que sucede sólo en condiciones alcalinas, aparentemente asociado a la activación del receptor.

### 4.4.2-PalH se fosforila en condiciones alcalinas pero no ácidas

Como se ha descrito en el punto anterior, PalH presenta dos formas diferenciadas a pH alcalino y una única forma a pH ácido. Como los GPCRs son fosforilados en su forma activa por las GRKs [4], se especuló que la forma de PalH que migra menos pudiera ser el resultado de fosforilación. Para demostrar esa hipótesis se realizó un ensayo con  $\lambda$ -fosfatasa sobre extractos de proteína de membrana, que procedían de micelio incubado en condiciones alcalinas (panel D, figura R.6). Además, se llevaron a cabo diversos controles, uno sin añadir la fosfatasa y otro en el que se utilizó un inhibidor de ésta. Se observó que la banda que migra menos en condiciones alcalinas, desapareció cuando se incubó el extracto proteico con la fosfatasa. En cambio, cuando no se añadió la fosfatasa o se agregó el inhibidor además de la fosfatasa, la banda de menor migración no desapareció. Este resultado, demuestra que la modificación post-traduccional que padece PalH es fosforilación y sugiere que ésta tiene lugar únicamente en condiciones alcalinas.

Por último, se estudió el comportamiento de las dos formas de PalH a lo largo del tiempo (panel C, figura R.6). Para ello, se realizaron diversos ensayos de respuesta a pH alcalino con la cepa *palH::ha<sub>3</sub>, pacC900*. Se observó que en los primeros tiempos a pH alcalino, existe una predominio de la forma fosforilada que se extiende hasta la hora posterior al cambio de pH. Pasado ese tiempo, la forma sin fosforilar vuelve a aparecer hasta establecerse un

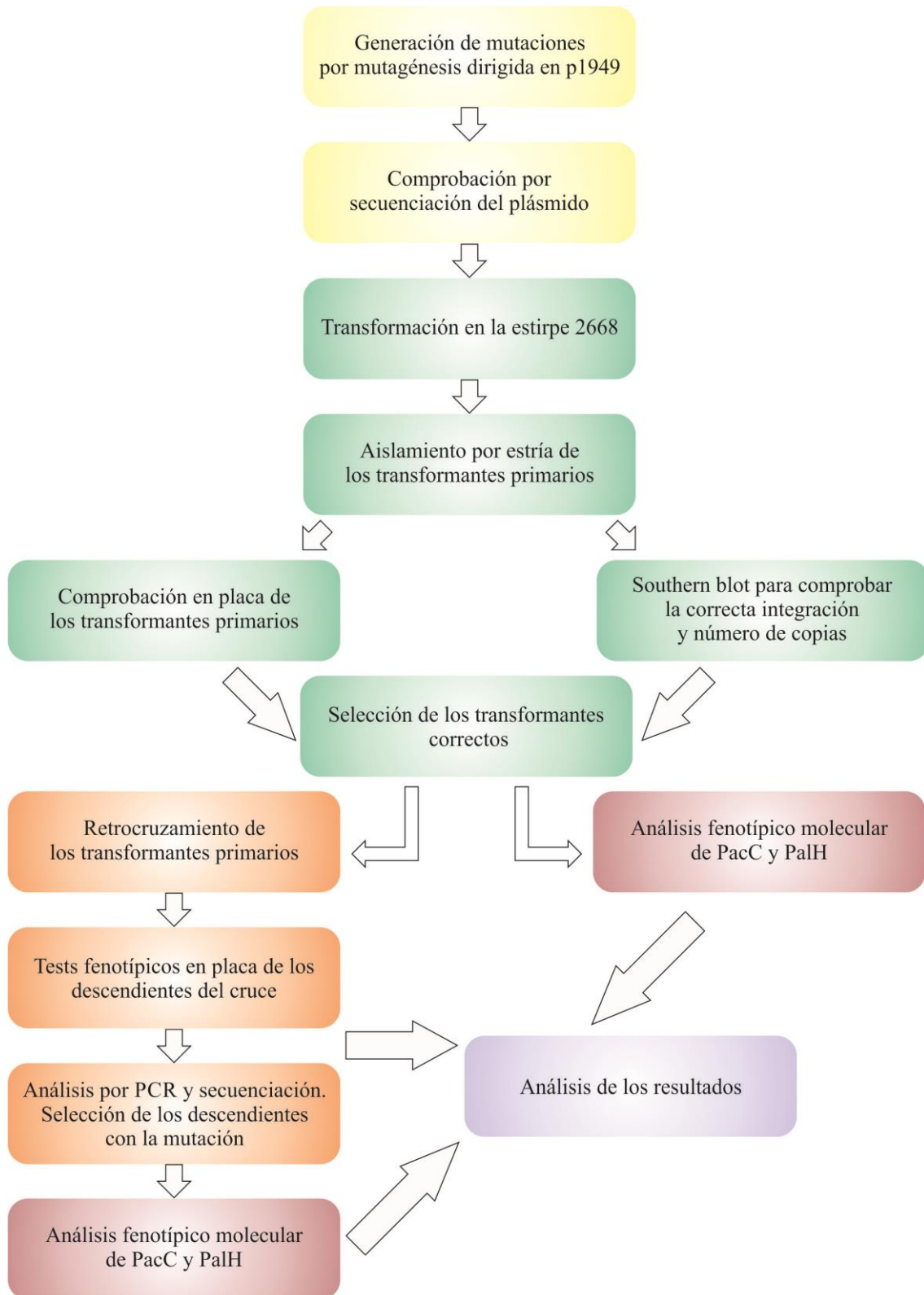
equilibrio entre los niveles de ambas formas que se mantiene a lo largo del tiempo. Este resultado sugiere que, al igual que ocurre con los GPCRs, PalH se fosforila cuando es activado. La posible función de la fosforilación en PalH se estudia en el apartado 4.5.

### 4.4.3-Análisis por mutagénesis dirigida de PalH

Como PalH se asemeja a los GPCRs por su topología [11], se decidió llevar a cabo un análisis por mutagénesis dirigida para intentar entender su estructura y funcionamiento. Para ello, se eligieron regiones o residuos de relevancia dentro de la estructura, algunos por su semejanza con ciertos interruptores moleculares descritos en los receptores 7-TMD. El esquema de trabajo que se presenta en la figura R.7, se aplicó en los análisis de todos los mutantes obtenidos en PalH. De la misma manera, se presentan en la tabla R.1, todos los alelos generados en este trabajo, así como aquellos utilizados para estudios comparativos. Además, en la figura R.8 se presenta un esquema de PalH que contiene todas las mutaciones analizadas en la presente tesis.

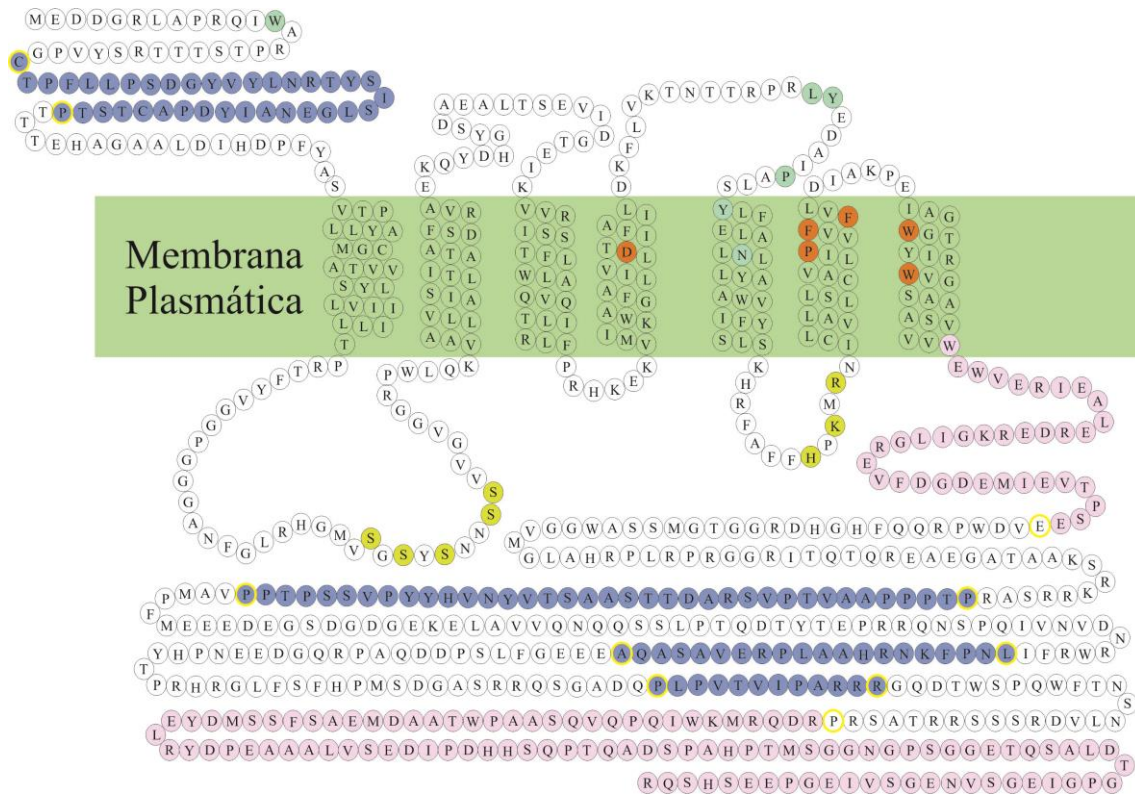
Alelo	Tipo de mutación	Efecto en la ruta
<i>palH13</i>	Substitución. W13L	Pérdida leve de función
<i>palH72</i>	Truncamiento en el residuo 12. "Alelo nulo"	Pérdida total de función
<i>palH63</i>	Delección entre C28 y P63	Silvestre
<i>palH138</i>	Substitución. S130A, S132A, S134A, S137A, S138A	Pérdida muy leve de función
<i>palH238</i>	Substitución. D238A	Pérdida muy leve de función
<i>palH258</i>	Substitución. L258P	Pérdida leve de función
<i>palH259</i>	Substitución. Y259D	Pérdida leve de función
<i>palH264</i>	Substitución. P264L	Pérdida leve de función
<i>palH268</i>	Substitución. Y268C	Pérdida leve de función
<i>palH275</i>	Substitución. N275I	Pérdida leve de función
<i>palH300</i>	Substitución. H296A, K298A, R300A	Pérdida leve de función
<i>palH316</i>	Substitución. P316A	Pérdida leve de función
<i>palH319</i>	Substitución. F319A	Ganacia muy leve de función
<i>palH320</i>	Substitución. F320A	Pérdida casi total de función
<i>palH332</i>	Substitución. W332A	Ganacia muy leve de función
<i>palH338</i>	Substitución. W338A	Silvestre
<i>palH369</i>	Substitución. G369A	Pérdida parcial de función
<i>palH486</i>	Delección entre P450 y P486	Pérdida muy leve de función
<i>palH564</i>	Delección entre L545 y A564	Silvestre
<i>palH625</i>	Delección entre P614 y R625	Silvestre
<i>palH654</i>	Delección entre E384 y R654	Pérdida leve de función
<i>palH806</i>	Etiquetado con HA3	Silvestre
<i>palH2264</i>	Substitución. Y259D y P264L	Pérdida moderada de función
<i>palH2332</i>	Substitución. F319A y W332A	Ganacia leve de función
<i>palH4338</i>	Substitución. F319A, F320A, W332A y W338A	Ganacia leve de función
<i>palF15</i>	Truncamiento en el residuo 188. "Alelo nulo"	Pérdida total de función
<i>palF58</i>	Substitución. S86P	Pérdida parcial de función
<i>pacC14</i>	Truncamiento en el residuo 492	Ganancia total de función
<i>palI30</i>	Substitución. G47D	Pérdida muy leve de función
<i>palI32</i>	Truncamiento en el residuo 83. "Alelo nulo"	Pérdida muy leve de función
<i>palI306</i>	Substitución. G44R	Pérdida muy leve de función
<i>palI319</i>	Substitución. H93P	Pérdida muy leve de función
<i>palA1</i>	Truncamiento en el residuo 601. "Alelo nulo"	Pérdida total de función

**Tabla R.1- Tabla con los distintos alelos utilizados en esta tesis.**



**Figura R.7-Esquema de trabajo para analizar los distintos mutantes de PalH.**

## Resultados



**Figura R.8-Representación esquemática de PalH.** PalH está formado por una región N-terminal extracelular, siete hélices transmembrana conectadas por bucles intra- y extracelulares y una región C-terminal citosólica que contiene dos sitios de unión a PalF (residuos en rosa). En azul, las regiones delecionadas. En verde claro, los residuos sustituidos de los bucles extracelulares. En naranja, los residuos sustituidos en las hélices transmembrana. En amarillo, los residuos sustituidos en los bucles intracelulares. Los círculos resaltados en amarillo delimitan las regiones delecionadas.

### 4.4.3.A-Examen de los bucles y las regiones transmembrana de la zona extracelular

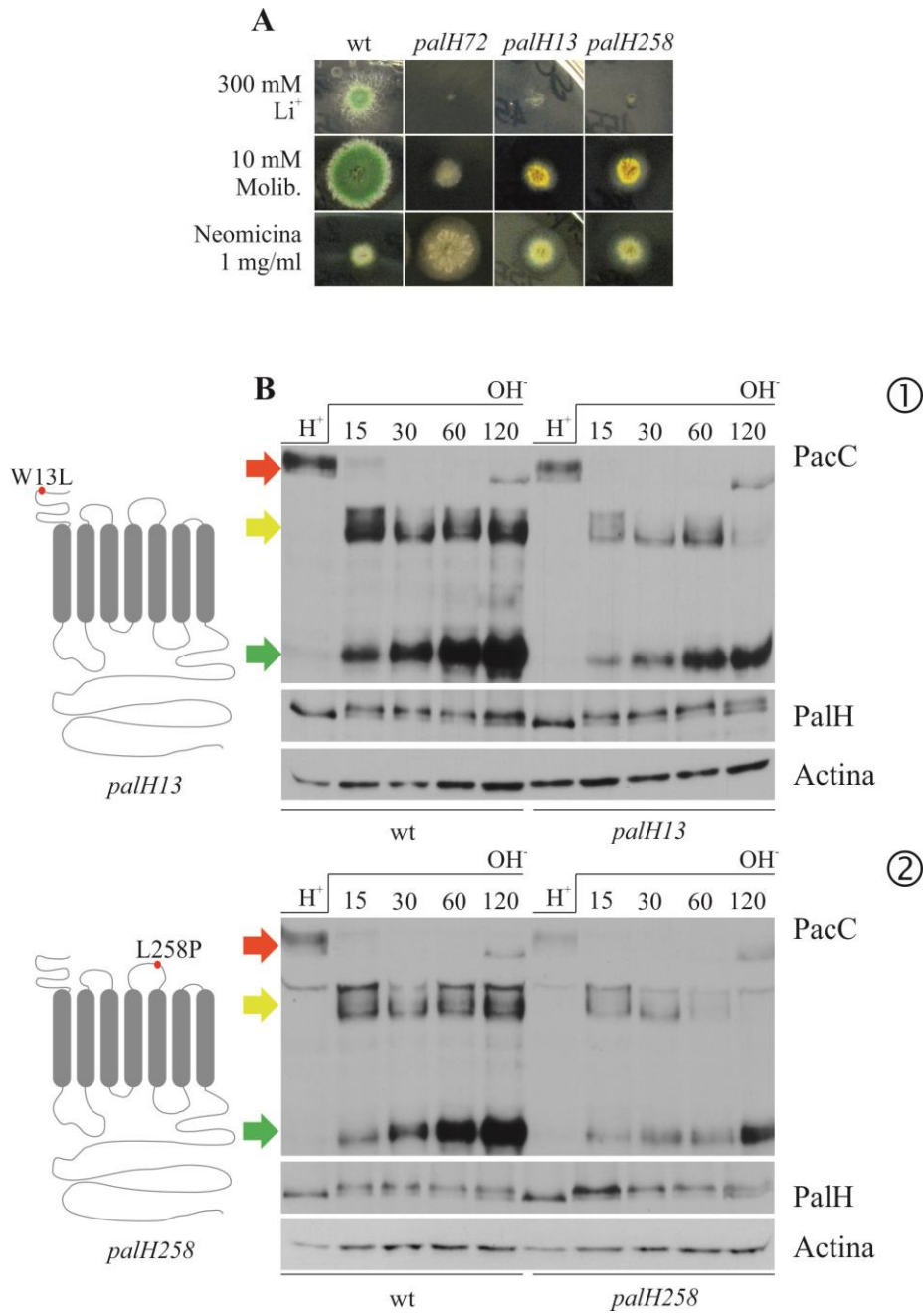
Previamente a este trabajo, el Profesor H. Arst Jr, había obtenido una serie de mutantes en PalH por mutagénesis con ultravioleta y los había seleccionado por el método clásico de cribado con la técnica de GABA ( $\gamma$ -amino-butirato). Este sistema permite rastrear fácilmente mutantes de pérdida de función en la ruta *pal* mediante la habilidad que tienen las mutaciones de mimesis de acidez de suprimir las mutaciones *areA'*, (esto es, la represión por metabolito de nitrógeno). Estas mutaciones permiten a mutantes *areA'* la utilización de GABA como fuente de nitrógeno, a través de la desrepresión del gen *gaba*, el cual codifica por la permeasa de GABA y se expresa en condiciones ácidas. Mediante este tipo de rastreo, seleccionó una serie de mutaciones de pérdida parcial de función en PalH que se asemejaban fenotípicamente entre ellas y que más tarde se vio que eran sustituciones simples. Además, todas ellas se localizaban en el segundo bucle extracelular, conector de las hélices 4 y 5, y en residuos de la 4ª hélice próximos a la región extracelular. Para estudiarlas a nivel molecular se decidió reproducir las sustituciones W13L, L258P, Y259D, P264L, Y268C y N275I (alelos *palH13*, *palH258*,

## Resultados

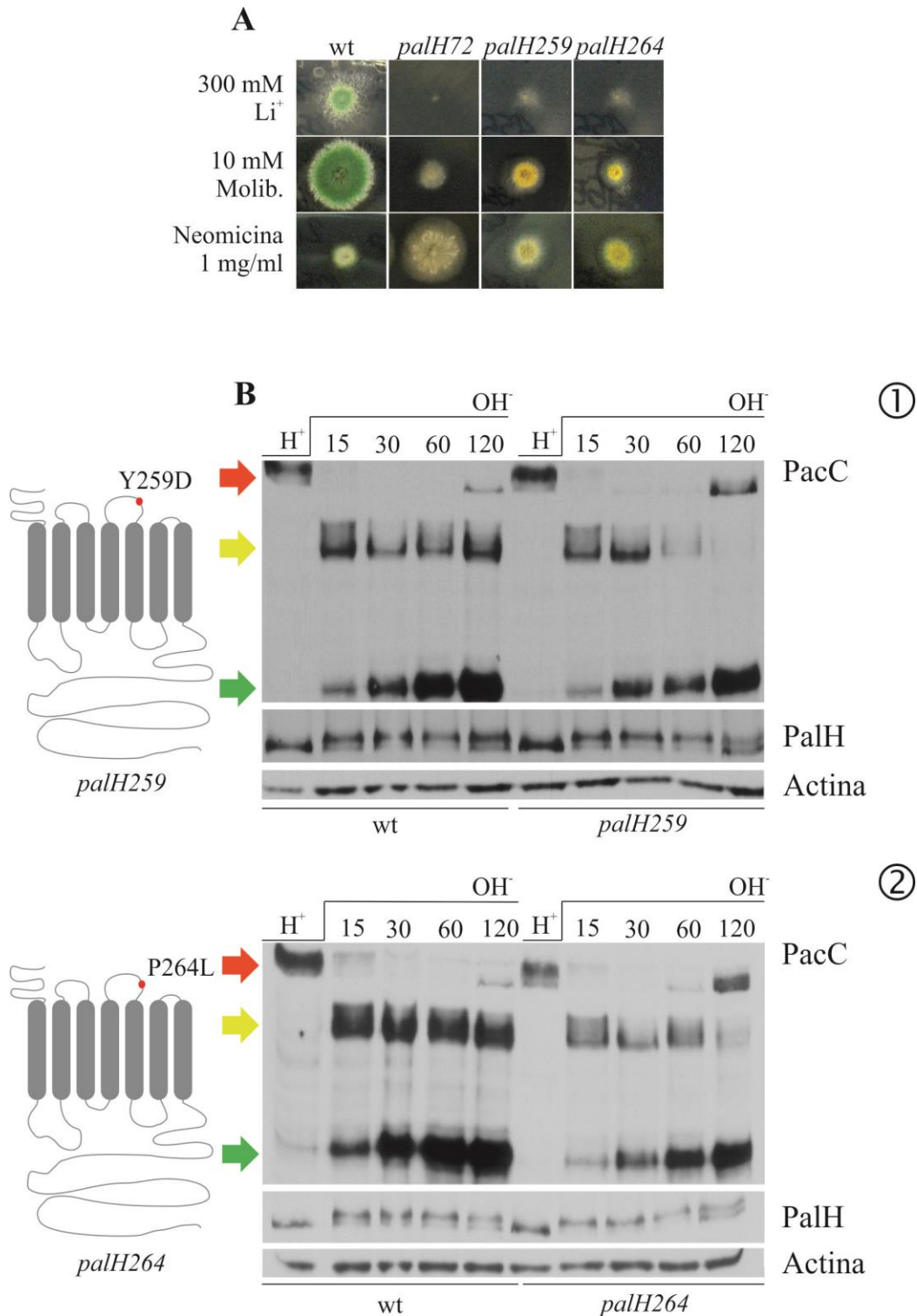
*palH259*, *palH264*, *palH268* y *palH275*) en el marco de *palH::ha<sub>3</sub>*, mediante mutagénesis dirigida (paneles A de las figuras R.9, R.10 y R.11). El análisis fenotípico en placa mostró un comportamiento similar de todos los mutantes, los cuáles son más sensibles a concentraciones bajas de molibdato respecto al silvestre y más resistentes a neomicina. Además, no crecieron en presencia de litio. El análisis genético posterior, corroboró estos resultados, que indican una pérdida moderada de función.

Para estudiar a nivel molecular el comportamiento de estos mutantes, se realizaron ensayos de respuesta a pH alcalino (paneles B de las figuras R.9, R.10 y R.11). En ellos, se observó que la fosforilación y niveles de PalH no cambian respecto a lo que sucede en el silvestre, lo que indica que estas mutaciones no afectan a la estabilidad del receptor. Esta consideración es importante porque no sólo descarta una explicación trivial para la pérdida de función, sino que además sugiere que el tráfico de los receptores mutantes a la membrana plasmática tampoco está afectado. Sin embargo, se detectó una alteración clara del procesamiento de PacC, que se tradujo en niveles más bajos tanto de PacC<sup>53</sup> como de PacC<sup>27</sup>, además de una recuperación más temprana en algunos casos y/o de mayores niveles de PacC<sup>72</sup> de nueva síntesis. En todos los casos, pero especialmente en las substituciones Leu258Pro y Tyr259Asp situadas en el bucle que conecta TM4 con TM5, la respuesta al pH alcalino en los primeros 15-30 minutos es relativamente normal, pero pierde vigor con posterioridad, lo que sugiere que los mutantes son defectivos en mantener una respuesta persistente, como si fueran capaces de activarse pero no de volver a su estado inactivo de forma correcta. En cualquier caso, la pérdida de función de estos mutantes no se refleja en un cambio en los niveles de fosforilación, al menos en los tiempos analizados.

## Resultados

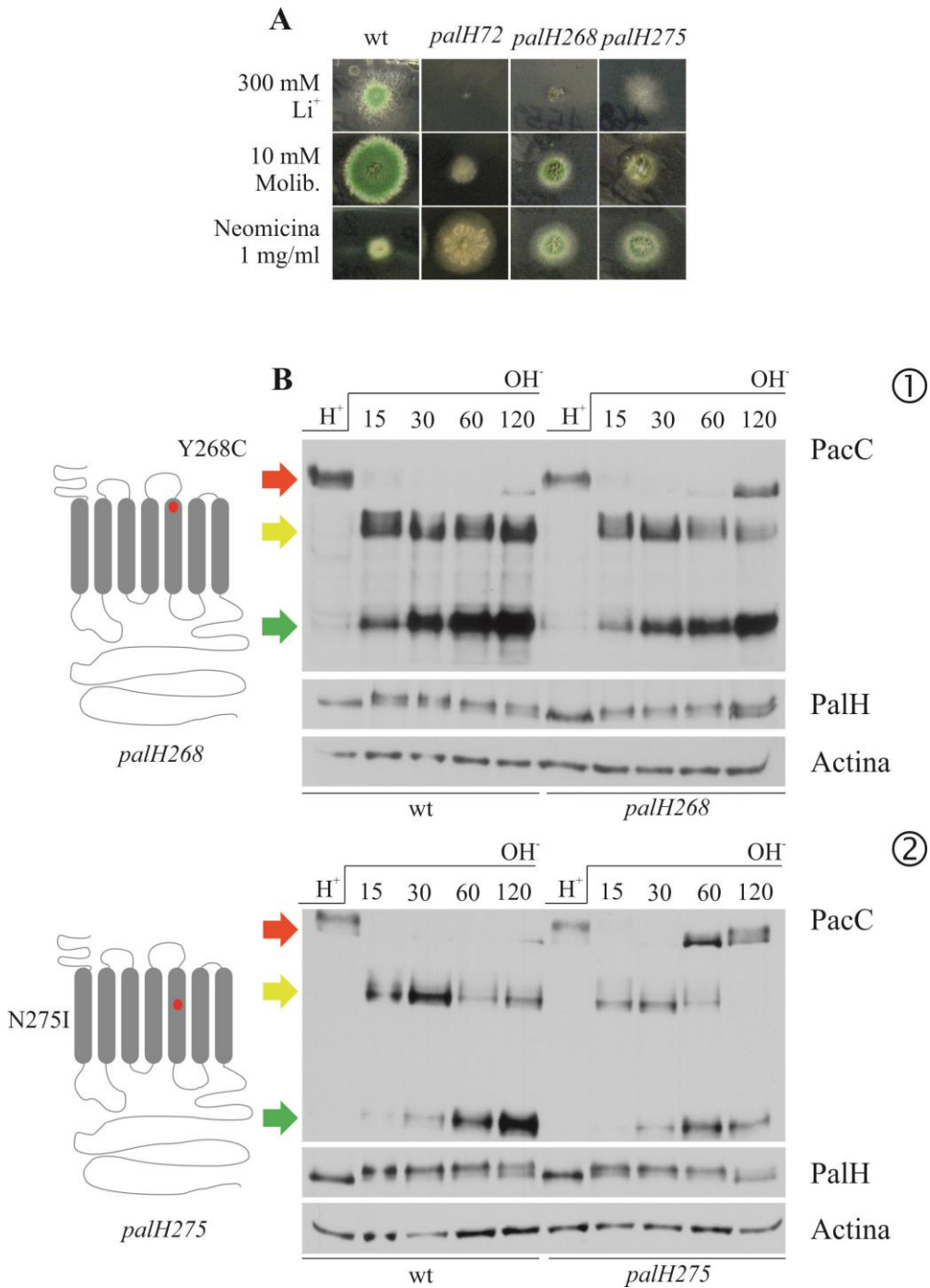


**Figura R.9-Mutantes de los bucles extracelulares.** **A-** Tests fenotípicos en placa que muestran que las mutaciones W13L y L258P son de pérdida parcial de función. Las placas, hechas de medio mínimo con glucosa, tartrato de amonio, los requerimientos necesarios para para las cepas y previamente suplementadas con el compuesto indicado, se crecieron a 37°C durante 48 h. **B.-** Procesamiento de PacC y niveles de PalH en los distintos fondos mutantes de PalH. Todas las cepas fueron crecidas a 30°C en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 horas y posteriormente transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. **B.1-** Procesamiento y niveles de PalH en el mutante *palH13*. **B.2-** Procesamiento y niveles de PalH en el mutante *palH258*.



**Figura R.10- Mutantes de los bucles extracelulares 2.** A- Tests fenotípicos en placa que muestran que las mutaciones Y259D y P264L son de pérdida parcial de función. Las placas, hechas de medio mínimo con glucosa, tartrato de amonio, los requerimientos necesarios para para las cepas y previamente suplementadas con el compuesto indicado, se crecieron a 37°C durante 48 h. B.- Procesamiento de PacC y niveles de PalH en los distintos fondos mutantes para PalH. Todas las cepas fueron crecidas a 30°C en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 horas y posteriormente transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. B.1- Procesamiento y niveles de PalH en el mutante *palH259*. B.2- Procesamiento y niveles de PalH en el mutante *palH264*.

Resultados



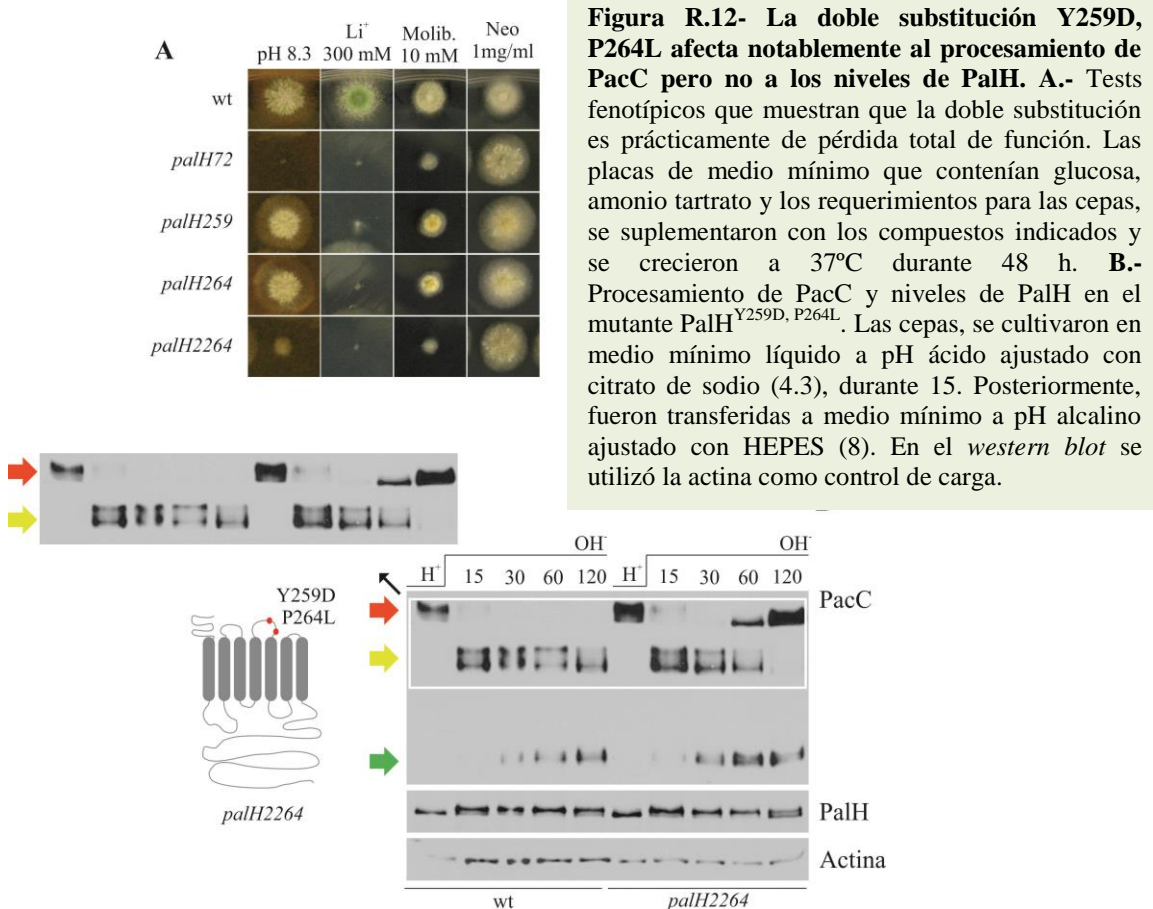
**Figura R.11- Mutantes de los bucles extracelulares 3.** **A-** Tests fenotípicos en placa que muestran que las mutaciones *palH268* y *palH275* son de pérdida parcial de función. Las placas, hechas de medio mínimo con glucosa, tartrato de amonio, los requerimientos necesarios para para las cepas y previamente suplementadas con el compuesto indicado, se crecieron a 37°C durante 48 h. **B.-** Procesamiento de PacC y niveles de PalH en los distintos fondos mutantes para PalH. Todas las cepas fueron crecidas a 30°C en medio mínimo a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 horas y posteriormente transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. **B.1-** Procesamiento y niveles de PalH en el mutante *palH268*. **B.2-** Procesamiento y niveles de PalH en el mutante *palH275*.

## Resultados

### 4.4.3.A.1-Generación de un mutante con una doble sustitución en el 2° bucle extracelular

Como las mutaciones anteriores son hipomorfas e insuficientes para causar “alteraciones mayores” detectables por el método de análisis aplicado en este trabajo, se decidió combinar dos de las sustituciones descritas en el apartado anterior, mediante la generación por mutagénesis dirigida en el contexto *palH::ha<sub>3</sub>* de la doble sustitución Tyr259Asp, Pro264Leu (alelo *palH2264*). Para estudiar el comportamiento del doble mutante, se efectuaron diversos test de crecimiento en placa en los que se evidenciaron que las cepas con la doble sustitución tienen un fenotipo de mimesis de acidez más fuerte que el que presentan las cepas con las mutaciones por separado (panel A, figura R.12).

Por último, se efectuó un ensayo de respuesta a pH alcalino para estudiar el procesamiento de PacC y los niveles y estado de la fosforilación de PalH en este mutante (panel B, figura R.12). El procesamiento de PacC está más alterado que en cada uno de los mutantes simples, siendo marcada la recuperación de PacC<sup>72</sup> ya a los 60 minutos. En cambio, los niveles de receptor y de su forma fosforilada-defosforilada no se alteraron. Estos resultados, sugieren que el receptor mutado es capaz de detectar el cambio inicial de pH, pero es incapaz de sostener la señalización.



#### ***4.4.3.B-Análisis de los bucles intracelulares***

La importancia de los bucles intracelulares en los GPCR no radica únicamente en su participación durante los cambios conformacionales que dan paso a la activación del receptor. Se ha comprobado que algunos de sus residuos pueden interactuar con otros de la cola citosólica o pueden contener motivos reconocibles por proteínas que participan en la función y/o regulación del receptor [198]. Por ello, se efectuó el estudio que se presenta a continuación.

##### **4.4.3.B.1-Las serinas del 1<sup>er</sup> bucle intracelular no participan en la fosforilación de PalH**

En el 1<sup>er</sup> bucle intracelular hay una serie de serinas (residuos 130, 132, 134, 137 y 138) que podrían ser dianas de fosforilación en PalH. Por ello se decidió mutagenizar todas ellas a alanina, dando lugar al alelo *palH138*. Una vez obtenido el mutante de reemplazamiento se realizaron diversos tests fenotípicos en placa con litio, molibdato y neomicina (panel A, fila 1, figura R.13). En ellos, se comprobó que este mutante presenta un fenotipo muy tenue de pérdida de función sólo detectable en litio. Para reforzar la validez de esta conclusión, se decidió retrocruzar este mutante y se analizó la progenie en placas con presencia de litio como método discriminatorio. Se evidenciaron dos clases fenotípicas, una de ellas ligeramente más sensible al litio respecto al parental silvestre y otra como el parental mutante. Se genotiparon mediante PCR cepas representativas de ambas clases fenotípicas y se determinó que las estirpes que ligeramente hipersensibles al litio, son las que portan el alelo *palH138*.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de respuesta a pH alcalino (panel B, punto 1, figura R.13). En el *western blot* de PalH se observó que las serinas mutagenizadas pudieran ser diana de fosforilación, ya que el mutante presenta niveles ligeramente menores de la forma fosforilada de PalH. Sin embargo, claramente no serían la única, ni la principal diana de fosforilación. En cuanto al procesamiento de PacC, se detectaron menores niveles de PacC respecto a la cepa silvestre, pero su procesamiento pareció no estar alterado. Estos resultados, indican que las serinas de este bucle intracelular podrían participar en la fosforilación del receptor, pero de ser su participación directa, no serían el único blanco de fosforilación.

##### **4.4.3.B.2-Análisis de los residuos con carga positiva del 3<sup>er</sup> bucle intracelular**

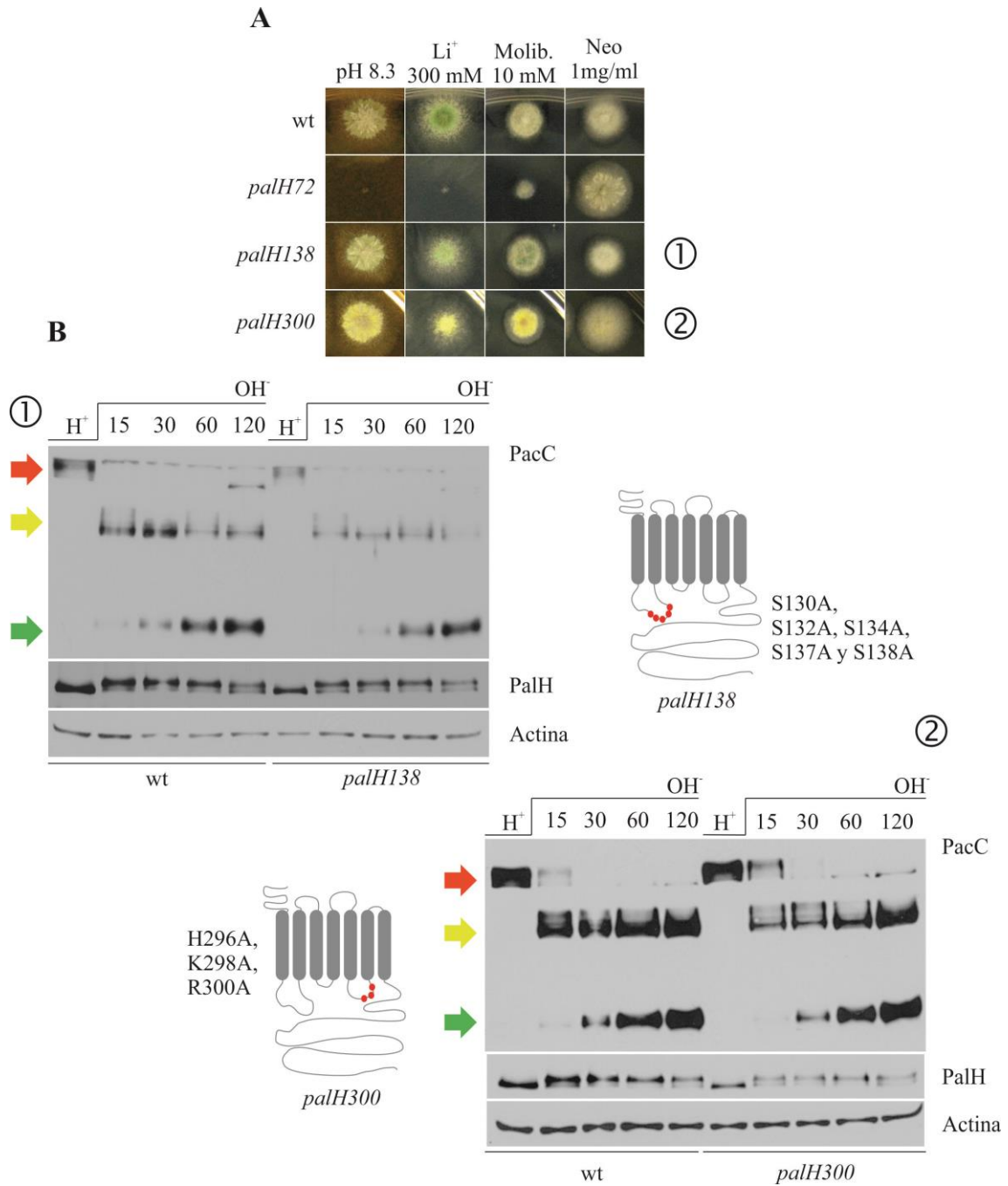
El 3<sup>er</sup> bucle intracelular contiene algunos residuos con carga positiva en su cadena lateral, concretamente la histidina 296, la lisina 298 y la arginina 300. Se hipotetizó que estos residuos pudieran formar interacciones electrostáticas con otros de carga negativa situados en el

## Resultados

primer sitio de unión a PalF, de manera que se asemejaran de alguna forma a un interruptor molecular descrito en varios GPCR y conocido como cerrojo iónico (“ionic lock”) [199]. Por ello, los tres aminoácidos con carga positiva se substituyeron por alaninas, mediante una triple substitución en el marco *palH::ha<sub>3</sub>*, dando lugar al alelo *palH300*.

Se analizó el efecto fenotípico de las substituciones mediante los mismos tests de crecimiento en placa utilizados con anterioridad (panel A, línea 2, figura R.13). En ellos, se evidenció que esta triple substitución, provoca un fenotipo muy leve de mimesis de acidez, ya que, respecto al silvestre, crece un poco menos en litio y molibdato y un poco más en neomicina, lo que indica que la activación de la ruta está afectada de forma negativa. Para corroborar este resultado se efectuó un análisis de la progenie de un retrocruzamiento entre *palH300* y una cepa silvestre. Se obtuvieron dos clases fenotípicas en presencia de litio, y mediante PCR se genotiparon cepas representativas de ambas clases. El genotipado permitió concluir que las cepas *palH300* pero no las *palH<sup>+</sup>*, presentan el fenotipo de ligera mimesis de acidez, dato que corroboró el resultado de los tests en placa hechos con los transformantes primarios.

Para finalizar, se efectuó un ensayo de respuesta a pH alcalino del procesamiento de PacC, y de PalH (panel B, punto 2, figura R.13). La triple substitución causó menores niveles de PalH, lo que se traduce en niveles ligeramente más bajos de todas las formas procesadas de PacC y en un cierto retraso en la cinética del procesamiento. Estos resultados, indican que este conjunto de substituciones pueden afectar al plegamiento proteico, o al tráfico a la membrana plasmática o al “turnover” del receptor, debido a los niveles más bajos que presenta PalH, lo que junto con la ausencia de un efecto marcado en el procesamiento permite concluir que la hipótesis del cerrojo iónico no se sostiene.



**Figura R.13-Análisis de los bucles intracelulares.** A- Tests de crecimiento de los mutantes del (1) 1<sup>er</sup> y (2) 3<sup>er</sup> bucle intracelular. En ambos casos hay una pérdida muy leve de función. Las placas de medio mínimo, se suplementaron con los compuestos indicados y se crecieron durante 48 h, a 37°C. B.- Procesamiento de PacC y niveles de PalH en los distintos fondos mutantes. Las cepas, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. B.1-Procesamiento de PacC y niveles de PalH del mutante *palH138*. B.2-Procesamiento de PacC y niveles de PalH del mutante del *palH300*.

#### ***4.4.3.C-Estudio de los dominios transmembrana***

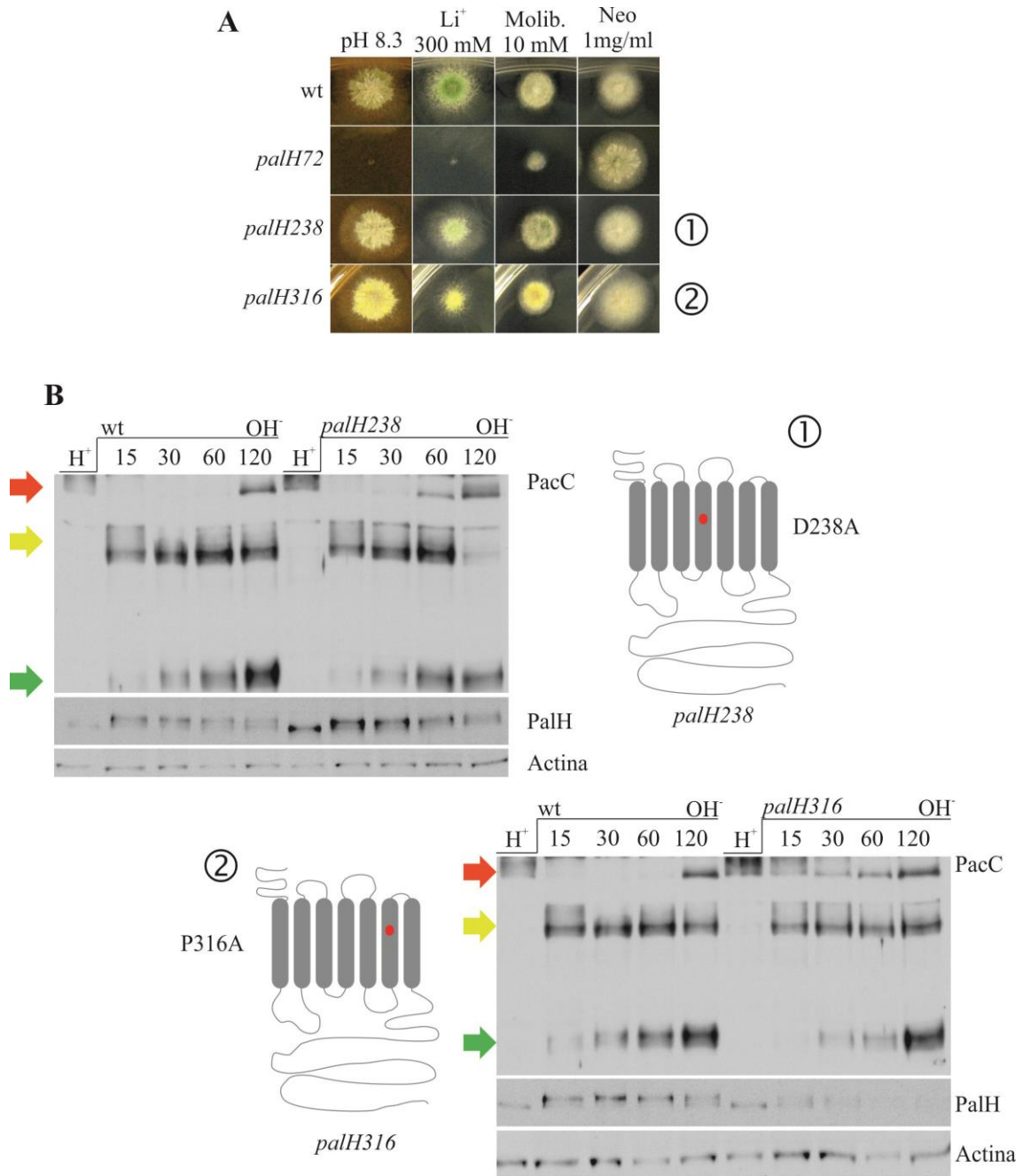
Las hélices transmembrana son clave para la activación del receptor y para la transducción de la señal extracelular al interior de la célula. La unión del ligando provoca una serie de cambios conformacionales y reordenamientos en los que, en algunos casos, existe la participación de ciertos interruptores moleculares situados en los dominios transmembrana [25,200]. Debido a ello, se decidió mutagenizar residuos que pudieran ser clave, o que se asemejaban a los interruptores moleculares descritos en los GPCRs. Por ello, se diseñaron 3 alelos diferentes de la construcción *palH:ha<sub>3</sub>* utilizada con anterioridad y que son descritos a continuación.

##### *4.4.3.C.1-Análisis de Asp238 en TM4*

La primera sustitución que se diseñó fue la del aspártico 238 (Asp238Ala), situado en la 4<sup>o</sup> hélice transmembrana (alelo *palH238*). Se trata de un residuo conservado que presenta carga negativa y que podría formar algún tipo de interacción electrostática con residuos de hélices adyacentes en PalH, en un contexto monomérico u oligomérico, de manera que ocultase así las cadenas polares a la bicapa lipídica. Se realizó un primer análisis mediante tests de crecimiento en placa, en el que este mutante mostró un fenotipo muy leve de mimesis de acidez, ya que creció un poco menos que el silvestre en presencia de litio, pero no se hallaron diferencias en el crecimiento en presencia de molibdato y neomicina (panel A, punto 1, figura R.14). Este resultado, se corroboró mediante el análisis de la sensibilidad al litio de la progenie obtenida por retrocruzamiento de este mutante. Se identificó por PCR que las cepas más sensibles al litio eran portadoras del alelo mutante, lo que corroboró el fenotipo obtenido previamente con los transformantes primarios.

Por último, se efectuó un ensayo de respuesta a pH alcalino (panel B, punto 1, figura R.14). *palH238* no reduce los niveles de PalH, sino que más bien los aumenta, pero es evidente que el procesamiento de PacC está afectado a tiempos finales, en los que se pierde PacC<sup>53</sup> y hay mayores niveles del nuevo PacC<sup>72</sup>. Es destacable el hecho de que, como ocurre con el alelo *palH2264*, la pérdida de función de PalH no correlaciona con la fosforilación.

Resultados



**Figura R.14-Análisis de las hélices transmembrana. A.-** Tests de crecimiento en placa de los mutantes (1) D238A (4<sup>a</sup> hélice) y (2) P316A (6<sup>a</sup> hélice). Las placas de medio mínimo, se suplementaron con los compuestos indicados y se crecieron durante 48 h, a 37°C. **B.-**Procesamiento de PacC y niveles de PalH en los distintos fondos mutantes. Las cepas, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. **B.1-** Procesamiento de PacC y niveles de PalH en el mutante *palH238*. **B.2-** Procesamiento de PacC y niveles de PalH en el mutante *palH316*.

#### 4.4.3.C.2-Análisis de Pro316 en TM6

Otra de las mutaciones que se analizó en las hélices transmembrana de PalH causa una sustitución en la prolina 316 (Pro316Ala), situada en la TM6. Se eligió este residuo por su similitud a la prolina descrita en la misma  $\alpha$ -hélice en muchos GPCRs y que genera una torsión en ésta [201]. La torsión en la hélice causada por la prolina, se modula a su vez por el interruptor molecular conocido como alternador rotamérico, en el que están implicados fenilalaninas y triptófanos adyacentes a la prolina [70].

El primer paso fue examinar el crecimiento en placa de los transformantes que contenían la mutación (panel A, panel 2, figura R.14). Se utilizaron los mismos criterios que en ocasiones anteriores y se comprobó que el alelo *palH316* presenta un fenotipo leve de mimesis de acidez, ya que creció ligeramente peor en litio y molibdato, y ligeramente mejor en presencia de neomicina respecto al silvestre. Para corroborar esta conclusión, se retrocruzó el mutante y se analizó el crecimiento de la progenie en presencia de litio. Se observaron dos clases fenotípicas, cuyo genotipado por PCR mostró que las cepas que presentaron un crecimiento más reducido portaban el alelo de *palH316*. Este resultado certificó la conclusión del primer examen.

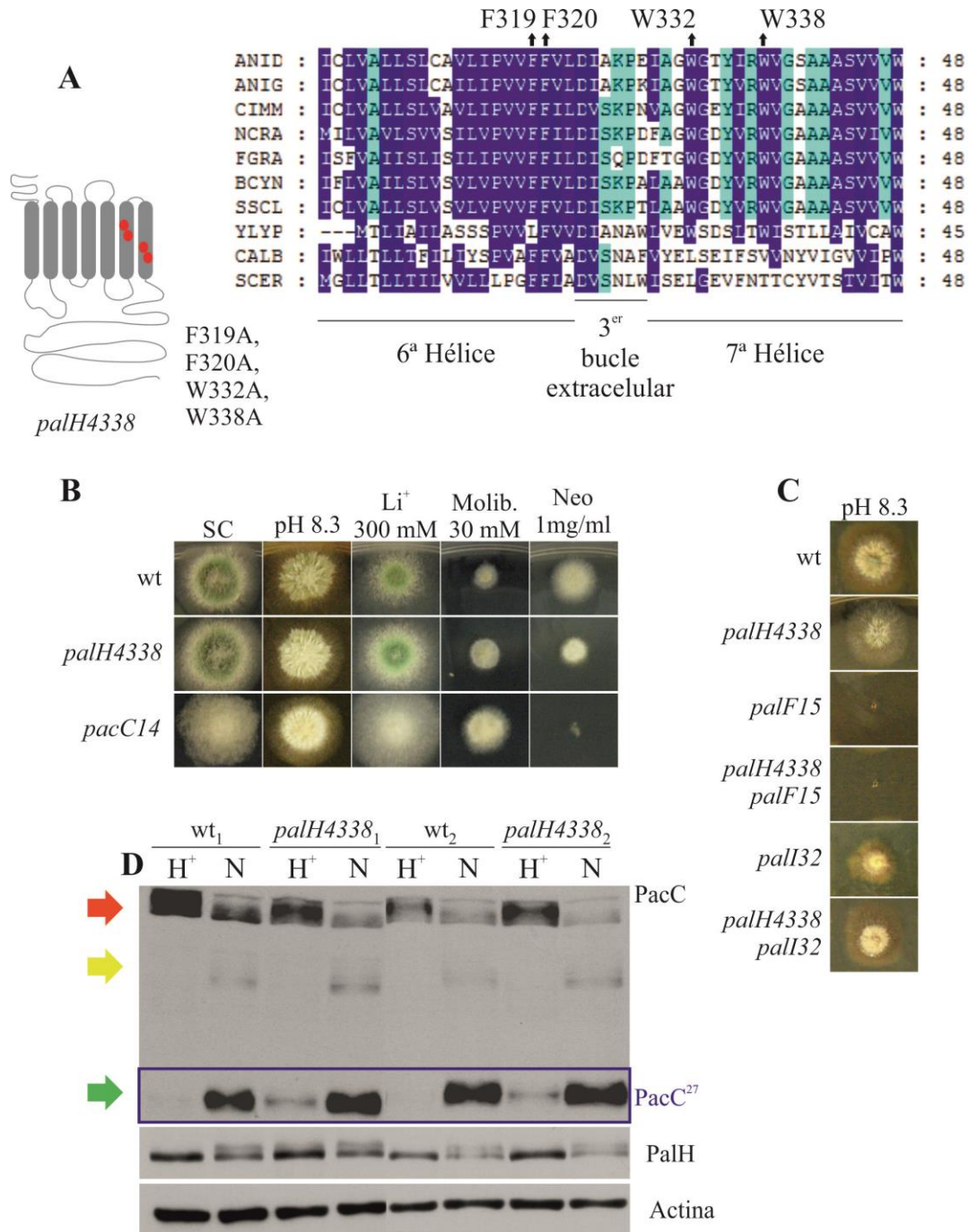
Para estudiar el comportamiento de PacC y PalH, se efectuó el análisis por *western blot* de la respuesta a pH alcalino (panel B, panel 2, figura R.14). Los niveles de PalH<sup>P316A</sup> decrecen claramente tras el cambio a pH alcalino, lo que casi con certeza esto causa un claro retraso en el procesamiento de PacC visible a tiempos tempranos, que a su vez se traslada a los tiempos más largos. Estos resultados, indican que este residuo es crucial para la estabilidad del receptor en general, pero en especial a pH alcalino.

#### 4.4.3.C.3-Una sustitución cuádruple en las hélices 6 y 7 causa un fenotipo de mimesis de alcalinidad

El último alelo mutante de las hélices transmembrana que se generó, codifica para un receptor con una cuádruple sustitución en la que están implicadas dos fenilalaninas de TM6 (Phe319Ala y Phe320Ala) y dos triptófanos de TM7 (Trp332Ala y Trp338Ala) (panel A, figura R.15). Se decidió modificar estos residuos por su semejanza con el interruptor rotamérico descrito en los GPCRs, en el cual participan fenilalaninas y triptófanos que se hallan alrededor de la prolina de la TM6. Los rotámeros de estos residuos modulan la torsión generada por la prolina en la  $\alpha$ -hélice, lo que permite activar/desactivar conformacionalmente al receptor [63]. Los transformantes que contenían el alelo mutado mostraron una mayor resistencia al litio y al molibdato que el silvestre y mayor sensibilidad a neomicina, lo que es indicativo de ganancia de

Resultados

función (panel B, figura R.15). Para confirmar esta conclusión se analizaron los fenotipos de la progenie de un retrocruzamiento de este mutante en cuanto a su resistencia al litio.



**Figura R.15-La cuádruple sustitución en las hélices 6 y 7 activan parcialmente la señalización.**

**A**-Alineamiento de secuencias que muestra la conservación de los residuos sustituidos. Las especies son las siguientes: ANID: *A. nidulans*; ANIG: *A. niger*; CIMM: *C. immitis*; NCRA: *N. crassa*; FGRA: *F. graminearum*; BCYN: *B. cinerea*; SSCL: *S. sclerotiorum*; YLYP: *Y. lipolytica*; CALB: *C. albicans*; SCER. *S. cerevisiae*, Rim21. **B**.- Análisis fenotípicos en placa. Las cepas se crecieron a 37°C durante 48 h, en placas de medio mínimo suplementadas con los compuestos indicados. **C**.- Análisis de complementación de los alelos mutantes *palI32* y *palF15*. Las estirpes se crecieron en placas de medio mínimo a pH 8.3 durante 48 h, a 37°C. **D**.-Análisis de respuesta final a pH ácido y alcalino. Se crecieron 2 réplicas del mutante *palH4338* y dos de la estirpe silvestre a 30°C durante 15 h, en medio mínimo ácido ajustado con fosfatos (pH 5.5) y en medio mínimo neutro ajustado con fosfatos (pH 6.8). Se utilizó la actina como control de carga en el *western blot*.

## Resultados

Se obtuvieron dos clases fenotípicas, una que creció tan bien en litio como el parental con la cuádruple sustitución y otra que presentó un crecimiento similar al parental silvestre. Se genotipó mediante PCR la presencia del alelo *palH::ha<sub>3</sub>* o *palH<sup>+</sup>* en cepas representativas de ambas clases. El genotipado mostró que aquellas cepas que presentan un crecimiento mayor en presencia de litio son las que llevaban el alelo *palH::ha<sub>3</sub>* y por tanto, la cuádruple sustitución. En cambio, las cepas que mostraron un crecimiento similar al silvestre contenían el alelo *palH<sup>+</sup>*. Además, el Profesor Arst realizó un análisis genético en paralelo. Para ello, cruzó la cepa con el alelo *palH4338* con una estirpe que contenía el alelo *camC108*, alelo mutante del gen de la resistencia a cloranfenicol que está ligado al locus de *palH*. Toda la progenie resistente a cloranfenicol que obtuvo, creció como un silvestre en presencia de molibdato. En cambio, la progenie sensible a cloranfenicol fue más resistente al molibdato que el silvestre, lo que corroboró el resultado anterior.

En la ruta de señalización, PalF actúa corriente abajo de la ruta, mientras que PalI participa aguas arriba aunque no es esencial [19,21]. Por ello, se estudiaron las relaciones de epistasia de *palH4338* con *pall32* y *palF15*. Dado que el fenotipo de ganancia de función de *palH4338* es muy débil, se usó como test diagnóstico el crecimiento a pH alcalino, ya que niveles de activación de la ruta relativamente bajos son suficientes para permitir sobrevivir a ese pH. Así, los mutantes *palF<sup>-</sup>* no crecen a pH alcalino, pero los mutantes *pall<sup>-</sup>* sí, aunque menos que el silvestre [13]. El panel C de la figura R.15, muestra que los dobles mutantes *palH4338-pall32*, crecen mejor a pH alcalino que el mutante simple *pall32*. En cambio, *palF15* es totalmente epistático sobre *palH4338*, lo que indica que el efecto fenotípico de la mutación cuádruple requiere PalF.

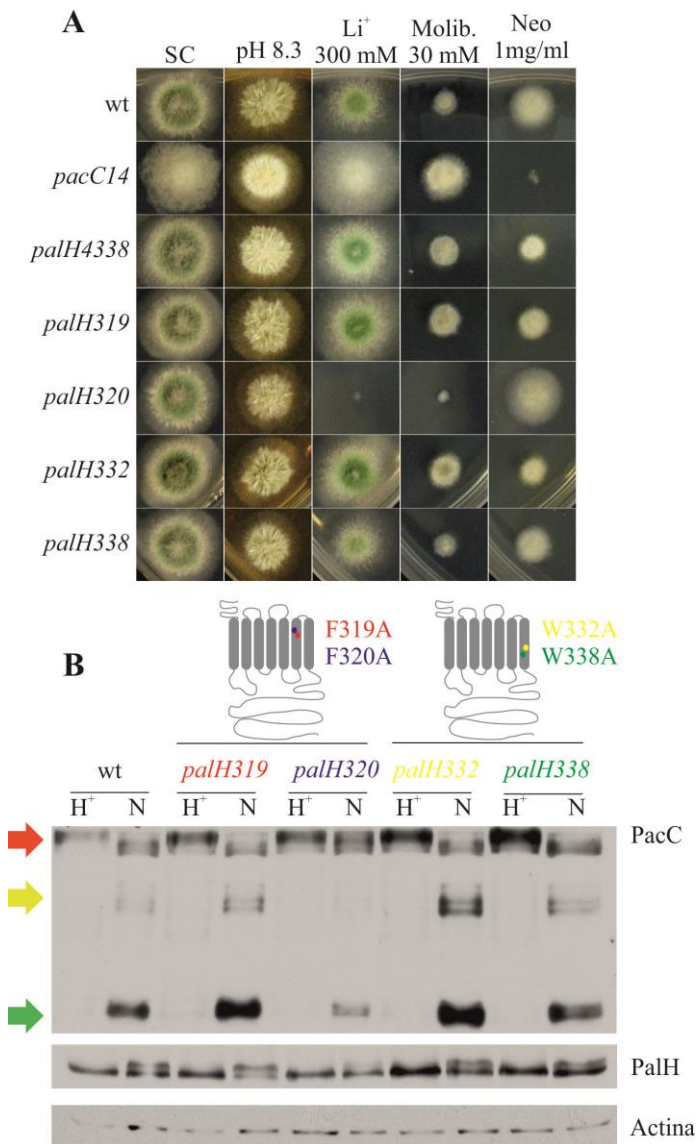
Finalmente, se determinaron los niveles de PacC en dos réplicas biológicas del silvestre y dos de la cepa *palH4338*, a pH ácido y neutro (panel D, figura R.15). Se observaron niveles detectables de PacC<sup>27</sup> a pH ácido en las dos réplicas de la estirpe mutante, pero no en el silvestre. No se observaron diferencias en la respuesta a pH neutro y tampoco en los niveles de PalH en general ni en los de su forma fosforilada. Junto a los análisis de crecimiento en placa y los estudios de epistasia con los alelos nulos para *pall* y *palF*, este resultado mostró que la tetra-sustitución resulta en una activación parcial del receptor, lo que permite clasificar a este mutante como el primero de ganancia de función descrito en PalH. Además, confirma que PalF se halla aguas abajo de la ruta y corrobora que PalI no puede ser el receptor debido a que su función no esencial se suple con la activación débil de PalH. De este modo, se concluye que PalH es el receptor e pH ambiental.

### 4.4.3.C.3.1-Separación de mutaciones en el alelo *palH4338*

Para intentar acotar la contribución de los cambios en los triptófanos y fenilalaninas del mutante *palH4338*, se decidió separar cada una de las mutaciones y generar 4 alelos distintos, cada uno causativo de una sola sustitución, denominados *palH319*, *palH320*, *palH332* y *palH338*. Una vez obtenidos y genotipados los transformantes para cada una de las mutaciones, se estudió su crecimiento en placa como en ocasiones anteriores (panel A, figura R.16). Las sustituciones Phe319Ala (*palH319*) y Trp332Ala (*palH332*) dan lugar a un fenotipo leve de mimesis de alcalinidad, muy similar al de la cepa con la cuádruple mutación; la sustitución Phe320Ala (*palH320*) causa un fenotipo de pérdida de función (i. e. mimesis de acidez), mientras que la cepa *palH338* (Trp338Ala) se comportó igual que una estirpe silvestre.

Se estudió el procesamiento de PacC en todas ellas, tal y como se hizo en el mutante cuádruple (panel B, figura R.16). En este caso no se detectó activación de PacC a pH ácido en ninguno de los mutantes. Sin embargo, los mutantes Phe319Ala y Trp332Ala presentaron mayores niveles de PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup> en condiciones neutras que el silvestre, lo que correlacionaría con su fenotipo de leve mimesis de alcalinidad. En cambio, la sustitución Phe320Ala afecta de forma claramente negativa a la activación proteolítica de PacC (carril a pH neutro), ya que los niveles de PacC<sup>27</sup> son muy bajos, lo que correlaciona con la mimesis de acidez detectada en los tests de crecimiento. Por último, el mutante Trp338Ala no parece afectar al procesamiento de PacC, puesto que se observan un patrón muy similar al del silvestre, tanto en condiciones ácidas como neutras. Estos resultados, indicaron que las sustituciones Phe319Ala y Trp332Ala son las que posiblemente contribuyen a la leve activación del receptor observada en *palH4338*.

## Resultados



**Figura R.16-Análisis de las substituciones de *palH4338* por separado.** **A.**-Tests de crecimiento en placa de las substituciones separadas del cuádruple mutante. Las estirpes se crecieron en medio mínimo suplementado con el compuesto indicado. Se crecieron a 37°C durante 48 h. **B.**- Ensayos de respuesta final a pH ácido y neutro. Cada mutante se creció en medio mínimo líquido ácido (pH 5.5 ajustado con fosfatos) y neutro (pH 6.8 ajustado con fosfatos), durante 15 h a 30°C. Se utilizó la actina como control de carga en el *western blot*.

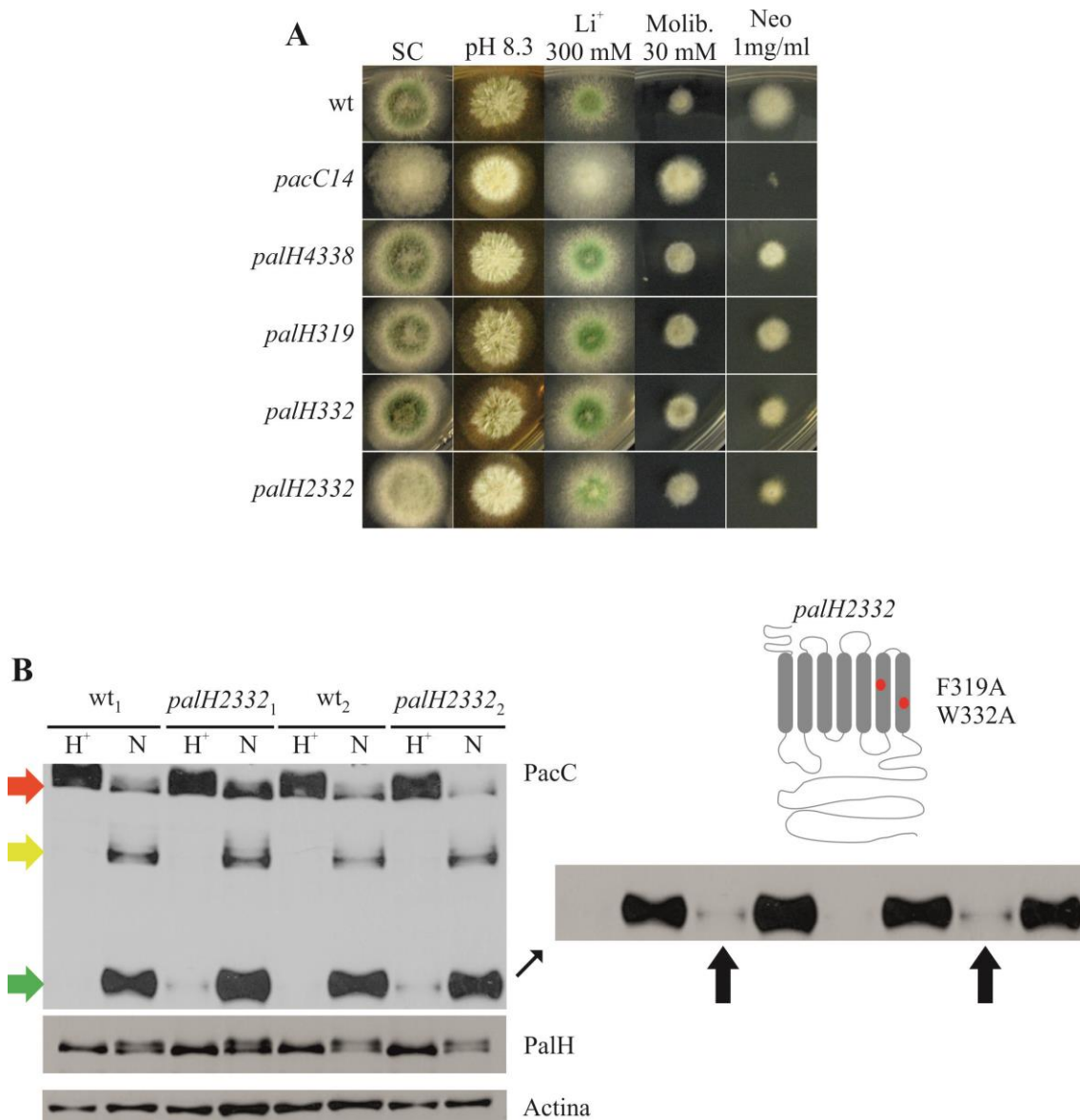
### 4.4.3.C.3.2-Generación de un mutante con la doble substitución *Phe319Ala-Trp332Ala*

Cómo las substituciones en Phe319 y Trp332 parecían contribuir de forma positiva a la activación de PalH, se decidió generar el alelo *palH2338* que causaba ambas a la vez, para comprobar la posibilidad de un efecto aditivo. Una vez obtenidos y genotipados los transformantes con la doble substitución, se examinó su fenotipo (panel A, figura R.17). En este caso, no se observaron diferencias notables en los ensayos diagnósticos respecto a los mutantes que contienen las substituciones por separado o respecto al del cuádruple cambio, excepto una

## Resultados

leve hipersensibilidad a neomicina con respecto a los correspondientes mutantes simples. Sin embargo, el doble mutante, como los mutantes simples, es más resistente a molibdato y litio y menos a neomicina que la estirpe silvestre, hecho indicativo de ganancia parcial de función por parte de PalH.

Se analizó el patrón de procesamiento de PacC a pH ácido y neutro con 2 réplicas biológicas de la estirpe silvestre, y del mutante con la doble sustitución (panel B, figura R.17). En este caso, en la cepa *palH2338* hay procesamiento, aunque muy ineficiente, de PacC a pH ácido, al igual que ocurre con el mutante de la cuádruple sustitución. Sin embargo, no se apreciaron diferencias en el procesamiento a pH neutro. Además, tampoco se observaron diferencias ni en los niveles, ni en la relación entre las formas fosforilada-defosforilada de PalH. Estos datos, indican que hay un efecto aditivo entre ambas mutaciones, detectable por los ensayos bioquímicos. De este modo, se concluye que las sustituciones causativas de la ligera activación de la ruta en el mutante tetra-sustituido son Phe319Ala y Trp332Ala.



**Figura R.17-La doble sustitución F319A, W332A es capaz de activar el procesamiento de PacC a pH ácido.** **A.-**Análisis fenotípicos en placa. Las cepas se crecieron a 37°C durante 48 h, en placas de medio mínimo suplementadas con los compuestos indicados. **B.-**Análisis de respuesta final a pH ácido y alcalino. Se crecieron 2 réplicas del mutante y dos de la estirpe silvestre a 30°C durante 15 h, en medio mínimo líquido ácido ajustado con fosfatos (pH 5.5) y en medio mínimo neutro ajustado con fosfatos (pH 6.8). Se utilizó la actina como control de carga en el *western blot*.

## 4.5-ESTUDIO DEL PAPEL FISIOLÓGICO DE LA FOSFORILACIÓN DE PalH

La fosforilación es un tipo de modificación post-traducciona que regula la actividad de muchas proteínas. En los receptores acoplados a proteína G heterotrimérica, la fosforilación mediada por las quinasas de GPCRs (GRKs o *GPCR Kinases*) juega un papel clave en el reclutamiento de la correspondiente arrestina [4], que tiene más afinidad por las formas fosforiladas de los receptores a los que reconoce. La disrupción del núcleo polar de la arrestina por parte de los grupos fosfato, provoca una serie de cambios conformacionales que la activan [6]. El incremento de afinidad arrestina-receptor permite bloquear mediante impedimento estérico la unión de la proteína G heterotrimérica al receptor. Finalmente, la arrestina es ubiquitinada, lo que promueve la internalización del complejo receptor-arrestina, de manera que la señal se atenúa.

Además, se ha descrito que la internalización del complejo receptor-arrestina permite activar otras rutas independientes de proteína G [6,202]. Como se mencionó en el apartado 4.4.2, PalH es fosforilado en condiciones alcalinas. Debido a ello, se decidió llevar a cabo un estudio de la posible función de la fosforilación.

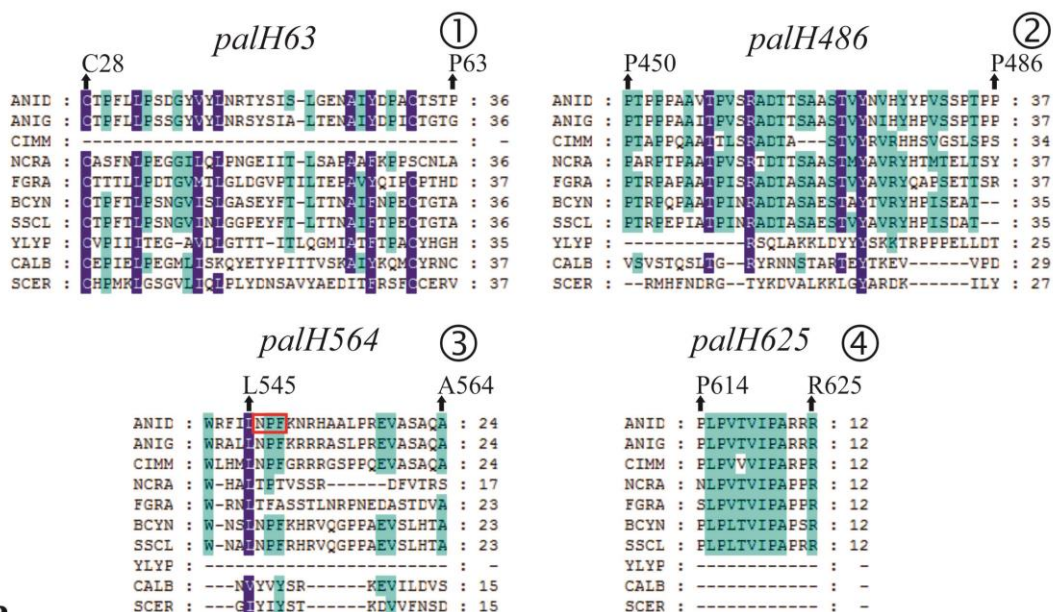
### 4.5.1-PalH contiene una región conservada fosforilable

La ruta de señalización por pH ambiental, así como los elementos que participan en ella, están conservados en hongos [106]. Por ello, se realizó un alineamiento de secuencias entre homólogos de PalH, en el que se puso de manifiesto la existencia de cuatro regiones altamente conservadas, tres en la cola citosólica y una en la región N-terminal extracelular. La región 1, situada en la zona extracelular, contiene dos cisteínas invariables (panel B, punto 1, figura R.18). La región 2 es rica en residuos fosforilables (panel A, punto 2, figura R.18). La región 3 contiene un motivo NPF, potencialmente reconocible por la maquinaria de internalización endocítica y que por tanto, podría desempeñar un papel en la internalización y reciclado de PalH (panel A, punto 3, figura R.18). La región 4, más cercana al extremo C-terminal de la cola citosólica, está muy conservada (panel A, punto 4, figura R.18). Se decidió estudiar cada una de estas regiones a través de mutantes de delección (panel B, esquemas 1, 2, 3 y 4, figura R.18). Para ello, se utilizó como base la construcción *palH::ha<sub>3</sub>::pyrGfum* y se generaron cada una de las delecciones por separado, lo que dio lugar a los alelos *palH63* (R1Δ, de C28 a P63), *palH486* (R2Δ, de P450 a P486), *palH564* (R3Δ, de L545 a A564) y *palH625* (R4Δ, de P614 a R625). Se transformó la cepa nula para PalH descrita con anterioridad con cada uno de los alelos

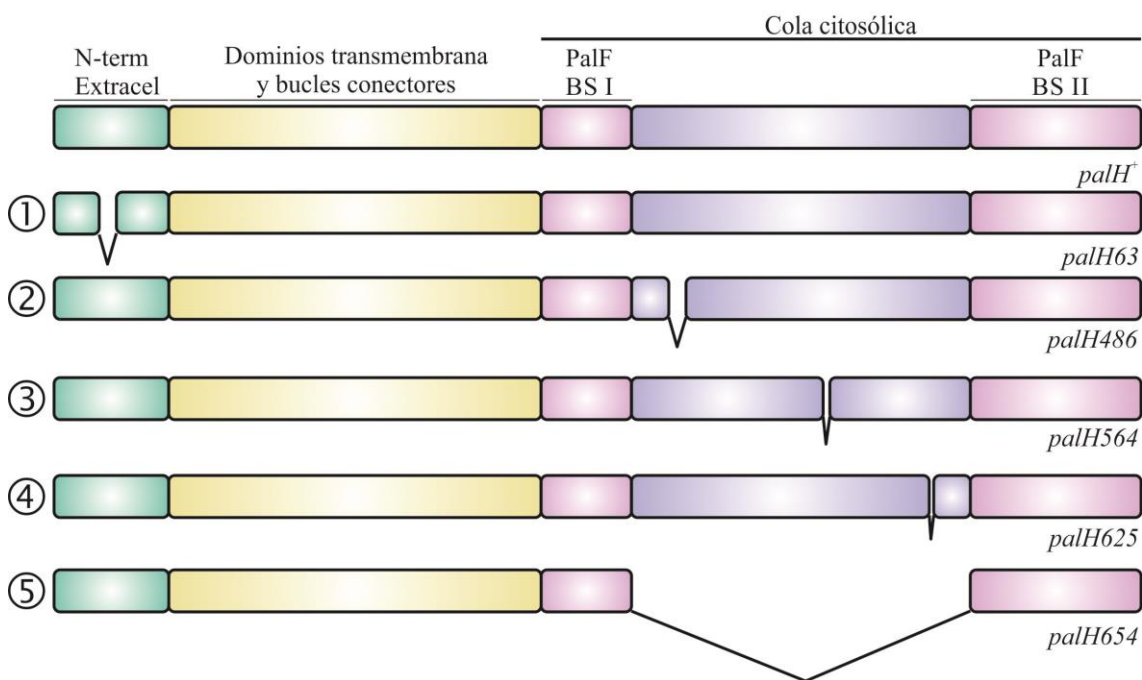
## Resultados

mencionados y se genotiparon los transformantes obtenidos por *Southern blot*. Se seleccionaron aquellos que contenían una única copia del alelo etiquetado.

**A**



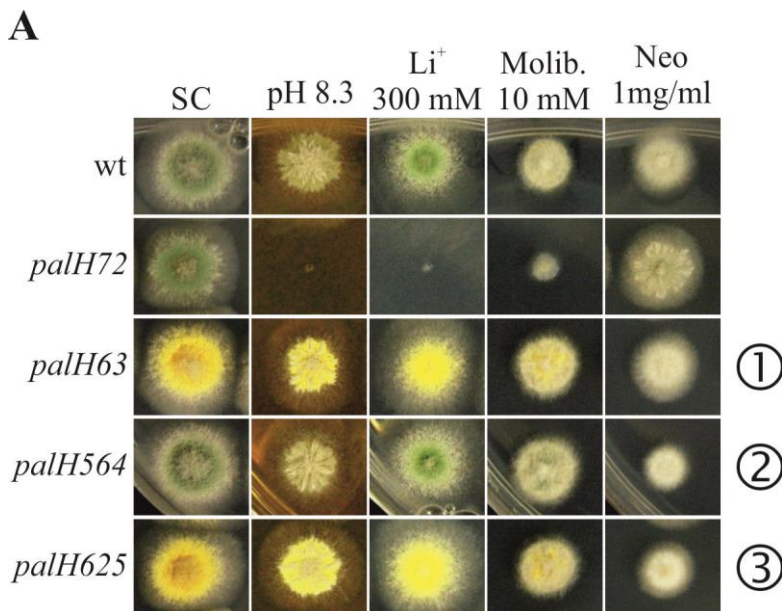
**B**



**Figura R.18-Análisis de las regiones conservadas de PalH.** A.-Alineamiento de secuencias que muestra la conservación de los residuos e indica toda la región delecionada. Las especies son las siguientes: ANID: *A. nidulans*; ANIG: *A. niger*; CIMM: *C. immitis*; NCRA: *N. crassa*; FGRA: *F. graminearum*; BCYN: *B. cinerea*; SSCL: *S.sclerotiorum*; YLYP: *Y. lypolitica*; CALB: *C. albicans*; SCER: *S. cerevisiae*, Rim21. Representación esquemática de las distintas deleciones realizadas en *palH*.

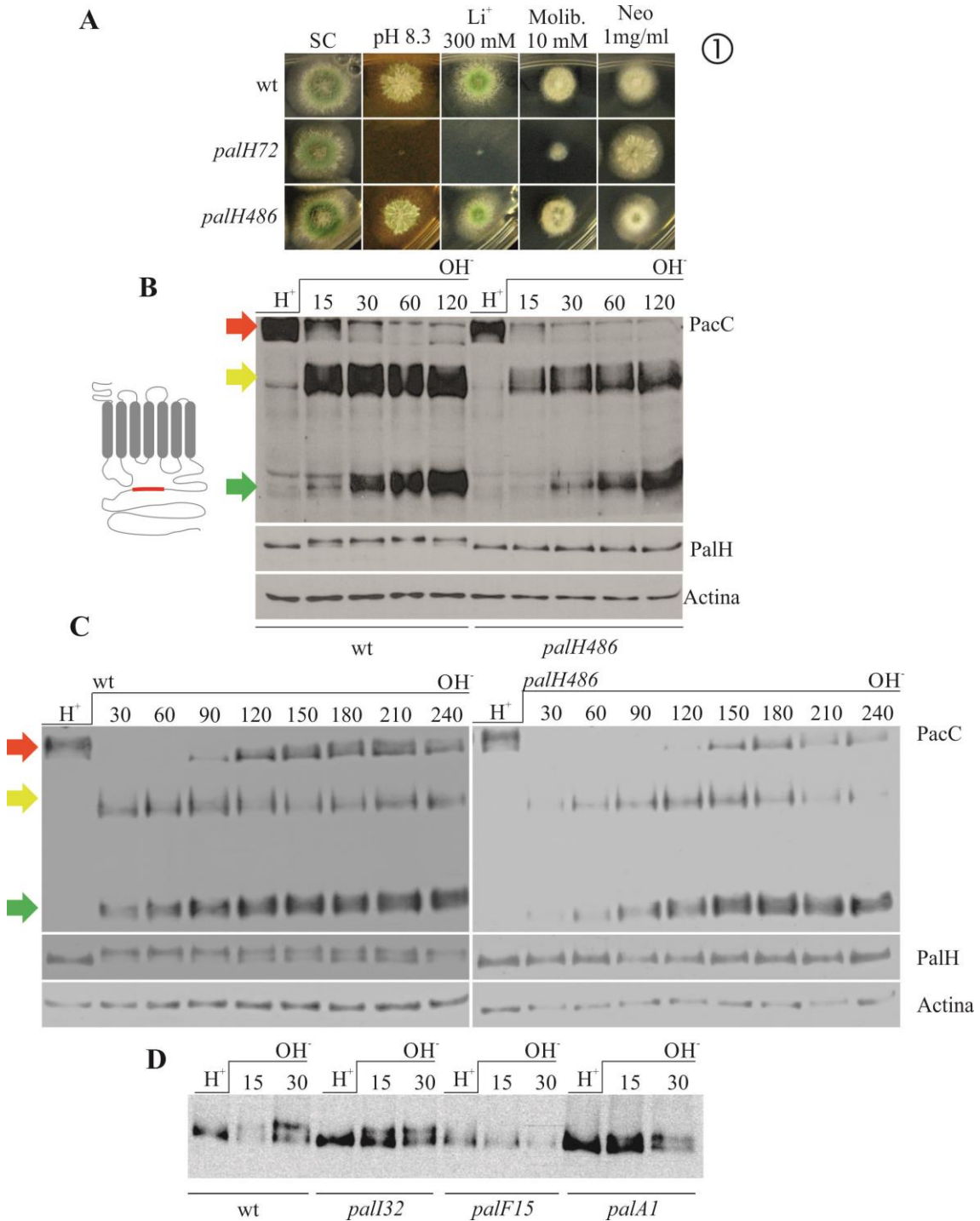
## Resultados

A continuación, se llevaron a cabo los tests fenotípicos en placa para estudiar el efecto de cada una de las deleciones. No se detectaron diferencias (panel A, filas 1, 2 y 3, figura R.19), salvo en el mutante de la región R2 (panel A, figura R.20), el cual crece peor en presencia de 300 mM de litio. Se realizó un análisis de las progenies obtenidas en los correspondientes retrocruzamientos con una estirpe silvestre, en el que se utilizó la sensibilidad a litio como criterio de discriminación. Los alelos de deleción de las regiones 1, 3 y 4 no mostraron diferencias en el crecimiento. En cambio, el análisis del cruce de la región de posible fosforilación mostró 2 clases fenotípicas distintas, una capaz de crecer en litio de manera similar a la cepa silvestre y otra que presenta hipersensibilidad, al igual que el parental mutante. Se genotiparon por PCR 6 cepas representativas de ambas clases fenotípicas y se obtuvo una correspondencia total entre fenotipo y genotipo, lo que permite concluir que el déficit en el crecimiento en presencia de litio es atribuible al alelo *palH486* (R2 $\Delta$ ).



**Figura R.19-Los mutantes *palH63*, *palH564* y *palH625* no muestran diferencias fenotípicas respecto a la estirpe silvestre. B.-** Análisis fenotípicos en placa. Las cepas se crecieron a 37°C durante 48 h, en placas de medio mínimo suplementadas con los compuestos indicados (Li=litio; Molib.=molibdato de sodio; Neo=sulfato de neomicina).

Para finalizar este estudio, se efectuaron ensayos de respuesta a pH alcalino con el mutante *palH486*. En él, se hallaron diferencias en el comportamiento de PalH (*palH486*; panel B, figura R20). Mientras que en el silvestre, el receptor presenta dos formas a pH alcalino, siendo la que migra menos la forma fosforilada del receptor, en el mutante sólo se observó una. Este resultado indica que la región 2, rica en aminoácidos fosforilables, está implicada directamente en la fosforilación del receptor. El procesamiento de PacC en el mutante *palH486* se describe en el siguiente apartado.



**Figura R.20-PalH contiene una región conservada fosforilable. A.-** Análisis fenotípicos en placa. Las cepas se crecieron a 37°C durante 48 h, en placas de medio mínimo suplementadas con los compuestos indicados. **B.-** Procesamiento de PacC y niveles de PalH en el mutante *palH486*. Las cepas, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). **C.-** Procesamiento de PacC a tiempos largos. Se procedió igual que en C pero se recogieron muestras cada 30 minutos hasta un total de 240 minutos. En los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. **D.-**Análisis de la fosforilación de PalH en distintos fondos mutantes para elementos de la ruta *pal*.

#### **4.5.2-La fosforilación de PalH no es necesaria para la activación de PacC**

Como se ha comentado con anterioridad, la fosforilación de los GPCRs permite, en el caso de los metazoos, el reconocimiento de éste por parte de la  $\beta$ -arrestina correspondiente y por tanto, su reclutamiento [4]. Debido a ello, la fosforilación de PalH podría facilitar el reclutamiento de PalF, con lo que un déficit en la fosforilación afectaría negativamente a la activación de PacC. Por ello, se realizó un ensayo de respuesta a pH alcalino con el mutante no fosforilable de PalH, en el que se estudió la activación proteolítica de PacC (panel B, figura R.20). Tal como cabría predecir del único y leve fenotipo en presencia de litio, se observó que el procesamiento está afectado sólo ligeramente, observándose un ligero retraso en la aparición de PacC<sup>27</sup> con respecto a la cinética normal. Debido a ello, se llevó a cabo un ensayo de respuesta a pH alcalino a tiempos más largos (panel C, figura R.20), en el que se confirmó el retraso en el procesamiento y se detectó, además, un retraso en la aparición del PacC<sup>72</sup> sintetizado *de novo*. Estos resultados permiten concluir que la fosforilación de PalH no es importante para reclutar a PalF y no participa en la activación de la ruta. Las posibles explicaciones se considerarán en la discusión, pero en cualquier caso no se puede descartar que participe de alguna forma en la regulación de PalH, por ejemplo, como señal para su “turnover” endocítico.

#### **4.5.3-La fosforilación de PalH es PalF dependiente y PalI y PalA independiente**

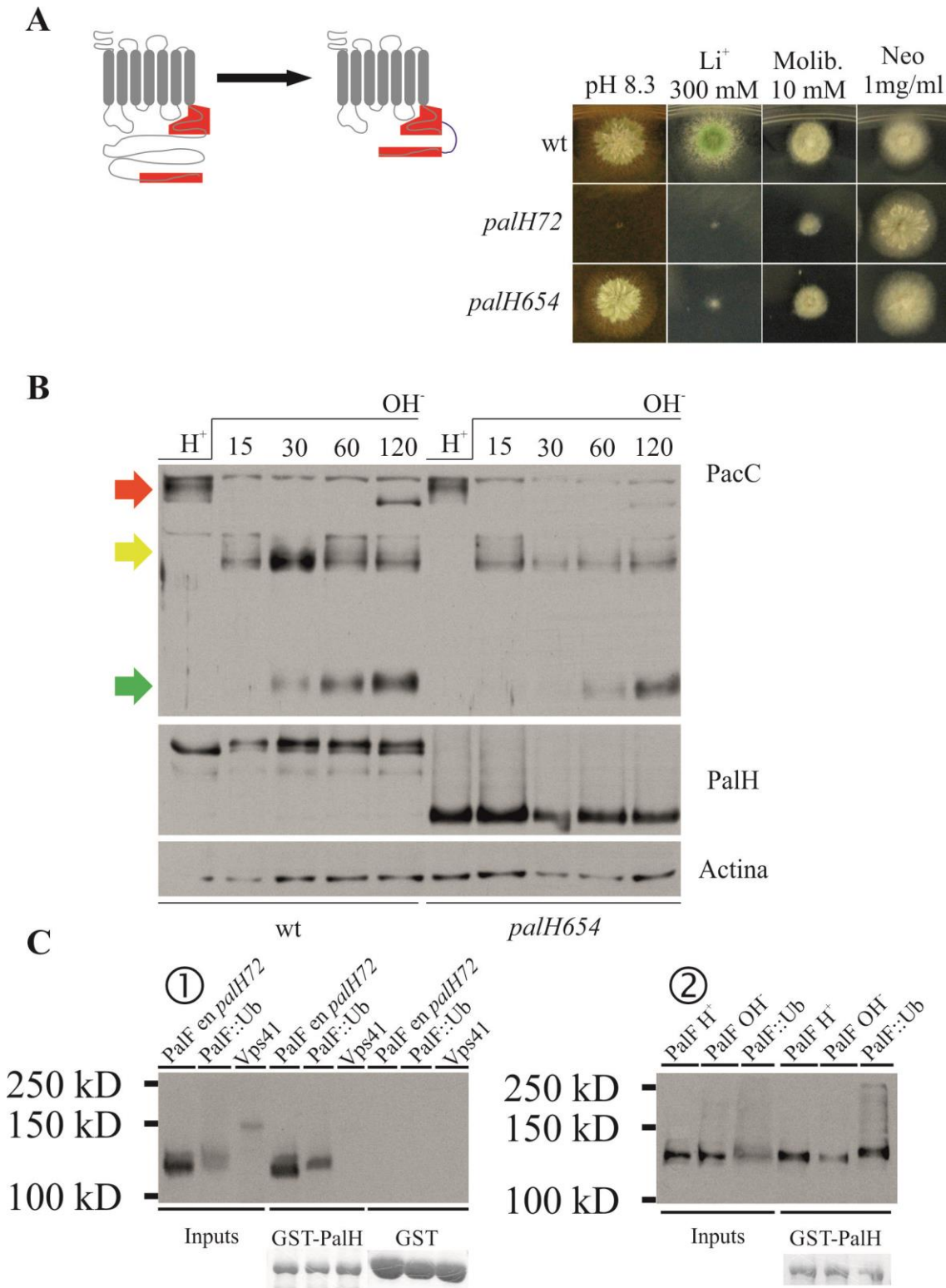
Como se ha comprobado en el punto anterior, la fosforilación no es necesaria para activar el procesamiento de PacC. Sin embargo, se quiso estudiar si alguna de las proteínas del complejo sensor o que actúan corriente debajo de éstas, tiene algún efecto sobre la fosforilación de PalH. Para ello, se obtuvieron en diversos cruces *palH::ha<sub>3</sub>*, que además llevasen un alelo nulo para *palI*, *palF* o *palA* (estos son *palI32*, *palF15* y *palA1*). En ensayos de respuesta a pH alcalino, se evidenció que los alelos *palI32* y *palA1* no provocan ningún efecto sobre la fosforilación y/o niveles de PalH fosforilado (panel D, figura R.20). Sin embargo, el alelo *palF15*, sí tiene un efecto negativo no sólo en la fosforilación, sino también sobre los niveles totales de PalH que son menores después del cambio a pH alcalino, y que disminuyen con el tiempo (figura R.20, panel D). Estos datos, sugieren que la presencia de PalF tiene efectos positivos sobre la fosforilación y estabilidad del receptor.

#### **4.5.4-PalH sólo requiere, en su cola citosólica, los dos sitios de unión a PalF para activar PacC**

Debido a que la delección de la región de fosforilación y de otras regiones conservadas en la cola citosólica de PalH no impiden la señalización, se decidió generar un nuevo alelo mutante, *palH654*, en el que se delecionó toda la región comprendida entre los dos sitios de unión a PalF (panel A, esquema 5, figura R.18). Una vez genotipados los transformantes primarios, se comprobó con tests de crecimiento (panel A, figura R.21) que este mutante presenta una pérdida parcial de función, con un fenotipo de mimesis de acidez leve. Sin embargo, la cepa *palH654* es capaz de crecer normalmente a pH alcalino y es sólo ligeramente más sensible al molibdato que la estirpe silvestre, lo que indicaba que el mutante retenía gran parte de las funciones de PalH. Del análisis de la progenie del correspondiente retrocruzamiento se concluyó, usando la sensibilidad a litio, que el fenotipo co-segregaba con el alelo mutante.

Se examinó entonces, en un ensayo de respuesta a pH alcalino (panel B, figura R.21), el comportamiento de PacC y PalH. PalH presenta una mayor movilidad electroforética debido a la delección. No se observaron formas fosforiladas del receptor ni niveles anormales. El procesamiento de PacC está alterado, ya que presenta menores niveles de PacC<sup>53</sup> y, especialmente, PacC<sup>27</sup> a lo largo del tiempo, lo que justificaría su mimesis de acidez. Sin embargo, la activación de la ruta globalmente considerada, es relativamente normal. Este resultado muestra que PalH únicamente requiere de los dos sitios de unión a PalF en su región citosólica para activar el procesamiento de PacC, y demuestra de forma concluyente que la fosforilación (al menos aquélla detectable por cambio de movilidad en PalH) no participa en el reclutamiento de la arrestina.

Resultados



**Figura R.21-PalH sólo requiere los sitios de unión a PalF en su cola citosólica, para activar la señalización.** **A.-** Análisis del mutante de delección de la región comprendida entre los dos sitios de unión a PalF. Tests fenotípicos en placa. Las cepas se crecieron a 37°C durante 48 h, en placas de medio mínimo suplementadas con los compuestos indicados. **B.-** Procesamiento de PacC y niveles de PalH en el mutante *palH654*. Las cepas, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En el *western blot* se utilizó la actina como control de carga. **B.-** Ensayos de *pull-down* que muestra la fuerte interacción existente entre la cola citosólica de PalH y PalF.

#### **4.5.5-PalF únicamente interacciona con PalH a través de la cola citosólica del receptor**

En el apartado anterior, se había demostrado que PalH sólo requiere en su cola citosólica los dos sitios de unión a PalF para reclutar a la arrestina y activar la ruta de señalización por pH. Para probar bioquímicamente que, la única región importante en PalH para su interacción con PalF es su cola intracelular, se realizó un ensayo de *pull-down* dirigido (panel C, figura R.21), en el que se etiquetó con Glutación S- transferasa (GST) en su extremo N-terminal, la región citosólica de PalH comprendida entre los residuos Trp349 y Arg760 que corresponde a la cola de PalH. Se expresó esta quimera en *E. coli* y se procedió al lisado de las bacterias. Se incubó el extracto resultante en resina de glutación-sepharosa y se comprobó la carga de la resina con el cebo en un gel SDS-PAGE. A continuación, se incubó la resina así cebada con un extracto de una cepa portadora del transgén *gpdA<sup>mini</sup>::palF::ha<sub>3</sub>* en un fondo genético *palH72*, para asegurar que el PalH endógeno no interfiriese. Además, la estirpe cultivó tanto en condiciones ácidas como alcalinas para ver si ese hecho afectaba de alguna forma a la interacción. En el *western blot*, se observa que PalF interacciona de forma genuina con la cola citosólica de PalH y que la cola no tiene preferencia por ninguna de las formas de PalF, ya sea ubiquitinada o sin ubiquitinar tal como muestra el punto 1 (panel C, figura R.21) y que el pH del medio en el que había sido cultivada la estirpe, no afectó la interacción (panel C, punto 2, figura R.21).

Este resultado muestra que la cola citosólica de PalH es suficiente para interaccionar con PalF y como se ha comentado en el apartado anterior, sólo necesita los dos sitios de unión a la arrestina PalF para reclutarla y activar la ruta.

#### **4.6-LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH NO REQUIERE ENDOCITOSIS**

Como hemos comentado en el apartado 4.1, PalH se asemeja en su topología a los GPCRs pero, a diferencia de éstos, no señala a través de una proteína G heterotrimérica, sino mediante la arrestina, PalF. Debido a ello y a la implicación de componentes de la maquinaria ESCRT en la señalización, se pensó en un modelo en el que el complejo receptor-arrestina debía ser endocitado para activar la ruta desde los endosomas, como ocurre en ciertos GPCRs [6]. Ese modelo se basaba en la existencia de dos complejos espacialmente separados, uno localizado en la membrana plasmática, formado por PalH, PalI y PalF, y otro en la membrana del endosoma, formado por el resto de proteínas Pal y por los elementos ESCRT. Experimentos posteriores

## Resultados

demonstraron que en condiciones alcalinas las proteínas PalA y PalC son reclutadas a puntos discretos de la membrana plasmática y no a los endosomas, hecho que invalidó el modelo anterior [14,21]. Por ello, se decidió estudiar directamente si la activación de la ruta se produce en mutantes deficientes en endocitosis, combinando estudios de localización subcelular de PalH con ensayos de procesamiento de PacC para monitorizar la respuesta a pH alcalino.

En hongos filamentosos, la endocitosis es un proceso esencial para la célula. Está relacionada de forma directa con la extensión apical y el establecimiento y mantenimiento de la polaridad. Asimismo, muchas de las proteínas implicadas en la endocitosis también afectan a la regulación y el mantenimiento del citoesqueleto de actina y, por ello, mutaciones que previenen la endocitosis dan lugar a grandes alteraciones morfogénicas y a cuasi-lethalidad o severos defectos en el crecimiento.

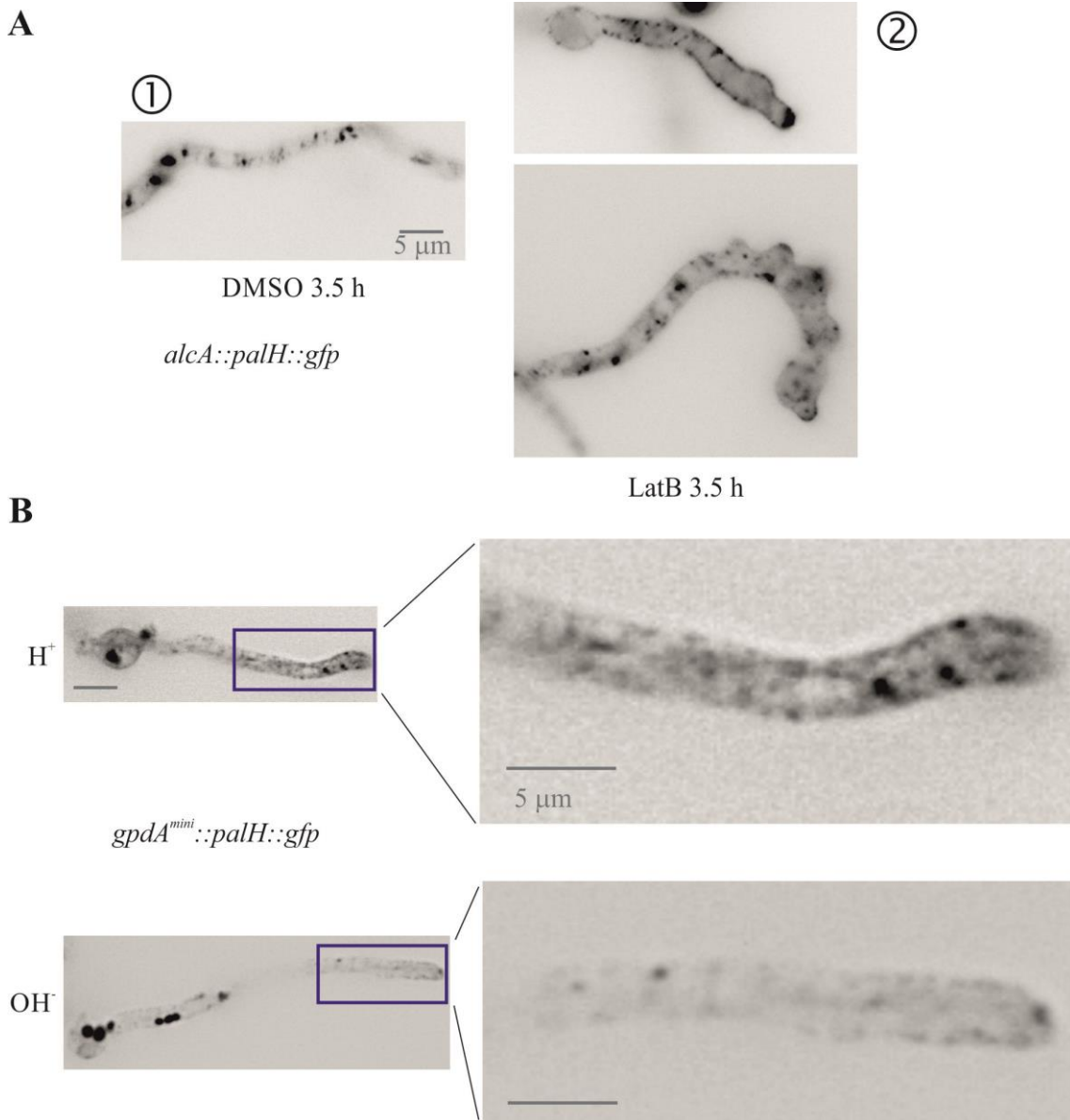
### **4.6.1-Estudio de la localización subcelular de PalH en respuesta al pH alcalino**

Estudios anteriores habían establecido que PalH::GFP no se visualiza a niveles endógenos. Por ello, el trabajo de la localización de PalH se realizó a través de la sobreexpresión condicional bajo el promotor *alcA* del cDNA de PalH etiquetado en su extremo C-terminal con GFP [13]. Ese trabajo mostró que PalH::GFP sobreexpresado se localiza preferentemente en el sistema endovacuolar pero también reside en la membrana de los ápices [13]. La tendencia intrínseca de PalH a endocitarse es patente en un experimento realizado con latrunculina B (latB). La latrunculina B despolimeriza la F-actina, lo que previene la endocitosis. Al añadir latB a un cultivo de células inducido con etanol para la sobreexpresión de PalH::GFP, se visualizó al receptor mucho menos en endovacuolas y más en membrana plasmática, lo que indicó que el *pool* interno de PalH proviene de la membrana plasmática y que la tendencia natural del receptor así sobreexpresado es a endocitarse (figura R.22, panel A, punto 2).

Sin embargo, para obtener señal suficiente en esos estudios, la expresión del promotor debía ser inducida con etanol. El necesario cambio de medio dificulta su uso en mutantes con déficit parcial de endocitosis, además de generar un asincronismo en la aparición de PalH::GFP en las diferentes hifas. Por ello se decidió utilizar el promotor moderadamente fuerte y constitutivo, *gpdA<sup>mini</sup>*. Para ello, se obtuvieron cepas que llevaban un transgén integrado en el locus *pyroA* que contenía una copia del cDNA de PalH, etiquetado con GFP en el extremo C-terminal y regulado bajo el control del promotor *gpdA<sup>mini</sup>*. En este caso, el promotor *gpdA<sup>mini</sup>* permite obtener niveles suficientes de PalH::GFP para su detección al microscopio. Como ocurre en el caso del promotor *alcA*, PalH::GFP se visualiza en la membrana del ápice y en

## Resultados

endosomas (panel B, figura R.22) y no se observa ninguna alteración en la distribución producida por la alcalinización del medio, quizás únicamente una disminución en la fluorescencia del PalH localizado en el ápice (figura R.22, panel B, OH<sup>-</sup>).



**Figura R.22-PalH se localiza en el ápice pero tiene tendencia a residir en el sistema endovacuolar. A.-Localización de PalH en presencia del compuesto latrunculina B. La estirpe se creció a 25°C en WMM suplementado con glucosa, tartrato amónico y los requerimientos necesarios. El pH se ajustó a 5.2 con fosfatos. B.-Localización subcelular de palH a pH ácido y a pH alcalino. La estirpe se creció a 25°C en WMM suplementado con glucosa, tartrato amónico y los requerimientos necesarios. Posteriormente se sustituyó el medio ácido por otro con un pH ajustado a 7.2.**

#### 4.6.2-SynA como reportero de la endocitosis

La v-SNARE SynA, homólogo fúngico de la sinaptobrevina, cuyo ortólogo en *S. cerevisiae* es Snc1p, está involucrada en la fusión entre las vesículas secretoras derivadas del Golgi con la membrana plasmática. SynA es sustrato del anillo subapical endocítico, por lo que una vez secretada es posteriormente endocitada y de nuevo reciclada con vesículas “frescas” de secreción a la membrana de la zona apical de la hifa [203]. Anteriormente en el laboratorio, se habían generado diversas herramientas genéticas para el estudio de esta proteína por microscopía. En una cepa con un transgén *alcAp::gfp::synA*, SynA está fuertemente polarizada. Ello es debido, a que en condiciones normales, la velocidad de endocitosis por el anillo subapical de parches de actina es muy similar a la velocidad de difusión de SynA a lo largo de la membrana plasmática. Así, la proteína se localiza en la membrana del ápice y en el *Spitzenkörper* (panel B, figura R.23).

La doble sustitución V40A y M43A [204], que deshabilita una región requerida para la endocitosis de SynA, permite concluir que cuando no hay internalización o la velocidad de internalización es mucho menor a la velocidad de difusión, la proteína se localiza despolarizada a lo largo de la membrana, a diferencia de lo que ocurre en el silvestre (panel A, figura R.23).

Por último, se estudió qué ocurre cuando la velocidad de internalización es mayor a la velocidad de difusión. Roxanne *et al.* [205], habían descrito con anterioridad la importancia de la fosforilación de MyoA, la única miosina de clase I presente en el hongo, implicada en la endocitosis. Mediante una sustitución fosfomimética de la serina 371 de MyoA por un glutamato, obtuvieron una cepa en la que la endocitosis era hiperactiva. Se cruzó una cepa portadora del alelo *gfp::synA* (expresado bajo el promotor de *synA*), con una cepa *myoA<sup>S371E</sup>*. Se obtuvieron estirpes *gfp::synA myoA<sup>S371E</sup>*, seleccionándose por PCR y secuenciación *myoA<sup>S371E</sup>*, y *synA::gfp* por microscopía. El análisis al microscopio mostró que SynA se localiza también en el *Spitzenkörper*. En cambio, se localiza en un tramo más estrecho de la membrana plasmática debido a que su difusión es menor en ella a causa del incremento en la endocitosis, que la captura antes. Además, hay un incremento de estructuras citoplasmáticas a lo largo de toda la hifa, en relación con el silvestre (panel C, punto 1, figura R.23). Para reflejar estas observaciones, se decidió examinar las diferencias en la intensidad de fluorescencia del SynA localizado en la zona apical. Para ello, se analizaron 15 hifas en las condiciones silvestre y mutante, en las que se midió la intensidad de fluorescencia a lo largo de una línea de 5 micras trazada a partir del ápice. Con los datos de fluorescencia recogidos, se determinó la pendiente que se obtenía en cada caso (panel C, punto 2, figura R.23) y se demostró que existen diferencias significativas entre las pendientes obtenidas en el silvestre y en el mutante (panel C, punto 3, figura R.23). La fluorescencia es mucho más intensa en los ápices de la cepa mutante,

## Resultados

con un pico de fluorescencia en el extremo del ápice que decae de forma más abrupta conforme se avanza hacia la base de la hifa.

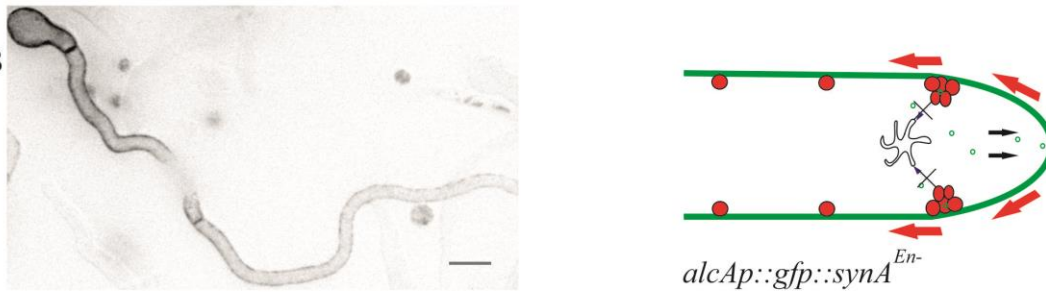
Todos estos datos validan extensamente el uso de SynA como marcador para diagnosticar el funcionamiento de la endocitosis. Debido a ello, se estudió la localización de GFP::SynA en distintos mutantes descritos como defectivos en el proceso de endocitosis. Para ello, se cruzaron los mutantes que se presentan a continuación con una estirpe portadora del alelo *gfp::synA*, regulado por el promotor *synA*, cuya presencia se comprobó por microscopía. El fenotipo de los distintos alelos que provocan el déficit en la endocitosis se explica en cada caso concreto. Además, cada análisis se realizó en condiciones ácidas y alcalinas, para comprobar si el pH afectaba a la localización de SynA.

Resultados

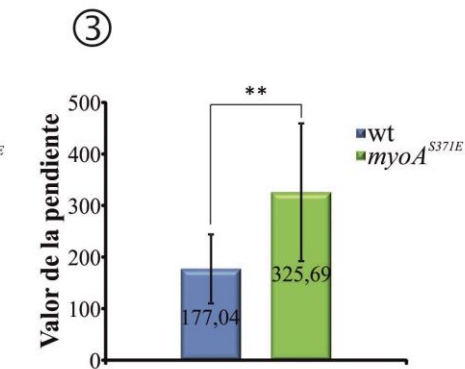
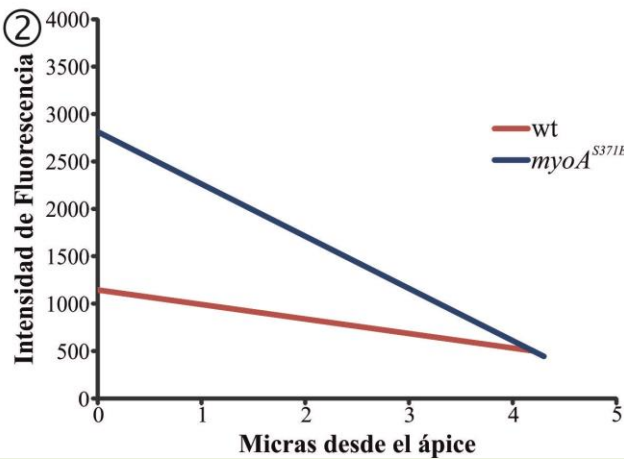
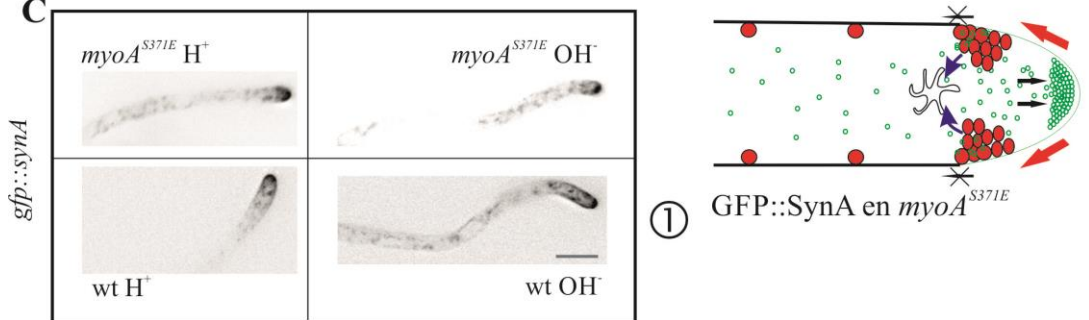
A



B

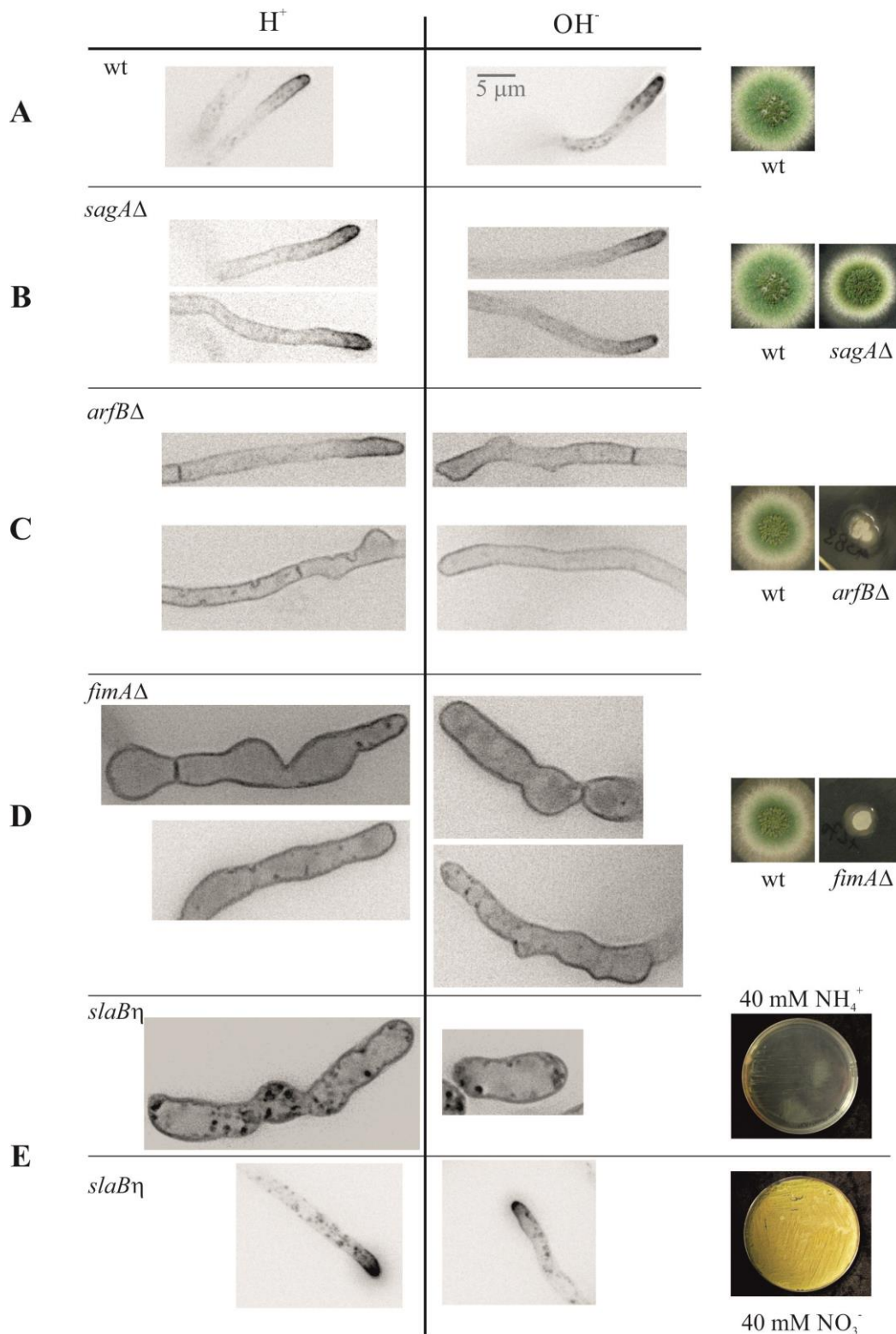


C



**Figura R.23- SynA es un excelente reportero de la endocitosis.** A.-Localización subcelular de SynA en una estirpe silvestre. La estirpe se creció con en WMM con un pH ajustado a 5.2, durante 14 h a 25°C. B.-Localización subcelular en el mutante SynA<sup>V40A, M43A</sup>. La estirpe se creció con 0.1% fructosa en WMM con un pH ajustado a 5.2, durante 14 h a 25°C. B.-Localización de SynA::GFP en condiciones fisiológicas normales. La cepa se creció en WMM ácido (pH 5.2), durante 14 h y a 25°C. C.- Análisis de SynA en un fondo MyoA<sup>S371E</sup>. C.1-Localización subcelular de SynA en un fondo MyoA<sup>S371E</sup>. La cepa se creció en WMM ácido (pH 5.2), durante 14 h y a 25°C. C.2 y C.3-Análisis estadístico que demuestra el aumento de fluorescencia en el ápice de las hifas MyoA<sup>S371E</sup>. Se estudió la fintensidad de florescencia de los ápices de 15 hifas y se calculó la pendiente. Posteriormente, se realizó una ANOVA (p<<0.01) para demostrar que existen diferencias significativas entre las fluorescencias apicales del silvestre y el mutante.

Resultados



**Figura R.24-La localización de SynA en los distintos mutantes deficientes en la endocitosis. A.-** Cepa silvestre. **B.-** Cepa *sagA*Δ. **C.-** Estirpe *arfB*Δ. **D.-** Estirpe *fimA*Δ. **E.-** Cepa *niiA::slaB* (*slaB*η). El modelo esta formado por un discriminador, un transductor y un amplificador. El transductor se encarga de acoplar al discriminador y al amplificador. Todo ello desencadena una respuesta celular específica. Todas las cepas se crecieron en WMM a pH ácido (5.2) y suplementado con glucosa y amonio, a 25°C durante 14 horas. Para *slaB* se utilizó 20 mM de sulfato de amonio para obtener condiciones represoras y 20 mM de nitrato de sodio para condiciones inductoras del promotor *niiA*.

#### **4.6.2.A-Análisis de la endocitosis en *sagA*Δ**

SagA es una proteína cuyo homólogo en *S. cerevisiae* es End3. End3, que contiene un dominio EH (Eps15-Homology Domain) [206], participa en el proceso de endocitosis y en la polimerización de actina a ella asociada, a través de la interacción con las proteínas Sla1p y Pan1p del módulo de la cubierta de la vesícula endocítica [164] (véase figura I.8, panel A de la introducción).

Se procedió a examinar el efecto de *sagA*Δ sobre la endocitosis mediante el estudio de la localización de SynA. Las estirpes del cruce con *gfp::synA* que eran portadoras de *sagA*Δ se seleccionaron por PCR, ya que el tamaño de las colonias no difirió mucho de la estirpe silvestre (panel B, figura R.24). Como corresponde al efecto leve del alelo mutante sobre el crecimiento vegetativo, la localización de SynA está poco alterada en el mutante (panel B, figura R.24). Sin embargo, aunque SynA está polarizado en la zona apical, también se visualiza a lo largo de la membrana con facilidad, a diferencia de lo que sucede en el silvestre. La alcalinización del medio no afectó a la localización de SynA.

#### **4.6.2.B-Análisis de la endocitosis en *arfB*Δ**

ArfB es una GTPasa monomérica perteneciente a la familia Arf (*ADP Ribosylation Factor*). Las Arf se encargan de regular el tráfico intracelular y de nuclear la biogénesis de las vesículas de clatrina en la membrana plasmática y en el Golgi [207,208]. Su ortólogo en *S. cerevisiae* es Arf3p, que como ArfB de *A. nidulans* juega un papel importante en la endocitosis [207]. En este caso, *arfB*Δ afecta al crecimiento del hongo como resultado del déficit endocítico, lo que permitió discriminar fácilmente en el cruce con el *gfp::synA*, las cepas portadoras del alelo disrupto (figura R.24, panel C).

Por microscopía de epifluorescencia se determinó que *arfB*Δ afecta a la localización de SynA, que se localiza casi exclusivamente a lo largo de la membrana plasmática. La alcalinización del medio no afectó a su distribución. Este mutante presenta un déficit en el mantenimiento de la polaridad lo que se traduce en un menor crecimiento hifal (panel C, figura R.24).

#### **4.6.2.C-La endocitosis en *fimA*Δ**

La fimbrina, cuya función es entrelazar filamentos de F-actina, está conservada desde hongos a humanos. Como sus ortólogos, FimA, la fimbrina de *Aspergillus nidulans*, juega un

## Resultados

papel importante en la endocitosis [171]. Como consecuencia, tiene un rol importante en el establecimiento de la polaridad. Su homólogo en *Saccharomyces*, Sac6p, forma parte del “módulo de actina” descrito por Kaksonen *et al.* [164], cuyas proteínas se ensamblan en una red de filamentos de actina con forma cónica que permite la internalización rápida de la vesícula endocítica en formación. Sac6p, así como las demás proteínas pertenecientes a este módulo, dependen de la F-actina para su localización. Para estudiar el papel de FimA en la endocitosis, Upadhyay y colaboradores [171], generaron un alelo nulo para *fimA*, mediante la disrupción del gen con un transposón que contenía el *pyr-4* de *N. crassa* y que se insertó a 341 pb del codón de iniciación. El mutante *fimA*Δ, por su déficit en la endocitosis, afecta notablemente al crecimiento en placa de *A. nidulans*, lo que permitió seleccionar fácilmente las estirpes portadoras del alelo disrupto en el cruce con *gfp::synA* (panel D, figura R.24).

Como en los mutantes anteriores, se estudió el funcionamiento de la endocitosis mediante la observación de SynA, la cual se localizó casi exclusivamente en la membrana plasmática, a diferencia de lo que ocurre en el silvestre (pese a que este mutante presenta anomalías morfogénicas, es capaz de mantener la polaridad). Finalmente, la localización de SynA en células *fimA*Δ fue independiente del pH ambiental (panel D, figura R.24).

### **4.6.2.D-La endocitosis en el mutante regulable de *slaB***

SlaB es una proteína de unión a F-actina y uno de los reguladores clave de la maquinaria endocítica durante la internalización. Su ortólogo en *Saccharomyces cerevisiae* es Sla2p [170]. Según Kaksonen *et al.* [164], Sla2p es una de las proteínas que forman el “módulo de la cubierta” que regula la polimerización de actina durante la internalización de la vesícula endocítica en formación. En *S. cerevisiae*, *sla2*Δ es inviable en ciertos fondos genéticos. Anteriormente, nuestro laboratorio había demostrado que SlaB es esencial en *A. nidulans*. Para inactivar su función, se había construido un alelo, *slaB*η, para su expresión condicional regulada bajo el control del promotor de la nitrato reductasa (*niiAp*), inducible por nitrato y reprimible por amonio (figura R.24, panel E) [170].

Para diagnosticar el grado de funcionamiento de la endocitosis se estudió la localización subcelular de SynA (panel E, figura R.24). Se obtuvieron estirpes mediante recombinación meiótica, que contenían una copia del alelo *slaB*η y el alelo *gfp::synA*. Se seleccionaron aquellas que no crecían en presencia de amonio como fuente de nitrógeno y que contenían GFP::SynA. La localización subcelular de SynA varía drásticamente en el mutante germinado en amonio, en el que se observó exclusivamente en la membrana plasmática. Además, en las condiciones en las que se realizó el ensayo, muy restrictivas, las hifas podían establecer polaridad pero no mantenerla normalmente, lo que les confería un aspecto levaduriforme al

## Resultados

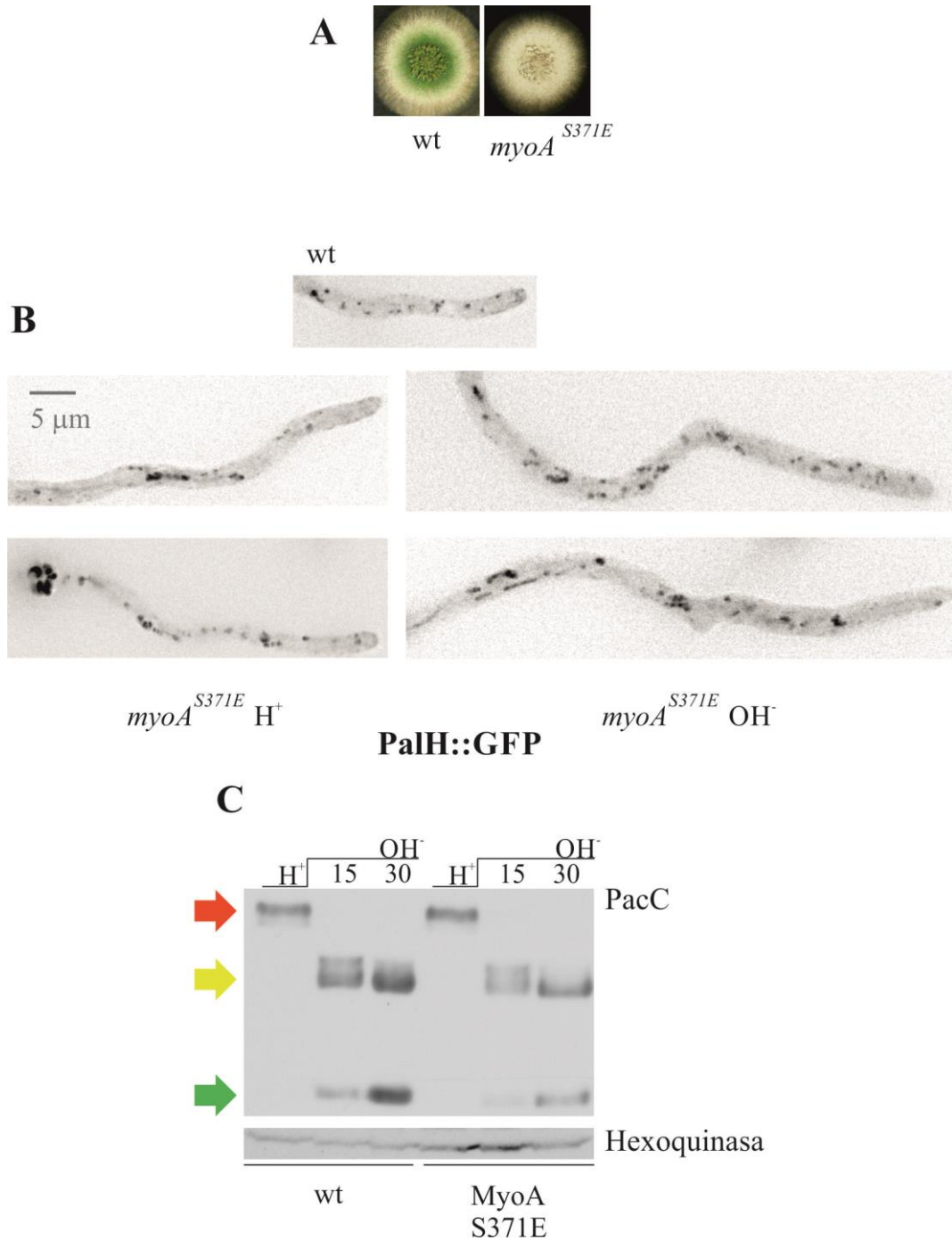
microscopio, observándose en muchos casos invaginaciones de la membrana provocadas probablemente por el exceso de F-actina debido al déficit de SlaB [170], como ocurre en células *sla2Δ* de *S. cerevisiae* [209]. Se comprobó que la alcalinización del pH del medio no altera la localización de SynA. Estos datos permiten afirmar que, en condiciones restrictivas, la endocitosis es completamente deficiente en *slaBη*.

### 4.6.3-Análisis de la activación de la ruta en el fondo mutante *myoA*<sup>S371E</sup>

Se ha descrito antes el efecto de la hiperactivación de la endocitosis causado por la mutación *myoA*<sup>S371E</sup>. Si la activación de la señalización dependiera de la endocitosis, la hiperactivación de ésta podría tener un efecto positivo e independiente del pH en la activación de la ruta. Para juzgar esta hipótesis, por un lado se analizó la localización del receptor PalH en el fondo *myoA*<sup>S371E</sup> (panel B, figura R.25). Como en los casos anteriores, se obtuvieron cepas con el alelo *myoA*<sup>S371E</sup> y el transgén para la sobreexpresión de *palH::gfp*. PalH::GFP se localizó en el sistema endovacuolar y no fue patente en la membrana del ápice ya a pH ácido, a diferencia de lo que ocurre en el silvestre. La alcalinización no cambió el patrón de localización del receptor.

Se estudió entonces el procesamiento de PacC de una cepa portadora del alelo *myoA*<sup>S371E</sup> y *pacC900*, en un ensayo de respuesta a pH alcalino (panel C, figura R.25). El procesamiento del factor de transcripción tampoco se alteró y no se observaron niveles detectables de PacC<sup>27</sup> a pH ácido, lo que implica que la hiperactividad de la endocitosis no causa una activación de la ruta de señalización por pH.

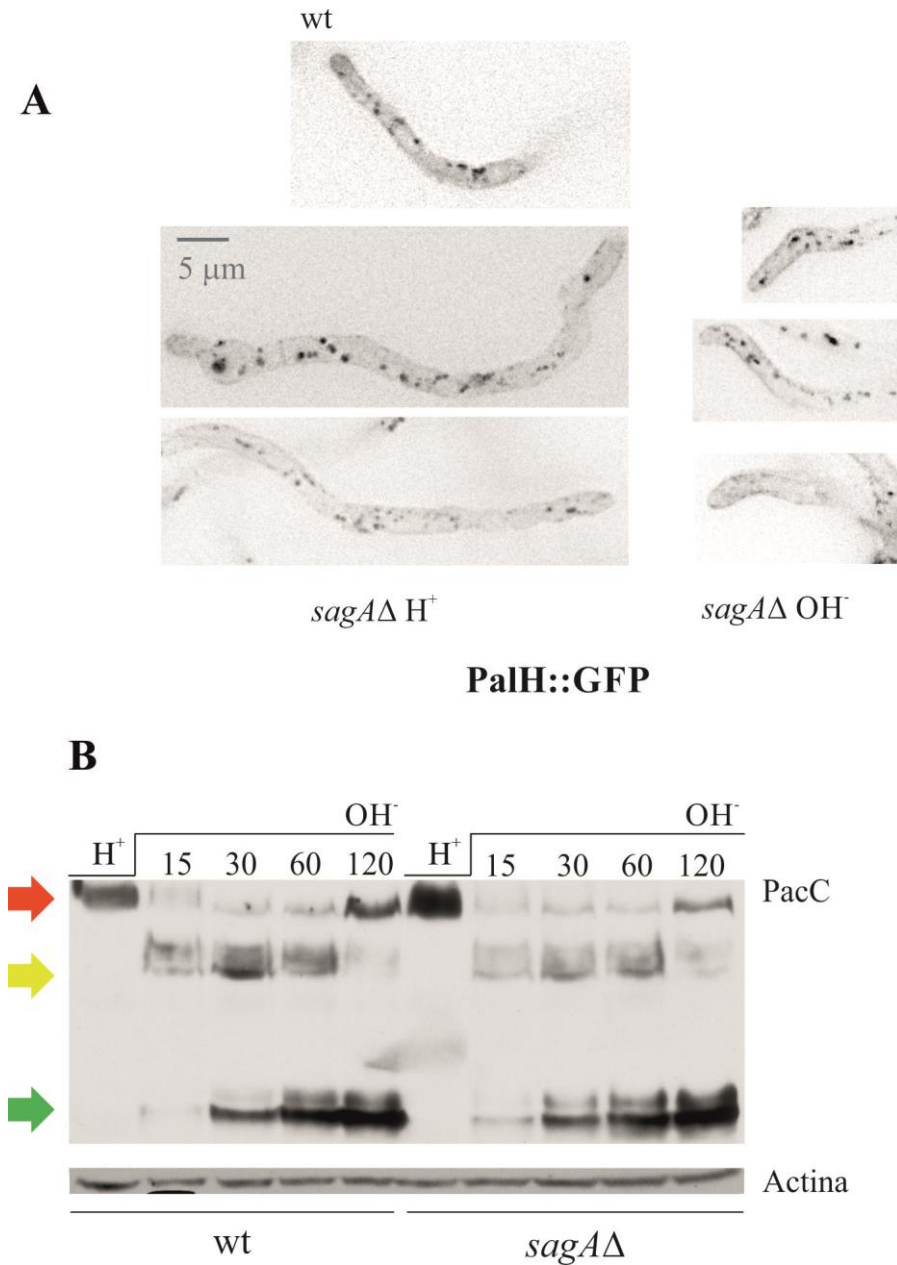
Resultados



**Figura R.25-Análisis de la activación de la señalización en el mutante hiperactivo MyoA<sup>S371E</sup>.** **A.-** Crecimiento del mutante en placa. Las estirpes se sembraron en placas de medio mínimo suplementado y se crecieron a 37°C, durante 48 h. **B.-** Análisis de la distribución subcelular de PalH. Las estirpes se crecieron en WMM ajustado a pH ácido (5.2), durante 14 h y a 25°C. Posteriormente, se cambió el medio por uno ajustado a pH neutro (7.1). **C.-** Procesamiento de PacC en un la estirpe MyoA<sup>S371E</sup>. Las cepas se crecieron en medio mínimo líquido con un pH de 4.3 (ajustado con 50 mM citrato de sodio), durante 15 h y a 30°C. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). Se utilizó la actina como control de carga en los *western blots*.

#### 4.6.4-Análisis de la activación de la ruta en un fondo mutante *sagAΔ*

Una vez comprobado el estado de la endocitosis mediante el análisis de SynA en el mutante *sagAΔ* se estudió la localización subcelular de PalH (figura R.26, panel A), tras obtener en un cruce estirpes *sagAΔ* PalH::GFP.



**Figura R.26-Análisis de la activación de la ruta en el mutante nulo para SagA.** **A.-** Análisis de la distribución subcelular de PalH en el mutante *sagAΔ*. Las estirpes se crecieron en WMM ajustado a pH ácido (5.2), durante 14 h y a 25°C. Posteriormente, se cambió el medio por uno ajustado a pH neutro (7.1). **B.-** Procesamiento de PacC en un fondo nulo para SagA. Las cepas se crecieron en medio mínimo líquido con un pH de 4.3 (ajustado con 50 mM citrato de sodio), durante 15 h y a 30°C. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). Se utilizó la actina como control de carga en los *western blots*.

## Resultados

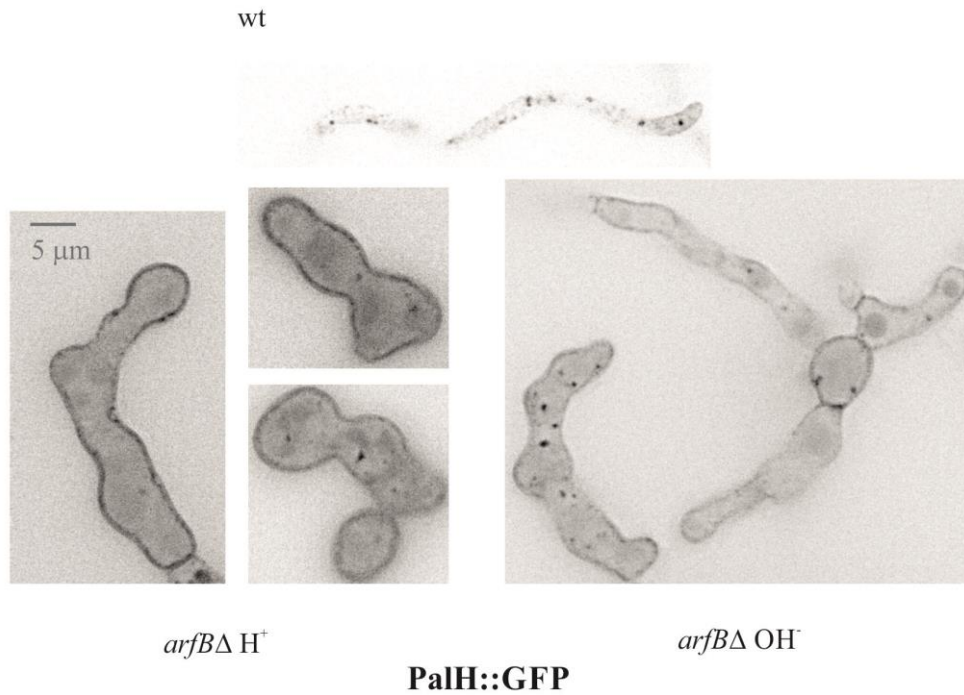
PalH se localizó preferentemente en el sistema endovacuolar, asemejándose mucho a la estirpe silvestre. Sin embargo, a pH ácido también se localizó a lo largo la membrana plasmática, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre. Además, la alcalinización del medio sí cambió la localización en membrana plasmática y sólo se distribuyó en los ápices desde el cambio de pH.

Se estudió entonces el procesamiento de PacC (figura R.26, panel B). Mediante un cruce se obtuvieron cepas *sagAΔ, pacC900*. Al contrario que el ensayo de endocitosis, el ensayo de respuesta a pH alcalino no mostró alteraciones en el procesamiento de PacC.

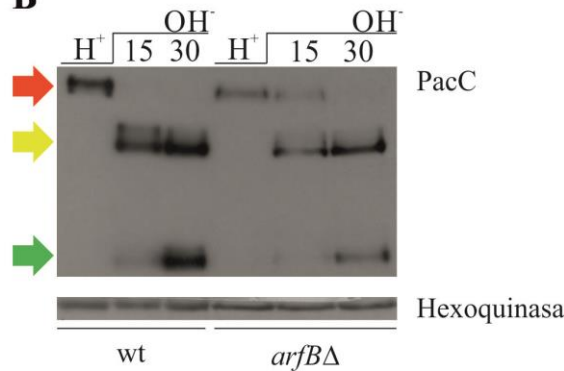
### **4.6.5-La Activación de la ruta en el mutante *arfBΔ***

El mutante *arfBΔ* previene notablemente la endocitosis. Para estudiar como influía ese hecho sobre la localización de PalH, se realizó el mismo tipo de estudio con PalH::GFP, previa obtención en un cruce de estirpes portadoras del alelo *arfBΔ* y el transgén para la sobreexpresión de PalH::GFP. Tal y como ocurrió con SynA, PalH se localizó casi exclusivamente en la membrana plasmática. La alcalinización del medio no alteró su localización (panel A, figura R.27). Se estudió la activación proteolítica de PacC en una estirpe *pacC900, ΔarfB* (panel B, figura R.27). Los experimentos de respuesta a pH alcalino mostraron que el procesamiento es esencialmente indistinguible al del silvestre.

**A**



**B**



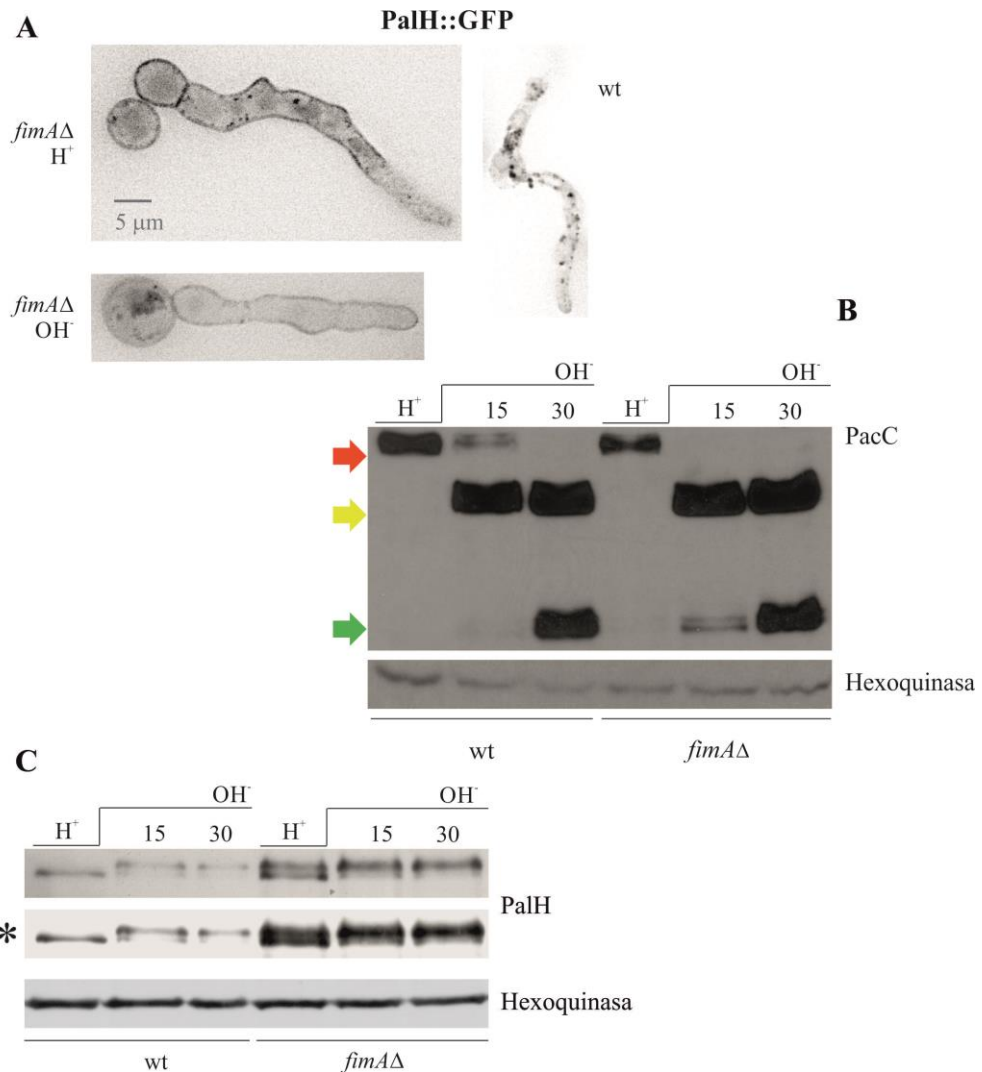
**Figura R.27-Análisis de la activación de la ruta en el mutante nulo para ArfB.** **A.-** Análisis de la distribución subcelular de PalH en el mutante  $\Delta arfB$ . Las estirpes se crecieron en WMM ajustado a pH ácido (5.2), durante 14 h y a 25°C. Posteriormente, se cambió el medio por uno ajustado a pH neutro (7.1). **B.-** Procesamiento de PacC en un fondo nulo para ArfB. Las cepas se crecieron en medio mínimo líquido con un pH de 4.3 (ajustado con 50 mM citrato de sodio), durante 15 h y a 30°C. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). Se utilizó la actina como control de carga en los *western blots*.

#### 4.6.6-Análisis de la activación de la ruta en el mutante *fimAΔ*

Como se ha visto con anterioridad, la endocitosis es muy deficiente en un mutante *fimAΔ*. Para examinar como este hecho afecta a la localización de PalH, se obtuvieron por recombinación meiótica cepas *fimAΔ* con el transgén para la sobreexpresión de PalH::GFP. Al igual que se observó con SynA y a diferencia de lo que sucede en el silvestre, PalH se localizó

## Resultados

casi exclusivamente en la membrana plasmática, tanto a pH ácido como alcalino (panel A, figura R.28).



**Figura R.28-Análisis de la activación de la ruta en el mutante nulo para FimA.** A.- Análisis de la distribución subcelular de PalH en el mutante  $\Delta fimA$ . Las estirpes se crecieron en WMM ajustado a pH ácido (5.2), durante 14 h y a 25°C. Posteriormente, se cambió el medio por uno ajustado a pH neutro (7.1). B.- Procesamiento de PacC en un fondo nulo para FimA. Las cepas se crecieron en medio mínimo líquido con un pH de 4.3 (ajustado con 50 mM citrato de sodio), durante 15 h y a 30°C. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). C.- Niveles de PalH en un fondo  $\Delta fimA$ . Las cepas se crecieron en medio mínimo líquido con un pH de 4.3 (ajustado con 50 mM citrato de sodio), durante 15 h y a 30°C. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). En todos los *western blots* se utilizó la actina como control de carga.

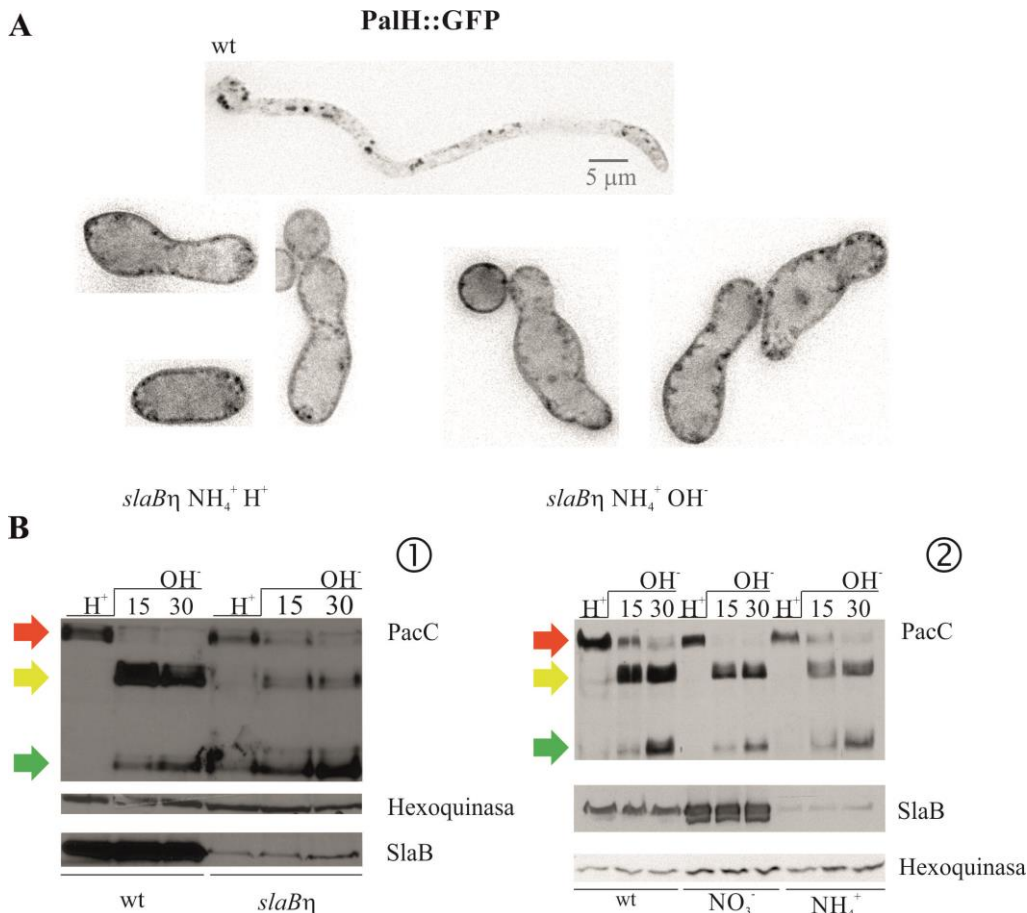
Una vez comprobado el déficit endocítico resultante de *fimAΔ*, se analizó su efecto sobre el procesamiento de PacC y los niveles de PalH, para lo que se obtuvieron cepas triples mutantes *fimAΔ*, *pacC900* y *palH::ha3*. En un experimento de respuesta a pH alcalino, se observó que el procesamiento es esencialmente idéntico al de la cepa silvestre (figura R.28, panel B), lo que permite concluir que la activación de la ruta no está afectada por el déficit en la endocitosis. En cambio, los niveles de PalH son claramente más altos en la cepa *fimAΔ* y

## Resultados

además, se detecta fosforilado PalH a pH ácido, a diferencia del silvestre (panel C, figura R.28). Estos datos serían compatibles con que la fosforilación del receptor fuese una señal para su internalización y degradación vía endocitosis, de manera que al no poder proceder ésta, se acumulara la forma fosforilada que de otra manera es indetectable en condiciones ácidas.

### 4.6.7-La activación de la ruta en el mutante *slaB*

Como se ha visto con el análisis de la localización de SynA (apartado 4.6.2.4), la endocitosis está altamente afectada en el mutante condicional *slaB $\eta$*  cuando se cultiva en amonio. Para comprobar cómo afecta el déficit en endocitosis a la localización de PalH, se obtuvieron estirpes portadoras de *slaB $\eta$*  y el transgén para la sobreexpresión de PalH::GFP. Se realizó un estudio idéntico al de SynA, en el que PalH se observó exclusivamente en la membrana plasmática, tanto a pH ácido como alcalino (panel A, figura R.29).



**Figura R.22-Análisis de la activación de la ruta en el mutante condicional SlaB. A.-** Estudio de la localización de PalH::GFP en el mutante *slaB*. Las estirpes se crecieron durante 14 h y a 25°C, en WMM que contenía, esta vez, 40 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y tenía el pH ajustado a 5.2. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió WMM ajustado a pH 7.1 y al que se le había añadido 40 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **B.-** Ensayos de procesamiento de PacC que muestran que la proteólisis no está impedida. Las cepas se cultivaron en medio mínimo y condiciones normales, condiciones restrictivas (40 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o condiciones permisivas (40 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

## Resultados

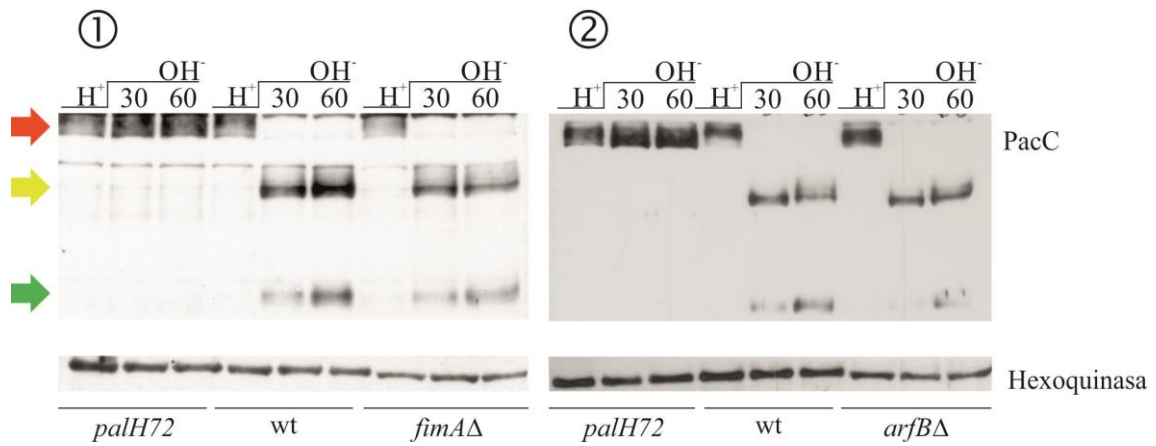
Para estudiar la activación de PacC, se obtuvieron cepas *slaBη*, *pacC900* por recombinación meiótica (panel B, figura R.29). Con ellas, se realizaron diversos ensayos de respuesta a pH alcalino en los que se observó, por un lado, que el procesamiento es prácticamente igual al de la cepa silvestre en una estirpe donde el grado de represión de SlaB fue muy marcado (*western 1*, panel B, figura R.29). Por otra parte, la sobreexpresión notable de SlaB por inducción con  $\text{NO}_3^-$  tampoco alteró el procesamiento (*western 2*, panel B, figura R.29). En todos los casos, se utilizó la hexoquinasa como control de carga, debido a que los niveles de actina están alterados por la regulación por parte de SlaB. Todos estos datos permiten concluir que la señalización por la ruta de pH procede normalmente incluso en condiciones de ausencia de endocitosis resultantes del déficit completo de SlaB.

### **4.6.8-La ruta es activa en ausencia de endocitosis pero no en ausencia del receptor PalH**

Para recapitular los datos que implican que la endocitosis no tiene ningún efecto sobre la activación de PacC, se llevó a cabo un experimento de respuesta a pH alcalino en el que se comparó dos cepas deficientes en endocitosis, *fimAΔ* y *arfBΔ*, un silvestre y una cepa nula para PalH (figura R.30, panel A, puntos.1 y 2). El procesamiento fue igual al silvestre en las cepas deficientes en endocitosis, pero está bloqueado en la cepa nula para PalH, lo que indica que la endocitosis no afecta a la activación de la ruta.

## Resultados

A



**Figura R.30-PalH es necesario para la señalización pero la endocitosis no.** A.- Ensayos de respuesta a pH alcalino en el que se muestra el grado de afectación del procesamiento de PacC en las distintas cepas. Las estirpes, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). 1-Procesamiento de PacC comparado en un fondo *fimAΔ*. 2-Procesamiento de PacC comparado en un fondo *arfBΔ*.

## 4-RESULTADOS-CAPÍTULO II

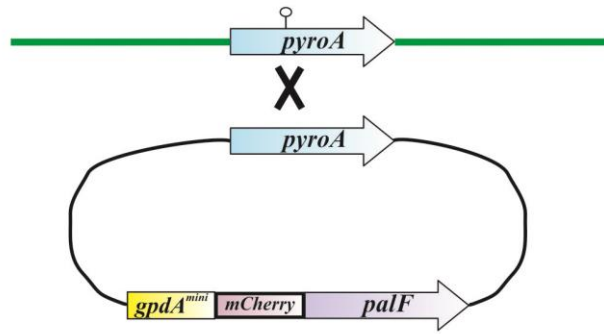
### 4.7-ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PalF

PalF es la proteína asociada a PalH similar a  $\beta$ -arrestina, al que reconoce el receptor por dos sitios de unión localizados en su cola citosólica. La ubiquitinación de PalF, que es dependiente de pH y PalH, es la clave para la activación de la ruta. En este trabajo y en anteriores, se había estudiado la localización subcelular tanto de PalH como de PalI [13], pero no se había realizado ningún análisis de la localización de PalF. Debido a ello, se realizaron 4 construcciones distintas para la integración en el locus *pyroA*, que permitieran estudiar su localización, tanto sólo como junto con las otras proteínas del complejo sensor. Todas las construcciones se basaban en el cDNA de PalF regulado bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*, el cual permitía niveles de expresión moderadamente altos de la arrestina. Se utilizaron los etiquetados de GFP y mCherry, que se probaron tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal. Se transformaron en una cepa con fondo genético *palF15*, alelo funcionalmente nulo para PalF que trunca la proteína tras el residuo 188, lo que permitió realizar el cribado de los transformantes con la integración, mediante su crecimiento en placas de pH 8.3. Los transformantes, en cualquier caso, se genotiparon por *Southern blot*.

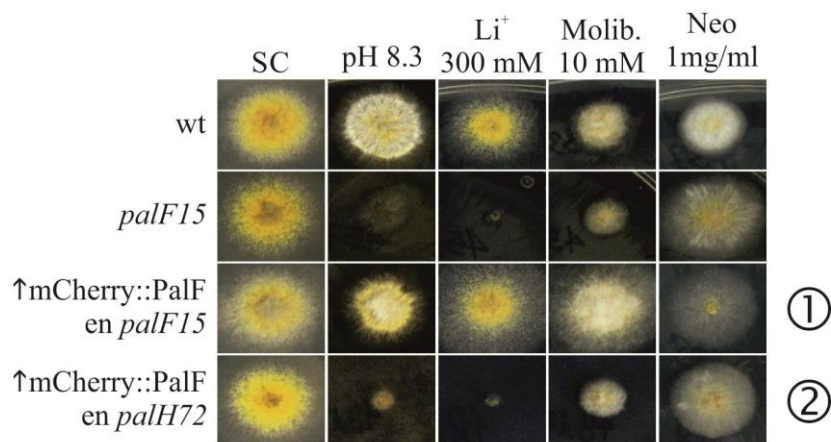
Con los transformantes genotipados, se comprobó la fluorescencia resultante de cada transgén. Se observó, que el marcaje que mejor funcionaba era el del N-terminal de la proteína, tanto para GFP como para mCherry, ya que había mayor fluorescencia respecto al marcaje en C-terminal. Se decidió utilizar el marcaje con mCherry a partir de entonces (figura R.31, panel A), ya que por un lado era suficientemente brillante y por otro, permitiría realizar estudios de co-localización con las proteínas ya marcadas con GFP. Se realizaron tests fenotípicos de crecimiento en placa con las estirpes que sobreexpresaban mCherry::PalF y se vio que todas ellas eran capaces de complementar la mutación *palF15* (fila 1, panel B, figura R.31).

Por último, se estudió la localización subcelular de PalF (figura R.31, panel C, línea 1). Para ello, se cultivó, en medio a pH ácido, la cepa que contenía el transgén que codifica para mCherry::PalF. La proteína de fusión se localizó en el citosol, pero también es patente a lo largo de la membrana plasmática. El cambio de medio a pH alcalino no alteró su distribución en ningún momento.

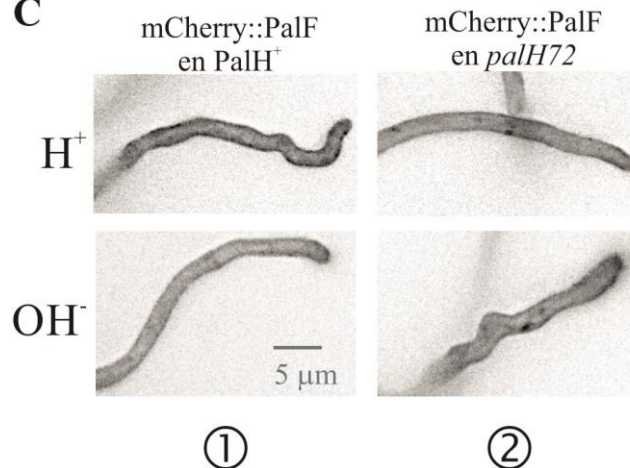
A



B



C



**Figura R.31-PalF se localiza en membrana sin necesidad de PalH.** A.- Representación esquemática del marcaje con mCherry en la región amino terminal de PalF. B.- Análisis fenotípico de las distintas estirpes (1 y 2) con el transgén para la sobreexpresión de mCherry::PalF. Las cepas se crecieron en MMA suplementado con glucosa, amonio y los requerimientos específicos de cada estirpe. (Li=litio; Molib=molibdato de sodio; Neo=sulfato de neomicina). C.- Estudio de la localización subcelular de mCherry::PalF en un fondo *palH<sup>+</sup>* y *palH72*. Las cepas se crecieron durante 14 h en WMM ácido (5.2) y a 25°C. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió WMM ajustado a pH 7.1. B.2-Tests fenotípicos en placa de las cepas mCherry::PalF. Las estirpes se crecieron en placas de medio mínimo con los compuestos indicados, durante 48 h a 37°C.

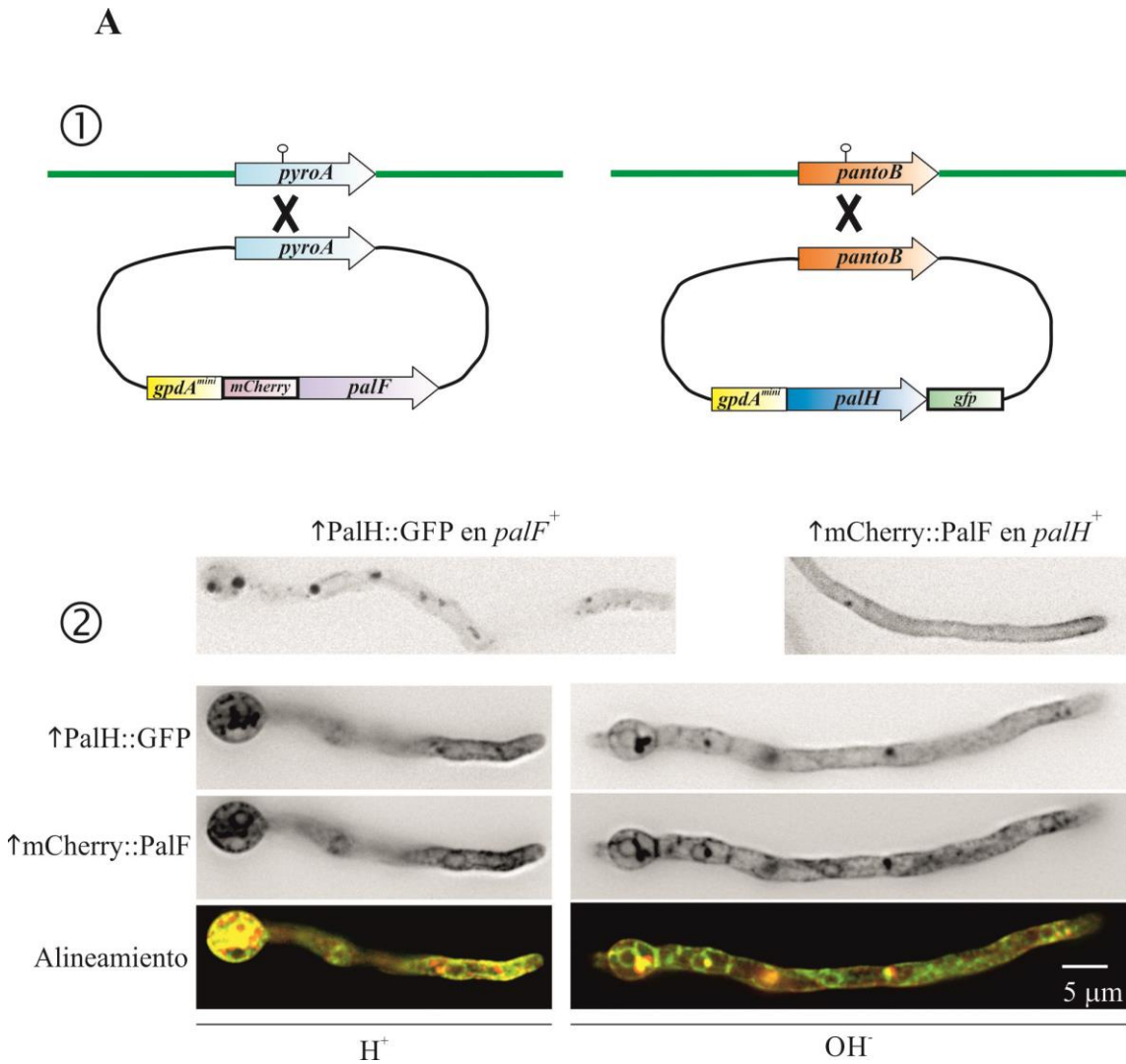
#### 4.7.1-PalF se reparte entre el citosol y la membrana plasmática

Como se ha visto en el apartado anterior, PalF tiene capacidad de reclutarse a la membrana plasmática. Para comprobar si este reclutamiento es dependiente de PalH, se introdujo el transgén mCherry::PalF en una cepa *palH72*.

Incluso en ausencia de PalH, se visualizó PalF en la membrana (figura R.31, panel C, punto 2), aunque, como en el caso anterior, una parte considerable está en el citosol. Hay que destacar que este resultado, junto al del punto anterior, representa la primera descripción de que una arrestina tiene la capacidad de reclutarse a la membrana de manera independiente de su receptor activado [210]. Esta localización similar de PalF independientemente de la presencia o ausencia de PalH es en cierto modo esperable dado que al sobreexpresar la arrestina, ésta debe de estar en exceso sobre PalH, lo que en la práctica convierte la condición *palH*<sup>+</sup> en deficiente para PalH. Estos experimentos, por tanto, no contestan a si PalH participa en el reclutamiento de PalF a la membrana plasmática aumentando su eficiencia, lo que es objeto de estudio en el siguiente punto.

#### 4.7.2-PalH también mejora la localización de PalF en la membrana

Dado que la localización de PalF en la membrana plasmática era poco robusta y que en estudios anteriores [13,20] se había demostrado que mediante la sobreexpresión de PalF, PalH sobreexpresado, que tiene gran tendencia a endocitarse (ver punto 4.6.1), se relocaliza mayoritariamente en la membrana plasmática, se estudió si PalH también mejora la localización relativamente ineficiente de PalF en la membrana de la célula cuando se co-sobreexpresan juntas. Por ello, previamente se generaron estirpes con el transgén *gpdA<sup>mini</sup>::palH::gfp* integrado en el locus *pantoB* (en el apartado 4.4 y derivados, la integración de esa construcción está hecha en el locus *pyroA*). Los transformantes se genotiparon por *Southern blot* y se comprobó que el comportamiento de la proteína PalH-GFP al microscopio era igual al que se había observado con anterioridad. Posteriormente, se obtuvieron mediante cruzamiento, estirpes con los transgenes *gpdA<sup>mini</sup>::mcherry::palF* en *pyroA* y *gpdA<sup>mini</sup>::palH::gfp* en *pantoB* (figura R.32, panel A, punto 1). Con ellas se vio que PalH se redistribuye del sistema endovacuolar a la membrana plasmática, como ya se había descrito. Asimismo, PalF se recluta más eficientemente a la membrana plasmática.



**Figura R.32-PalH y PalF cooperan mutuamente para localizarse en la membrana plasmática. A.-** Representación esquemática de los transgenes utilizados para co-sobreexpresar PalH::GFP y mCherry::PalF (1). Estudio de la distribución subcelular de mCherry::PalF y PalH::GFP (2). Las cepas se cultivaron durante 14 h y a 25°C, en WMM ácido (5.2). Posteriormente, se cambió el medio por WMM ajustado a pH neutro (7.1).

Además, ambas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico (ER, siglas del inglés *Endoplasmic Reticulum*), hecho que no se observa en las cepas con los transgenes por separado y que muy probablemente es debido a que la sobreexpresión de ambas proteínas provoca que PalF se una a PalH en el ER y bloquee las señales de salida del retículo (figura R.32, panel A, punto 2). Este resultado, permite concluir que PalH y PalF cooperan para mejorar su presencia en la membrana plasmática.

### 4.7.3-El redireccionamiento de PalF a la membrana plasmática es capaz de activar la señalización de forma constitutiva

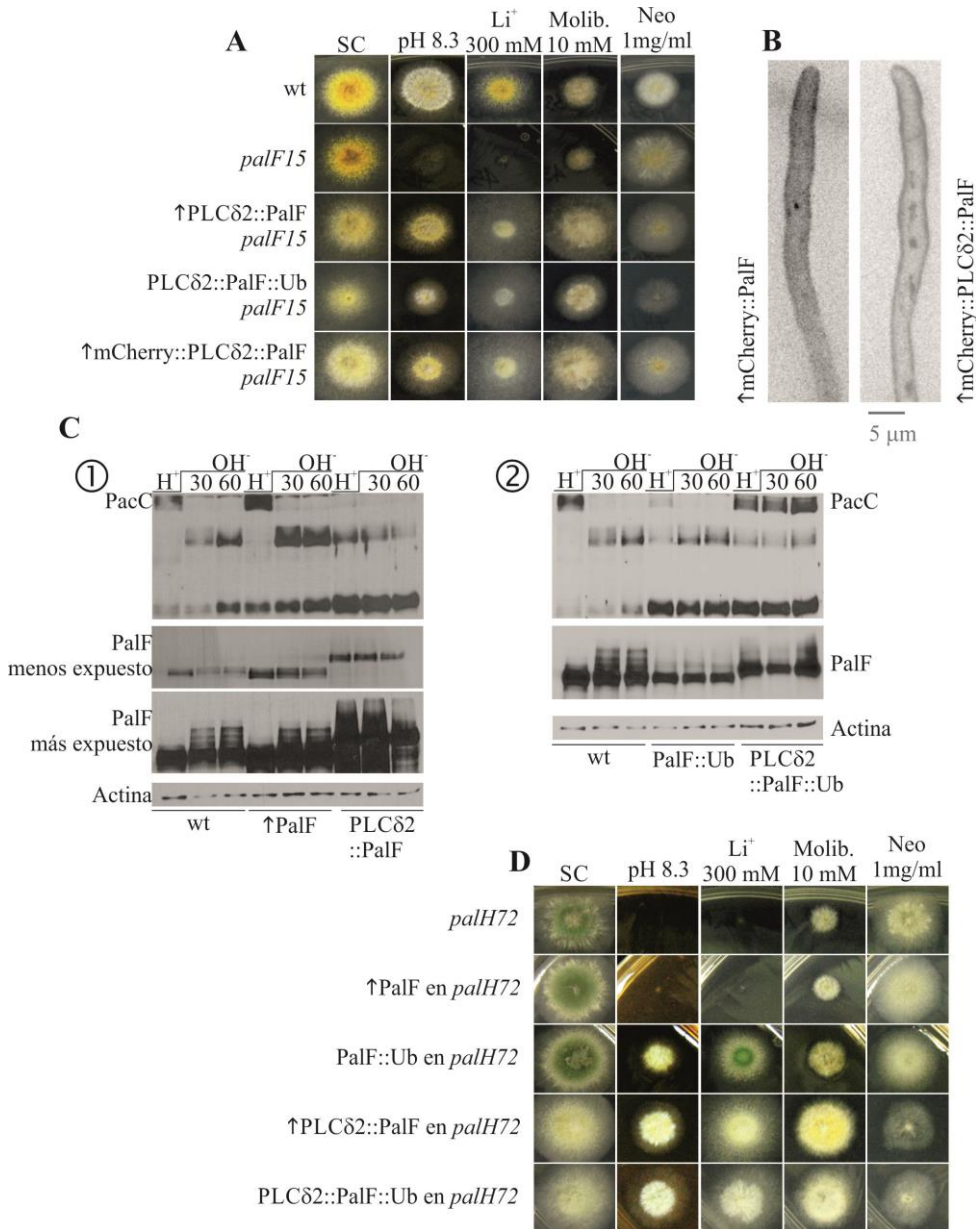
Como se ha visto en los puntos anteriores, PalF se recluta *per se* a la membrana plasmática aunque esta localización es parcial y mejora cuando se co-sobreexpresa con PalH. Ya se estudió en el apartado 4.3.1 que hay un aumento en los niveles de activación de PacC en condiciones ácidas, cuando se sobreexpresa PalF incluso sin ubiquitina. Se hipotetizó que la clave para que la arrestina fuera ubiquitinada y activase de este modo la ruta podría ser que PalF residiera el tiempo suficiente en la proximidad de la membrana plasmática. Por ello, se decidió generar cepas en las que PalF o PalF::Ub se reclutasen de manera robusta a la membrana plasmática mediante la fusión en su extremo N-terminal de una copia doble del dominio PH de la Fosfolipasa C  $\delta 1$  (PLC $\delta$ ) [211], que se une con alta afinidad al fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato abundante en la membrana plasmática. Con dichas cepas, se llevaron a cabo distintos tests de crecimiento en los que se comprobó que las estirpes con las proteínas de fusión a los dominios PLC $\delta$  presentan un déficit de crecimiento con respecto a las cepas que no los llevan. No obstante, los transgenes son capaces de complementar *palF15* y su crecimiento mejora en molibdato, lo cual es indicativo de la activación de la ruta (panel A, figura R.33).

En paralelo, se obtuvieron cepas con la construcción *gpdA<sup>mini</sup>::mCherry::PLC $\delta 2$ ::palF* para determinar la localización subcelular de la quimera en esas condiciones (se intentó hacer lo mismo con la construcción *gpdA<sup>mini</sup>::mCherry::PLC $\delta 2$ ::palF::ub*, pero no se obtuvieron transformantes, posiblemente debido a que la incorporación de mCherry a una proteína que ya de por sí afecta notablemente al crecimiento, era excesivamente dañina causando letalidad). A diferencia de mCherry::PalF, mCherry::PLC $\delta 2$ ::PalF se encuentra casi exclusivamente en la membrana plasmática, con muy poca presencia citosólica, lo que demuestra que los dominios PH redirigen a PalF de forma mayoritaria a la membrana (figura R.33, panel B).

A continuación se realizaron ensayos de respuesta a pH alcalino para analizar tanto el comportamiento de PacC como el de PalF (panel C, figura R.33). Se utilizaron como control las cepas silvestre, *gpdA<sup>mini</sup>::palF::ha<sub>3</sub>* y *gpdA<sup>mini</sup>::palF::ha<sub>3</sub>::ub*. La estirpe que sobreexpresa PLC $\delta 2$ ::PalF, es capaz de procesar totalmente a PacC en condiciones ácidas, a diferencia de lo que ocurre en la cepa que sobreexpresa PalF, donde el procesamiento a pH ácido es mucho menor. Además, PalF está ubiquitinado a pH ácido, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre. De la misma forma, el procesamiento de PacC en la cepa PLC $\delta 2$ ::PalF::HA<sub>3</sub>::Ub es total en condiciones ácidas. Sin embargo, presenta también PacC<sup>72</sup> tanto a pH ácido como a pH alcalino, lo que sugiere que la señalización es limitante, para lo que no tenemos explicación. Esta última cepa presenta mayores niveles de PalF::Ub que la estirpe que expresa PalF::Ub, lo

## Resultados

que sugiere que la residencia en membrana estabiliza de alguna manera a la proteína ubiquitinada.



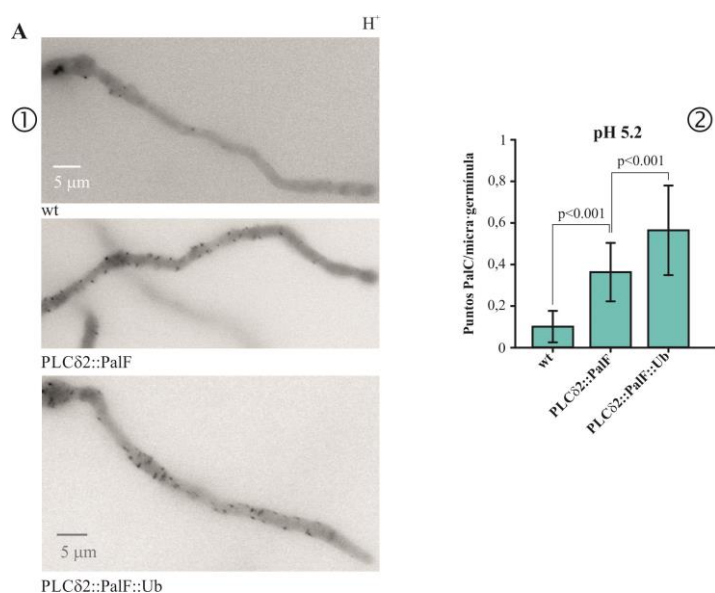
**Figura R.33-La localización en membrana de PalF es la clave para la activación de la ruta. A.-** Tests fenotípicos de crecimiento de las distintas estirpes portadoras de los transgenes de PalF con los dominios PLCδ. Las cepas se crecieron en placas de medio mínimo con los compuestos indicados, durante 48 h a 37°C. **B.-** Localización subcelular de PLCδ2::PalF. Las cepas se crecieron durante 14 h y a 25°C, en WMM ácido (5.2). **C.-** Ensayos de comprobación del procesamiento de PacC de las distintas estirpes PLCδ2::PalF. Las estirpes, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). *C.1*-Procesamiento de PacC en la cepa PLCδ2::PalF. *C.2*-Procesamiento de PacC en la cepa PLCδ2::PalF::Ub. **D.-** Tests fenotípicos que demuestran que las cepas con los dominios PH complementan el alelo nulo *palH72*. Las estirpes se crecieron en placas de medio mínimo con los compuestos indicados, durante 48 h a 37°C.

## Resultados

Finalmente, se determinó si PLC $\delta 2::$ PalF y PLC $\delta 2::$ PalF::Ub eran capaces de activar la ruta en ausencia de PalH ( en un fondo *palH72*), porque Hervás-Aguilar *et al.* [20], habían visto que la expresión de PalF::Ub pero no la sobreexpresión de PalF es capaz de eludir la necesidad de PalH para la señalización. Por ello, se cruzaron ambas estirpes PLC $\delta$  con una cepa *palH72*. Se usó el crecimiento a pH 8.3 como método discriminatorio para el examen de los descendientes del cruce. A diferencia de lo visto por Hervás y colaboradores con la sobreexpresión de PalF, la sobreexpresión de PLC $\delta 2::$ *palF::ha<sub>3</sub>* sí permite eludir la necesidad de PalH para crecer a pH alcalino, como también lo es capaz de hacer la descendencia *gpdA<sup>mini</sup>::PLC $\delta 2::$ *palF::ha<sub>3</sub>::ub* (tal y como ocurre en el caso de PalF::HA<sub>3</sub>::Ub) (panel D, figura R.33). Estos resultados demuestran que un factor clave para que se active la ruta debe ser que PalF resida asociada a la membrana plasmática el tiempo suficiente.*

### 4.7.4-La unión de PalF a la membrana plasmática provoca un aumento de los focos corticales de PalC a pH ácido

PalC es una de las proteínas de la ruta *pal* que se encuentra corriente abajo de las proteínas del complejo sensor. Su localización es mayoritariamente citosólica, pero cuando se alcaliniza el medio, se relocaliza a puntos discretos en la membrana plasmática. Hervás-Aguilar *et al.* [20], demostraron que la sobreexpresión de PalF o la expresión de PalF::Ub provoca un aumento significativo de los focos corticales de PalC a pH ácido.



**Figura R.34-Los puntos corticales de PalC aumentan en presencia de los transgenes con los dominios PH. A.1-Estudio de los puntos corticales de PalC en los distintos fondos de PalF con los dominios PH. Las cepas se cultivaron durante 14 h y a 25°C, en WMM ácido (5.2). A.2-Análisis estadístico de los puntos corticales de PalC. Se contaron los puntos de un total de 28 hifas de cada estirpe y se normalizaron por la longitud de la hifa. Posteriormente, se realizó un análisis no paramétrico que arroja un  $p \ll 0.01$ , lo que indica que si existen diferencias significativas en el número de puntos que presenta cada estirpe.**

## Resultados

Se llevó a cabo el mismo tipo de análisis, exclusivamente en condiciones ácidas, con cepas que contenían los transgenes para la sobreexpresión de PLC $\delta$ ::PalF y PLC $\delta$ ::PalF::Ub y *palC::gfp*. Se genotipó por PCR la presencia de las quimeras y se comprobó al microscopio la del alelo *palC::gfp*.

Ambas mostraron un mayor número de puntos corticales de PalC por micra respecto a la cepa silvestre (figura R.34, panel A, puntos 1 y 2). Además, si se comparan los datos obtenidos en este trabajo (figura R.34, panel A, punto 2) con los de Hérvas-Aguilar y colaboradores [20], las cepas PLC $\delta$  mostraron un aumento considerable de los puntos corticales por micra de hifa respecto a las cepas utilizadas en ese trabajo. En conjunto, estos experimentos demuestran que las proteínas PLC $\delta$ 2::PalF y PLC $\delta$ 2::PalF::Ub son capaces de activar la ruta de forma mucho más eficiente que su equivalente sin los dominios PH y que, de paso, la localización en membrana posiblemente estabilice a PalF y PalF::Ub.

## 4.8-CONTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO SENSOR A SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

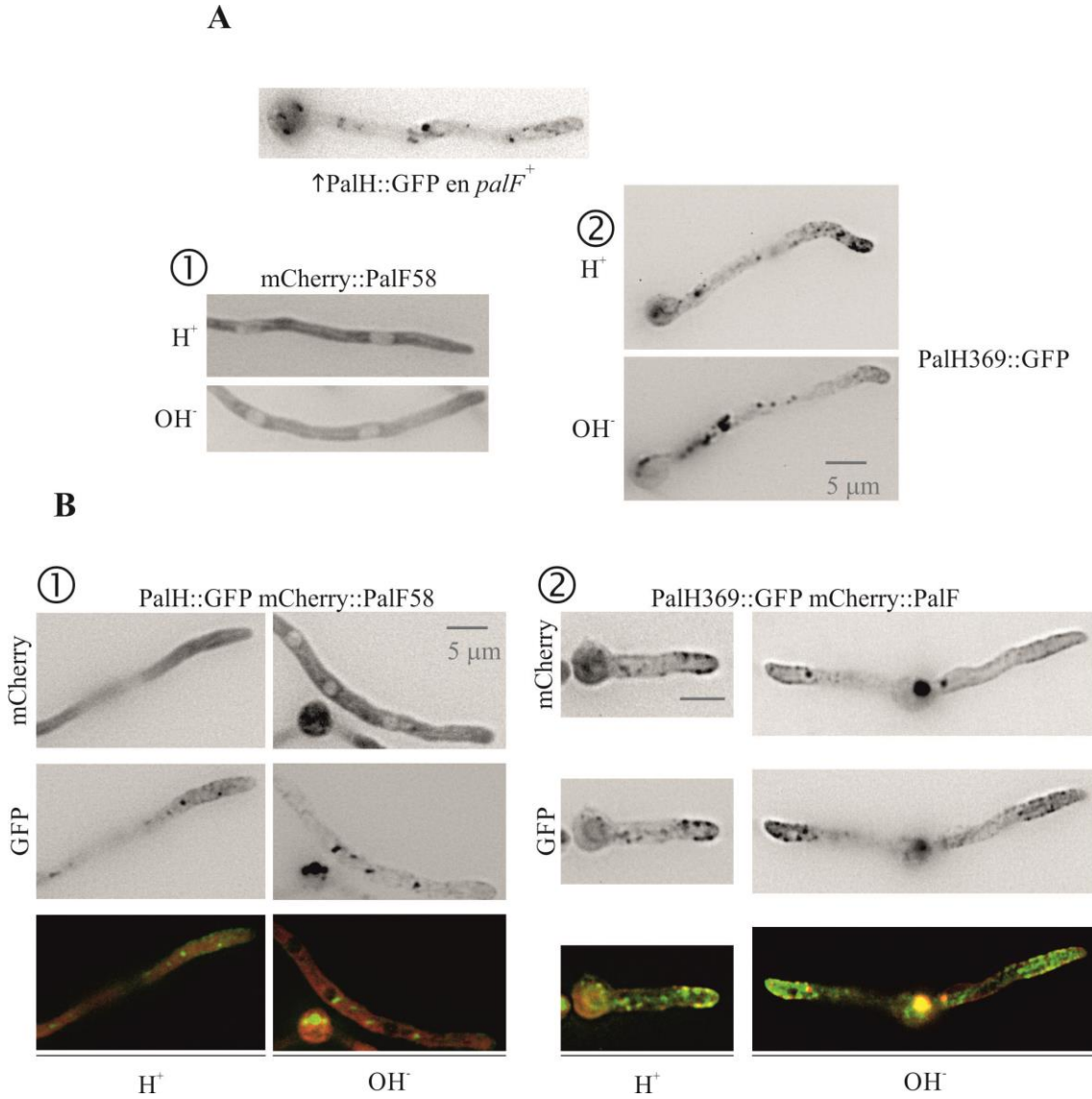
### 4.8.1-Análisis de la localización de *palF58* y *palH369* por separado

Dado que PalH mejora la localización de PalF en la membrana y viceversa, se estudió si la interacción PalH-PalF afecta a la localización de ambas proteínas. El alelo *palF58*, que causa la substitución Ser86Pro, es un alelo de pérdida de función. Mediante ensayos de *pull-down* y doble híbrido, Herranz *et al.*, demostraron que esa mutación afecta a la interacción con PalH [19]. Debido a ello, se reprodujo esa substitución en el transgén *gpdA<sup>mini</sup>::mcherry::palF*, para comprobar si hay algún efecto sobre la localización de la arrestina. La arrestina mutante no se localizó en la membrana plasmática ni en condiciones ácidas ni alcalinas (panel B.1, figura R.35). Además cuando se co-sobreexpresó con PalH::GFP se observó una disminución en la fluorescencia global de PalH, aunque se seguía distribuyendo tanto en la membrana plasmática del ápice de la hifa como en el sistema endovacuolar (panel C.1, figura R.35). Sin embargo, no se observó la re-localización de ambas proteínas a la membrana plasmática que se había observado en el apartado 4.7.2 (véase el panel A.2, figura R.32). Este resultado demuestra que la mutación Ser86Pro en PalF no sólo interfiere en la interacción con PalH, sino que además afecta a la localización habitual de PalF, ya que PalF también se localiza en parte en la membrana plasmática (ver punto 4.7.1).

Por otra parte, Herranz *et al.* también habían demostrado que la substitución Gly369Ala en PalH previene su interacción con PalF. Se reprodujo la misma mutación en el transgén

Resultados

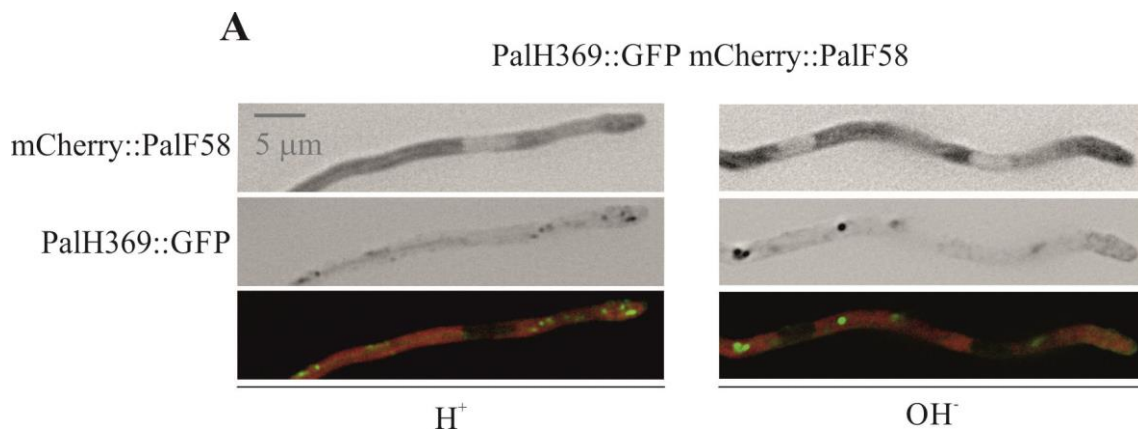
*gpdAmini::palH::gfp*. La observación al microscopio mostró que esa mutación no afecta a la distribución habitual de PalH (figura R.35, panel B.2). Asimismo, cuando se co-sobreescribió con mCherry::PalF, no pareció impedir la interacción con PalF, aunque puede ser que le perjudique (figura R.35, panel C, punto 2).



**Figura R.34-*palF58* deja de localizarse en membrana pero *palH369* parece no estar afectado. A.1-** Localización subcelular de mCherry::PalF<sup>S86P</sup>. **A.2-** Localización subcelular de PalH<sup>G369A</sup>::GFP Las estirpes se cultivaron durante 14 h y a 25°C, en WMM ácido (5.2). Posteriormente, se cambió el medio por WMM ajustado a pH neutro (7.1). **B.-** Localización subcelular de las proteínas mCherry::PalF<sup>S86P</sup>, PalH::GFP (1) y PalH<sup>G369A</sup>::GFP, mCherry::PalF (2). Las cepas se cultivaron durante 14 h en WMM ácido (5.2). Posteriormente, se cambió el medio por WMM ajustado a pH neutro (7.1).

#### 4.8.2-Análisis conjunto de la localización de *palF58* y *palH369*

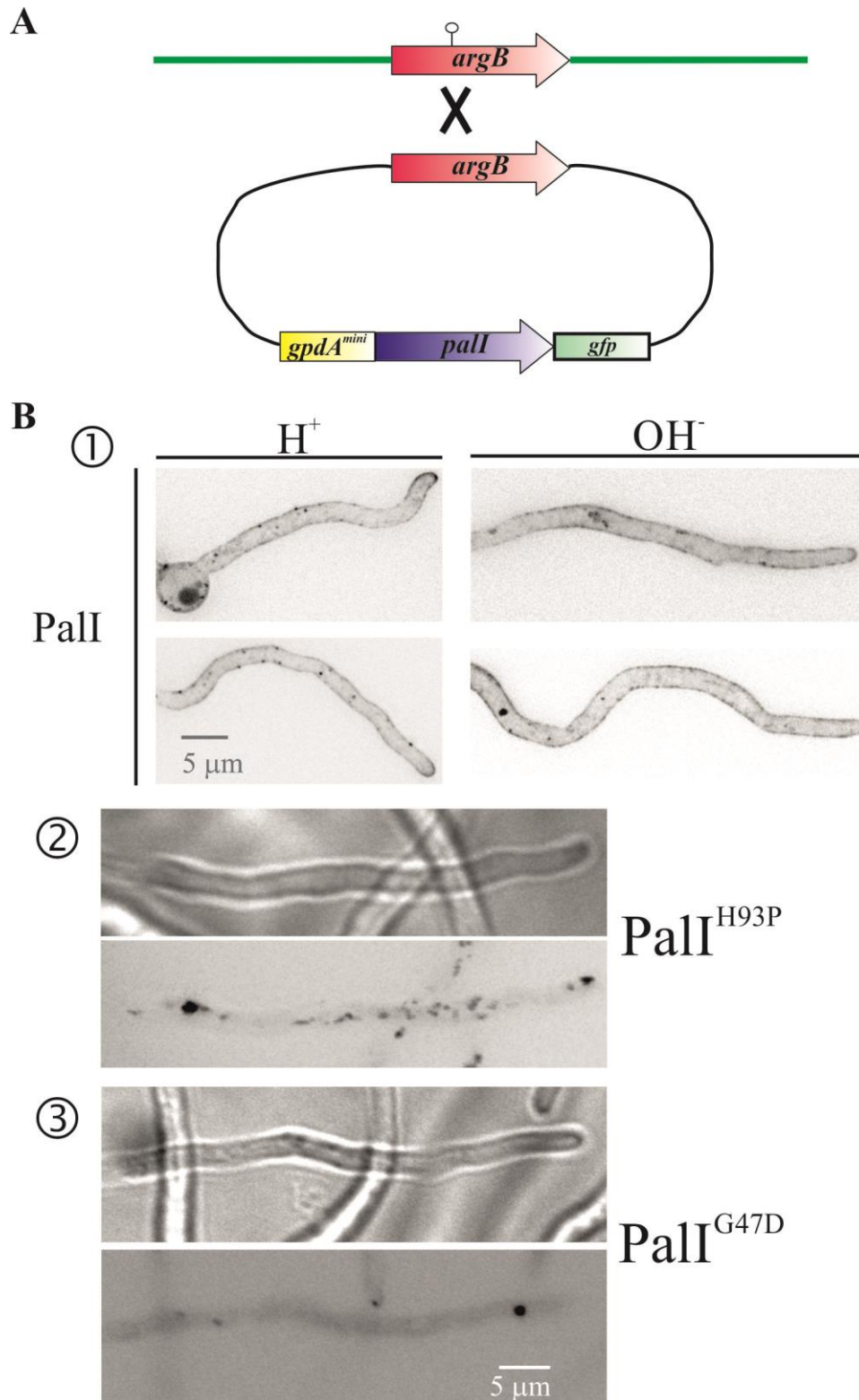
Una vez analizadas las localizaciones de *palF58* y *palH369*, se llevó a cabo un análisis de la co-sobreexpresión de ambos transgenes mutantes, tal y como se muestra en el panel A de la figura R.36. El estudio de la proteína PalH369::GFP mostró que hay menor fluorescencia de PalH<sup>Gly369Ala</sup> como consecuencia de la co-sobreexpresión con *palF58*, tal y como ocurrió al sobreexpresarlo con el transgén para la sobreexpresión de PalH::GFP. Por el contrario, mCherry::PalF58 no mostró ninguna alteración. Este conjunto de resultados, junto con los del punto 4.7.2, indican que la interacción PalH-PalF es clave para que ambas proteínas se distribuyan en la membrana plasmática con mayor eficiencia.



**Figura R.35-Análisis de la localización conjunta de mCherry::PalF58 y PalH369::GFP. A.-** mCherry::PalF58 afecta a los niveles de fluorescencia pero no a la localización subcelular de PalH. Las cepas se cultivaron durante 14 h en WMM ácido (5.2). Posteriormente, se cambió el medio por WMM ajustado a pH neutro (7.1).

#### 4.8.3-PalI no mejora la localización de PalF en la membrana

PalI colabora en la localización en membrana plasmática de PalH. Estudios anteriores [13] que se han reproducido en esta tesis con un transgén *gpdA<sup>mini</sup>::pall::gfp* integrado en el locus *argB* de una estirpe *pall32* (figura R.37, panel A), mostraron que PalI tiene una localización preferente en membrana plasmática en la que forma además focos discretos (figura R.37, panel B, punto 1). Se introdujeron los cambios correspondientes a distintos alelos mutantes de *pall* (*pall30*, *pall306* y *pall319*, véase tabla R.1) en el transgén para la sobreexpresión de *pall::gfp*. Los mutantes mostraron que la pérdida de función de la proteína correlaciona con alteraciones en la localización habitual de PalI (panel B, puntos 2 y 3, figura R.37), lo que sugiere que la localización en la membrana plasmática es importante para su correcto funcionamiento.

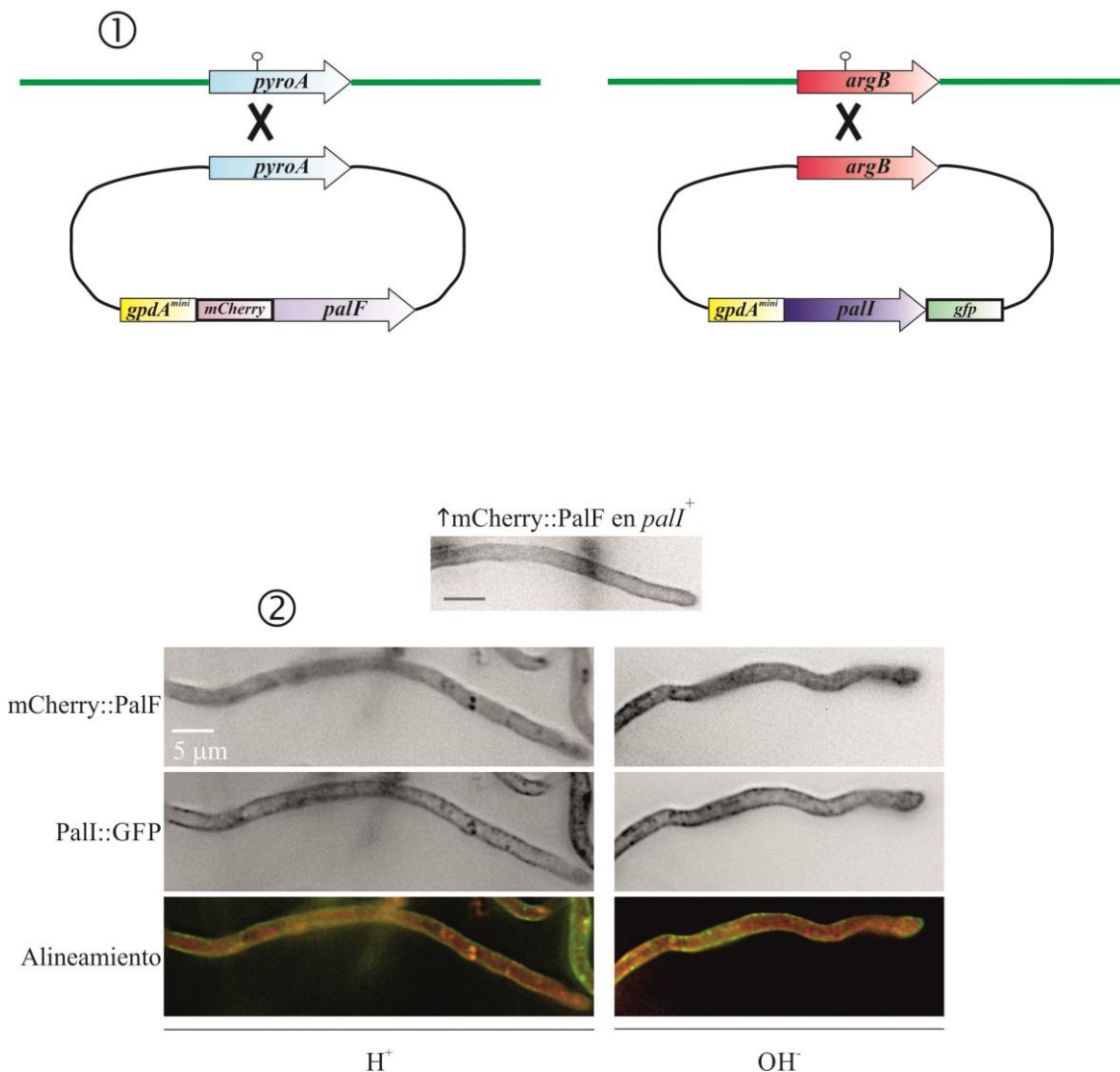


**Figura R.36-La función de Pall está asociada a su localización en la membrana.** Análisis de los mutantes que afectan la función de Pall. Las cepas se cultivaron durante 14 h y a 25°C, en WMM ácido (5.2). 1-Localización de Pall::GFP en condiciones silvestres. 2-Localización de Pall::GFP<sup>G47D</sup>. 3-Localización de Pall::GFP<sup>H93P</sup>.

## Resultados

Una de las cuestiones que se plantearon durante el proyecto de sobreexpresión de las 3 proteínas del complejo sensor fue si PalI también colabora en la localización subcelular y tráfico de PalF. En el apartado 4.7.2, se ha visto que PalF y PalH colaboran mutuamente en su localización en la membrana plasmática. Dado que PalF se localiza *per se* en la membrana sin ayuda del receptor (ver punto 4.7.1), se pensó que PalI pudiera estar participando en su localización. Debido a ello, se decidió estudiar ese hecho. Por ello, se obtuvieron mediante un cruce estirpes  $gpdA^{mini}::mcherry::palF$ ,  $gpdA^{mini}::pall::gfp$  (figura R.38).

A



**Figura R.37-PalF y PalI no interactúan.** A-Representación esquemática de los transgenes utilizados para la co-sobreexpresión de de mCherry::PalF y Pall::GFP. B.-Análisis microscópico de la localización de mCherry::PalF y Pall::GFP. La cepa se cultivó durante 14 h y a 25°C, en WMM ácido (5.2). Posteriormente, se cambió el medio por WMM ajustado a pH neutro (7.1) para analizar qué ocurre en esas condiciones.

## Resultados

Una vez seleccionados los descendientes correctos, se estudió si existía colaboración mutua en la localización de ambas proteínas (panel A, punto 2, figura R.38). A pH ácido, PalI se siguió localizando en la membrana plasmática (*vide supra*). PalF se localizó en la membrana, pero no en mayor medida que por sí sola, como cabría esperar si la sobreexpresión de PalI participase en su localización. Tampoco se detectaron variaciones en los niveles y localización de ambas proteínas debido a la alcalinización del medio, salvo el aumento en el tráfico subcelular de PalI detectado con anterioridad (ver apartado 4.8.2). Este resultado, permite concluir que PalI no participa en la localización de PalF o viceversa.

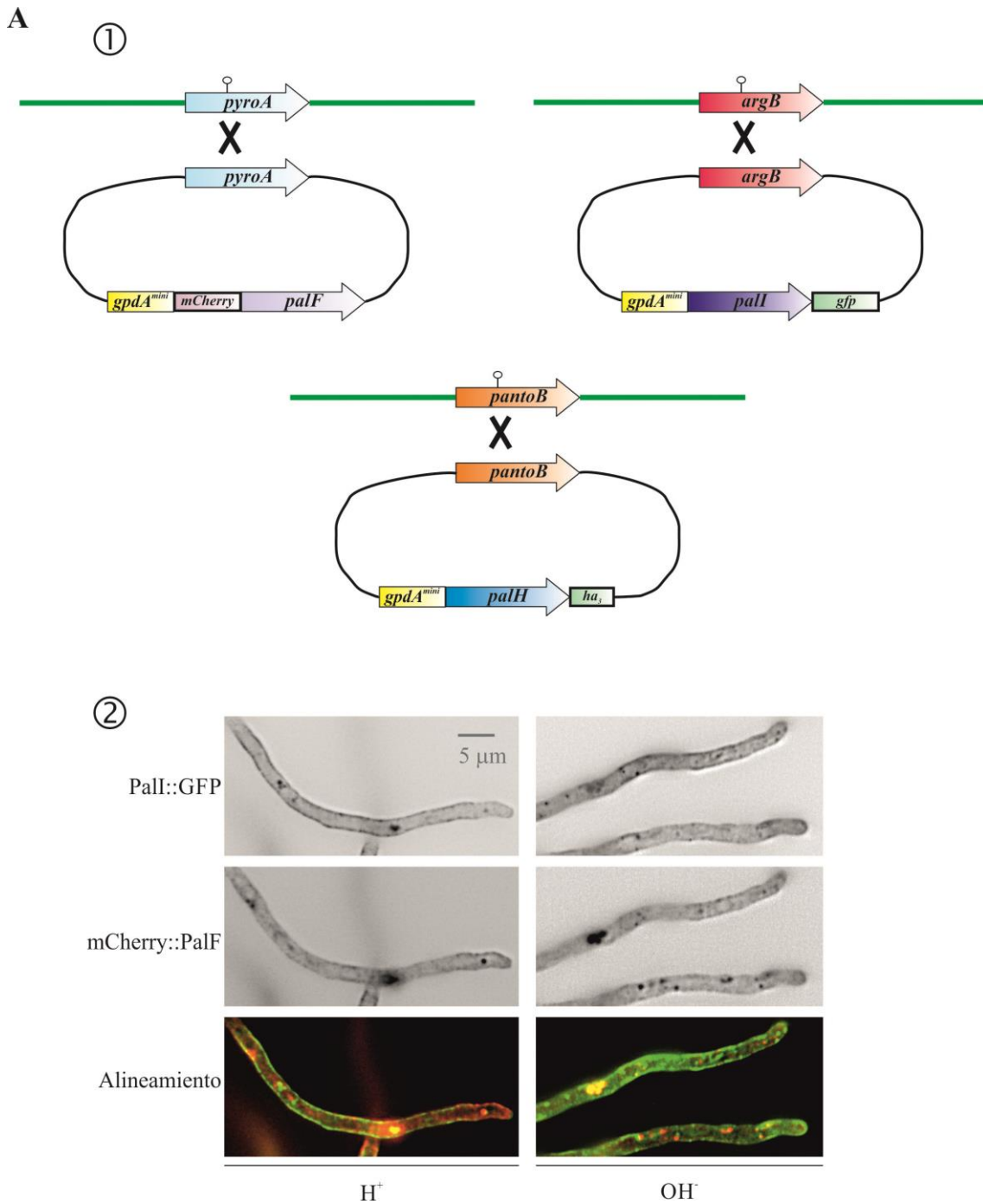
### **4.8.4-La sobreexpresión de las 3 proteínas del complejo sensor permite la deslocalización de PalF y PalI en condiciones alcalinas**

Hasta ahora, se ha estudiado la localización subcelular de las proteínas del complejo sensor por separado o en combinación doble. Para finalizar el trabajo de la localización subcelular de las tres proteínas del complejo sensor, previamente se generó por transformación una cepa con el transgén *gpdA<sup>mini</sup>::palH::ha<sub>3</sub>* integrado en el locus *pantoB*. Como en ocasiones anteriores, los transformantes se genotiparon por *Southern blot* para escoger aquéllos que contenían una sola copia del transgén. A continuación se obtuvieron por recombinación meiótica, usando esta cepa como parental, estirpes portadoras de los 3 transgenes para la sobreexpresión de mCherry::PalF, PalH::HA<sub>3</sub> y PalI::GFP (figura R.39 panel A, punto 1). La presencia de mCherry::PalF y de PalI::GFP se comprobó por microscopía, y la de PalH::HA<sub>3</sub> sobreexpresado se genotipó por PCR.

A pH ácido, tanto PalI como PalF se localizaron en la membrana, concentrándose en puntos discretos en ella (figura R.39). La alcalinización del medio afectó a la localización y señal de ambas proteínas. Ya a los 15 minutos posteriores al cambio a pH alcalino, la señal de PalF cae drásticamente. Asimismo, hay un aumento del tráfico de PalI que a los 30 minutos hace que la proteína se relocalice de membrana a vacuolas.

Todos estos resultados, indican que PalH necesita tanto a PalI como a PalF para permanecer a la membrana plasmática. Asimismo, PalF se distribuye mejor en la región cortical cuando se co-sobreexpresa con PalH, y esa distribución es independiente del pH tal y como se ve en la figura R.32 (panel A, punto 2), lo que indica que PalH y PalF interaccionan con independencia del pH.

Resultados



**Figura R.38-La co-sobreexpresión de las 3 proteínas del complejo sensor afecta su localización en condiciones alcalinas.** A.1-Representación esquemática de los transgenes utilizados para la co-sobreexpresión de los 3 elementos del complejo sensor. A.2.-Análisis microscópico de la localización de mCherry::PalF y PalI::GFP. La cepa se cultivó durante 14 h y a 25°C, en WMM ácido (5.2). Posteriormente, se cambió el medio por WMM ajustado a pH neutro (7.1) para analizar qué ocurre en esas condiciones.

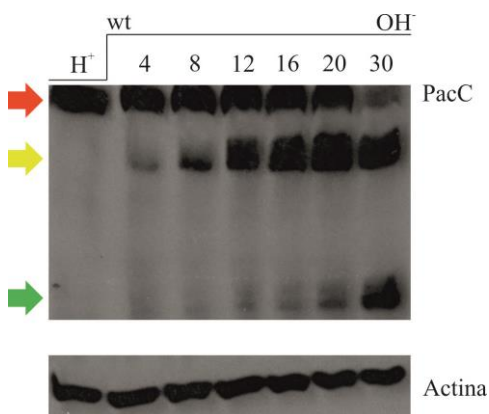
## 4-RESULTADOS-CAPÍTULO III

### 4.9-ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE PacC EN EL ESTADO ESTACIONARIO

A lo largo de esta tesis, se ha estudiado exhaustivamente la activación y cinética del procesamiento de PacC, en algunos casos junto con de los niveles de la forma fosforilada y defosforilada de PalH. Sin embargo, nunca se habían realizado estudios del comportamiento de PacC más allá de los 120 minutos, ni antes de los 15 primeros minutos tras exponer las células al pH alcalino. Tampoco se conocía qué efecto produce sobre el procesamiento el retorno a pH ácido. Por ello, se decidió llevar a cabo los análisis que se presentan a continuación.

#### 4.9.1-La respuesta al pH alcalino requiere minutos

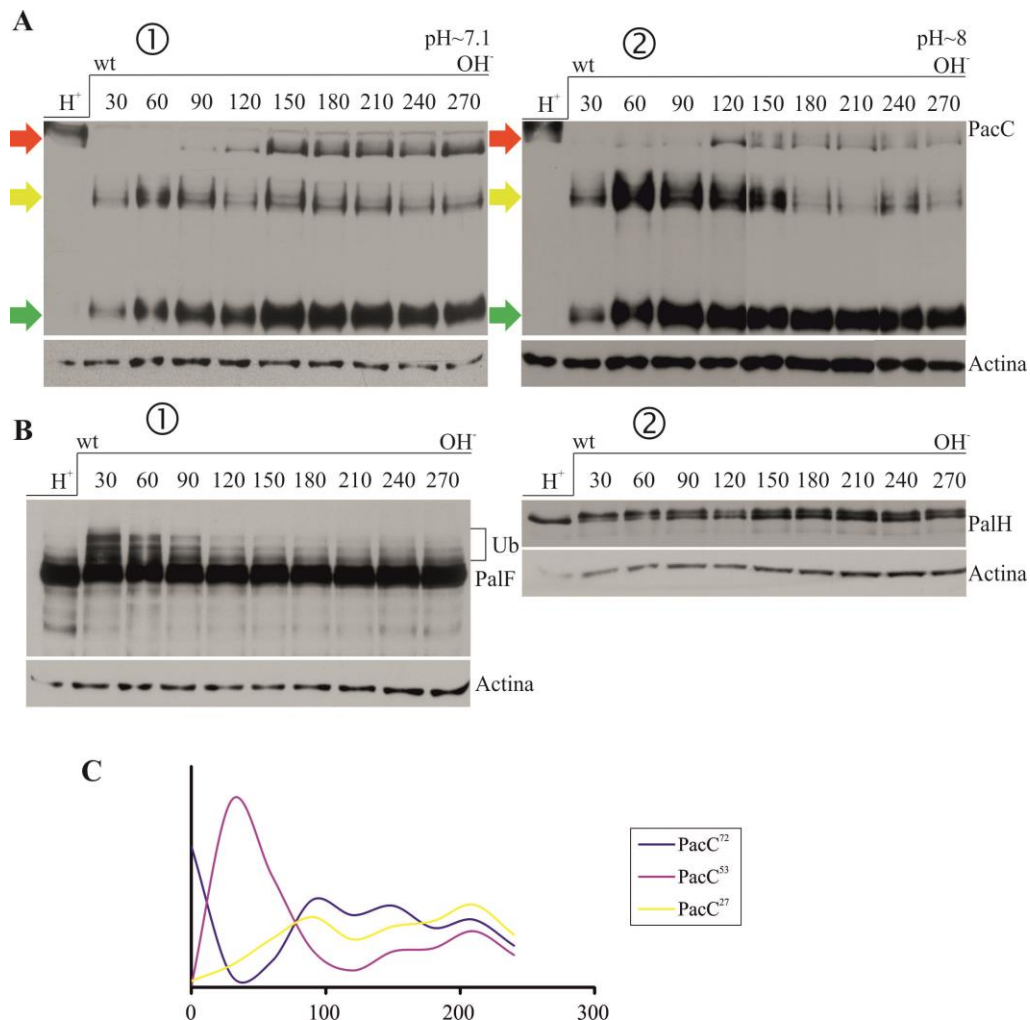
A lo largo de este trabajo se ha comprobado exhaustivamente, en los experimentos de respuesta aguda a pH alcalino, que la activación de PacC se completa entre los tiempos 15' y 30'. Sin embargo, no se sabía qué sucede con el procesamiento y la señalización en los primeros minutos después de la alcalinización del medio. Se realizó un ensayo de respuesta a pH alcalino, en el que se recogieron muestras a intervalos de tiempo de 4 minutos tras la alcalinización, hasta un total de 30 minutos (figura R.40). En él, se observó que la respuesta dependiente de pH es relativamente lenta, aunque a los 4 minutos ya aparece PacC<sup>53</sup>. Sin embargo, no es hasta el minuto 12 que los niveles de esta se hacen similares a PacC<sup>72</sup>. PacC<sup>27</sup> tarda más tiempo en aparecer, hasta el minuto 12-16 y no se estabiliza hasta los 30 minutos posteriores a la alcalinización del medio. Este resultado, indica que la respuesta dependiente de pH es relativamente lenta, siendo el paso proteolítico de PacC<sup>53</sup> a PacC<sup>27</sup> el más lento.



**Figura R.39-La respuesta dependiente de pH es cuestión de minutos.** Procesamiento de PacC a tiempos tempranos. La cepa, se cultivó en medio de fermentación a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8) y se recogieron muestras de micelio cada 4 minutos. En el *western blot* se utilizó la actina como control de carga.

#### 4.9.2-Las 3 formas de PacC se estabilizan con el tiempo

En muchos ensayos de respuesta a pH alcalino de este trabajo se muestra que a tiempo 120 min parece iniciarse una recuperación de PacC<sup>72</sup>, que debe de proceder necesariamente de nueva síntesis. Para estudiar qué sucede con la respuesta a pH alcalino a medio plazo se realizaron diversos ensayos de alcalinización del medio (el cual se tamponó a pH ~7.1 o a pH ~8), muestreando cada media hora. En el ensayo ajustado a pH 8, lo habitual en esta tesis, se observó que la recuperación de PacC<sup>72</sup> es muy patente a 120 min y se estabiliza a los 180 min. Este comportamiento de PacC<sup>72</sup> concuerda con un descenso de PacC<sup>53</sup> y, algo menor, de PacC<sup>27</sup> (que es más estable), de manera que a tiempos superiores a los 180 min parece alcanzarse un equilibrio en la relación entre las tres formas (figura R.41, panel A.2).



**Figura R.40-Análisis de la respuesta en el estado estacionario. A.-** Procesamiento de PacC a tiempos largos. Las cepas, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con tampón fosfato (7.1) o HEPES (8). *A.1*-Procesamiento de PacC a pH 7.1. *A.2*-Procesamiento de PacC a pH 8. **B.-** Niveles de PalH y PalF en el estado estacionario. Las cepas, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con tampón fosfato (7.1). *B.1*-Niveles de PalF. *B.2*-Niveles de PalH. **C-** Gráfico que representa las variaciones en las formas de PacC a lo largo del tiempo.

## Resultados

En el ensayo realizado a pH 7.1, se aprecia el mismo patrón de estabilización (figura R.41, panel A.1). Sin embargo, el equilibrio llega a tiempos más tempranos respecto a pH 8 (figura R.41, panel A.2).

Este conjunto de resultados, indican que la respuesta al pH alcalino medida como procesamiento de PacC llega a un equilibrio con el tiempo, más o menos rápidamente en función de la alcalinidad ambiental.

### **4.9.3-Los niveles de PalH y PalF se estabilizan con el tiempo, al igual que PacC**

Se quiso entonces comprobar si las distintas formas de PalH fosforilado y sin fosforilar y PalF ubiquitinado y sin ubiquitinar, correlacionan de alguna manera con el comportamiento de PacC a lo largo del tiempo. Se realizaron dos ensayos de respuesta a pH alcalino (~7.1) con cepas que expresaban niveles endógenos de PalF o PalH etiquetados con HA<sub>3</sub>. En ambos experimentos, es evidente que las formas de PalF y PalH se equilibran con el tiempo, al igual que PacC. En el caso de PalH (panel B.2, figura R.41), hay un pico de fosforilación a los 30 minutos que se mantiene, para llegar a un equilibrio entre ambas formas a los 90 minutos y no cambiar a partir de los 150 minutos. En PalF ocurre exactamente igual (panel B.1, figura R.41), se observó un pico de ubiquitinación a los 30-60 minutos que luego se estabiliza a partir de los 90 min, para no variar a partir de los 150 min. Estos resultados muestran que al igual que PacC, las formas de las proteínas PalH y PalF se estabilizan con el tiempo, lo que en su conjunto indica que la ruta se adapta mediante una señalización persistente pero baja, de manera que se mantengan tanto los niveles totales de PacC (la suma de las tres formas) como la relación entre ellas.

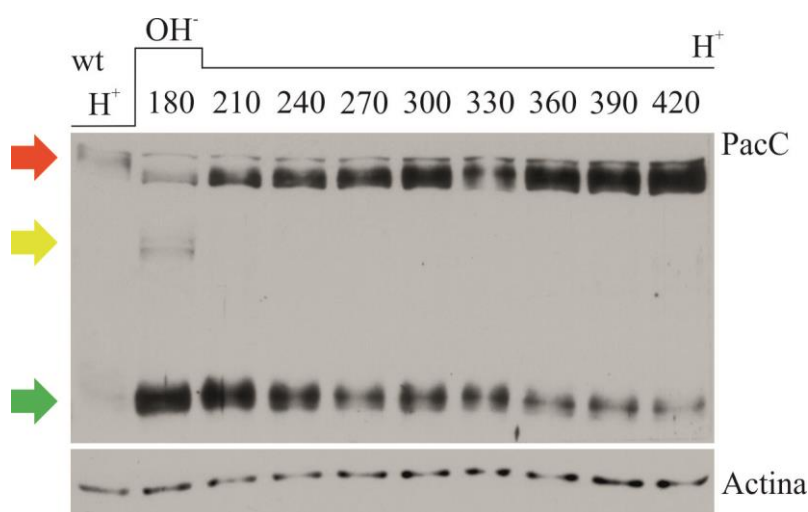
### **4.9.4-PacC<sup>27</sup> tarda mucho tiempo en desaparecer al volver al pH ácido**

Otra de las cuestiones que no se había investigado previamente, es qué ocurre cuando las células están en un ambiente alcalino y el medio se acidifica, es decir, cómo se vuelve al estado “inactivo” y cuánto tiempo tarda el sistema en reestablecer los valores iniciales. Por ello, se realizó un ensayo de doble cambio de pH, en el que un micelio crecido a pH ácido se transfirió a un medio con pH 7.1 y se mantuvo en él hasta los 180 minutos (es decir, el tiempo de estabilización en la relación entre las tres formas). En ese momento, el micelio se transfirió a un medio con pH 4.3. Se recogió una muestra del micelio crecido a pH ácido, una muestra del

## Resultados

micelio crecido a pH alcalino a tiempo 180' y se muestreó cada 30 minutos una vez realizado el 2º cambio de pH.

En el ensayo global (figura R.42) se observó que, tan pronto como las células vuelven a pH ácido, PacC<sup>53</sup> desaparece y no se detecta más, lo que redonda en el hecho de que la proteasa señalizadora es dependiente de pH. Además, aumentan paulatinamente los niveles de PacC<sup>72</sup> por nueva síntesis, que se recuperan por completo (esto es, a los niveles previos al pH alcalino), a las 2-3 horas. Sin embargo, PacC<sup>27</sup> tarda mucho tiempo en desaparecer y sus niveles son relativamente altos incluso a las 4 horas de volver a medio ácido. Este resultado permite concluir que los efectos de la activación de la repuesta al pH alcalino son duraderos en el tiempo y que el restablecimiento de la señal a sus valores iniciales antes de la alcalinización no es inmediato.



**Figura R.41**-Análisis del retorno al estado inicial. La cepa, se cultivó en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, se transfirió a medio mínimo a pH 7.1 (ajustado con tampón fosfato) y se dejó hasta los 180 minutos posteriores al cambio de pH. Pasado ese tiempo, se volvió a transferir a medio ácido ajustado con citrato (4.3) y se recogieron muestras cada media hora hasta un total de 420 minutos posteriores al primer cambio de medio. Se utilizó la actina como control de carga.

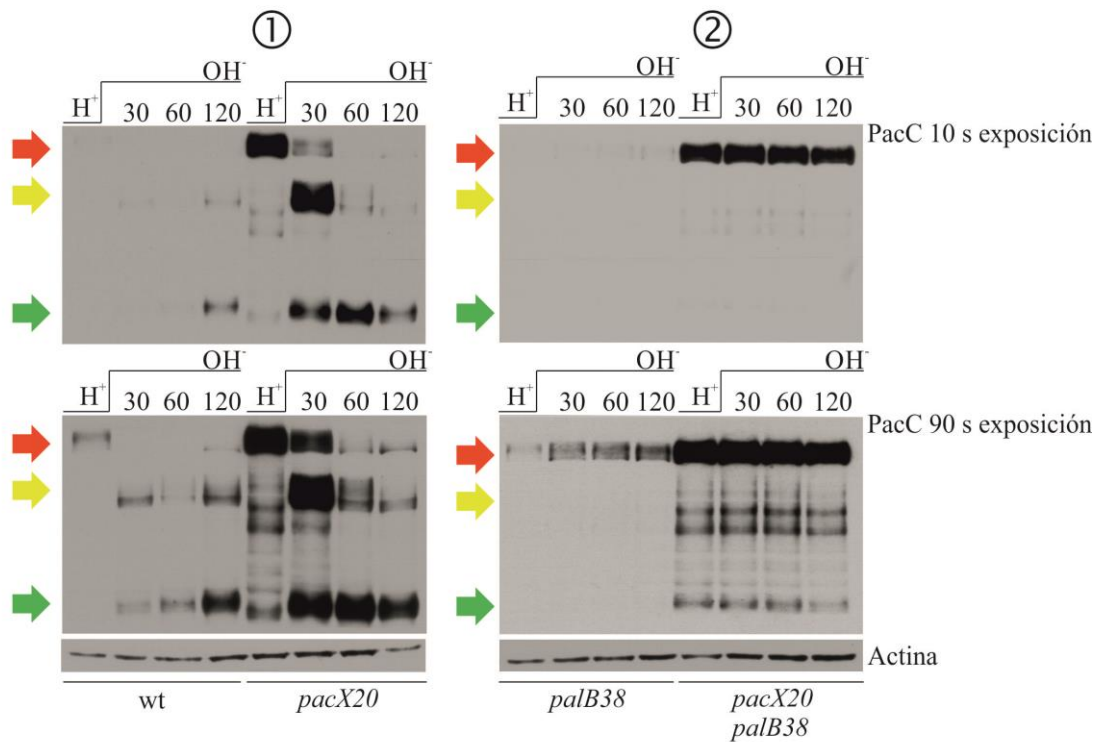
### 4.9.5-Las mutaciones hipomorfas en el gen *pacX* suprimen parcialmente la necesidad de la ruta *pal*

PacX es una proteína de la que no hay ortólogos en otras especies y contiene un motivo de dedos de zinc, el cual podría unirse a DNA. La Dra. Hervás, ya demostró que PacX actúa negativamente sobre los niveles de PacC [140], dado que los niveles de éste se incrementan drásticamente en una cepa con el alelo *pacX20*, alelo mutante fenotípicamente nulo. Debido a la mejora en el sistema de ensayo de respuesta a pH alcalino, se decidió volver a comprobar los niveles de PacC en ese fondo genético (figura R.43.panel A, punto 1). Además, se estudió qué tipo de comportamiento tiene PacC en una cepa que, además de tener el alelo *pacX20*, contenía

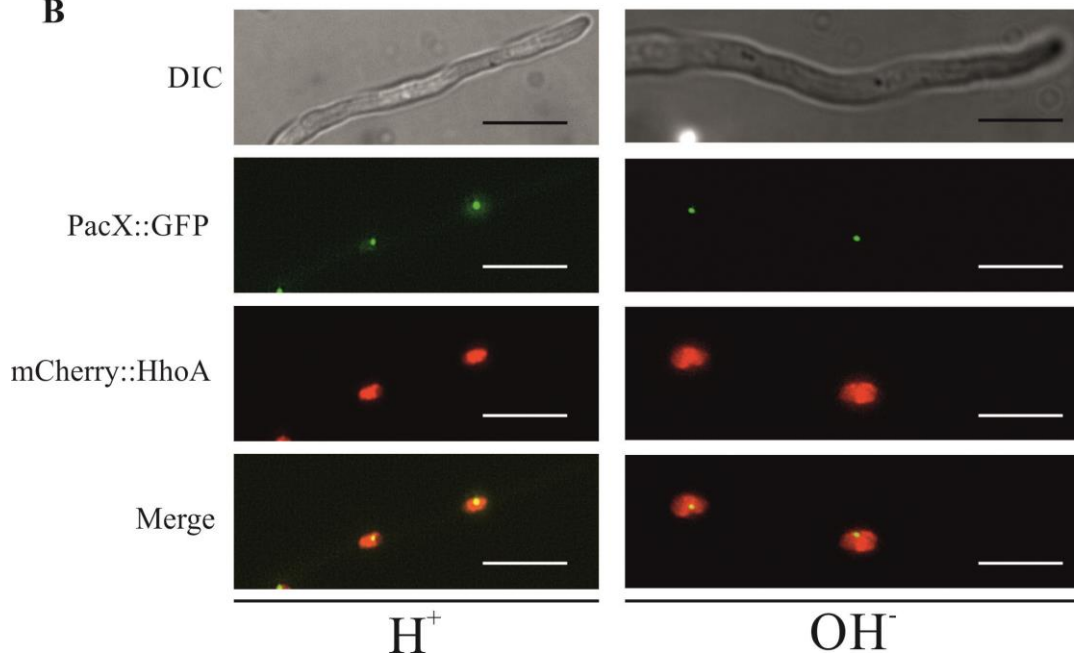
## Resultados

el alelo nulo *palB38* que tiene una mutación que trunca la proteína en el residuo 54 de sus 847, lo que impide la activación de la ruta en condiciones alcalinas.

**A**



**B**



**Figura R.42-PacX debe ser un elemento de regulación génica negativa de PacC. A.-**Procesamiento de PacC en un fondo genético nulo para *pacX*. Las cepas, se cultivaron en medio mínimo líquido a pH ácido ajustado con citrato de sodio (4.3), durante 15 h. Posteriormente, fueron transferidas a medio mínimo a pH alcalino ajustado con HEPES (8). A.1-Procesamiento de PacC en un fondo *pacX20*. A.2-Procesamiento de PacC en un fondo *pacX20* y *palB38*. En todos los *western blots* se utilizó la actina como control de carga. **B.-**Microscopía de PacX::GFP. La estirpe se cultivó en WMM ácido, ajustado con fosfatos durante 14 h, a 25°C. Posteriormente, se cambió el medio y se añadió WMM ajustado con fosfatos a pH 7.1.

Los ensayos a pH alcalino fueron claros: los niveles de PacC se incrementan de manera muy notoria, tanto, que los niveles de PacC<sup>27</sup> obtenidos por procesamiento basal en la cepa nula para *palB* son muy apreciables (figura R.43, panel A, punto 2). Además, como los niveles de PacC<sup>27</sup> obtenidos por procesamiento basal son notables, este hecho permite suprimir el alelo nulo *palB38*. Este resultado, corrobora lo observado por la Dra. Hervás sobre que PacX regula de forma negativa los niveles de PacC en la célula.

### **4.9.6-PacX se localiza en un punto discreto del núcleo**

Como se ha comentado en el apartado anterior, PacX juega un papel clave en la regulación de los niveles de PacC, pero se desconoce cómo realiza esa función. Una posible explicación, es que actúe como factor de transcripción gracias a sus dedos de zinc y reprima a *pacC* a nivel transcripcional. Para ver si PacX podría tener su función a nivel nuclear, lo que daría más fuerza a la idea de que es un regulador de la expresión génica, se decidió llevar a cabo un estudio de su localización subcelular. El estudio, se hizo en una cepa que expresaba la proteína PacX-GFP y que tenía marcada en rojo la histona H1 (HhoA-mCherry).

Al microscopio, PacX se localiza dentro de los núcleos pero su distribución no se extiende al núcleo por entero, sino que se concentra en un foco discreto (panel B, figura R.43). La alcalinización del medio no afectó a esta localización nuclear. Este resultado, junto al anterior, indica que PacX podría actuar como regulador de la expresión génica y, en el caso de *pacC*, ser un represor transcripcional que formaría parte de un bucle de retroalimentación negativa que evitaría que los niveles de PacC se disparasen exageradamente, controlando así el propio bucle de retroalimentación positiva dependiente del propio PacC.

***DISCUSIÓN***

## 5-DISCUSIÓN

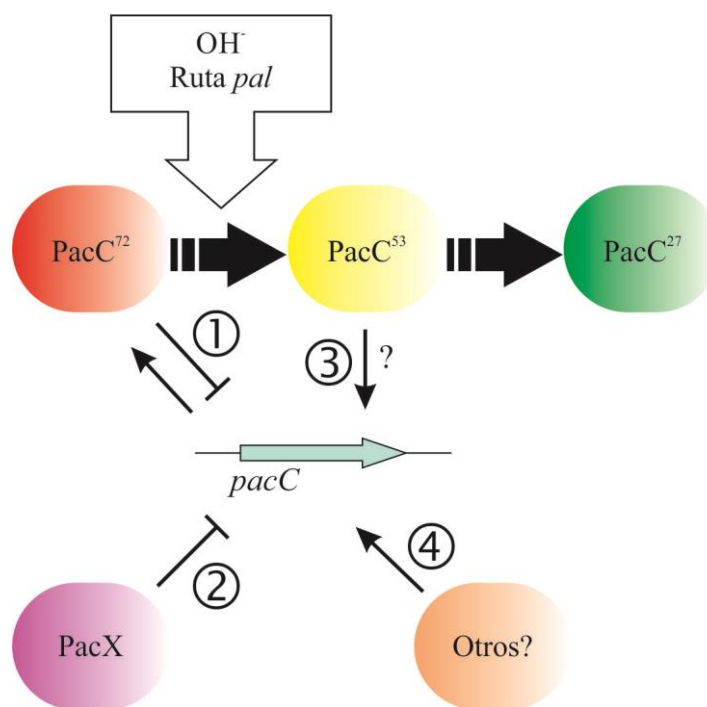
El factor de transcripción PacC, implicado en la regulación de “genes ácidos y alcalinos” se activa en dos pasos proteolíticos sucesivos [15-18]. En el primer paso dependiente de pH, participan las proteínas Pal junto a componentes de los complejos ESCRT [14,21,24]. PalH, es la proteína con 7-TM [11], que funciona como receptor de la ruta de señalización por pH ambiental. A su vez, PalF es la arrestina que actúa como transductor a través de su interacción con PalH [19,20]. La presencia de ambas proteínas es clave para activar la señalización por pH, a diferencia de lo que ocurre con la proteína accesoria PalI [13]. En el presente trabajo, se propone que PalH, PalF y PalI forman el complejo receptor-transductor, donde PalH actúa como el receptor de pH ambiental, PalF funciona como el transductor y tanto PalI como PalF participarían de manera independiente en estabilizar PalH en la membrana plasmática.

### 5.1-LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE PacC

PacC es un factor de transcripción de dedos de zinc [132,138] que se encarga de la regulación de genes necesarios en condiciones ácidas [136] y alcalinas [134], actuando como represor de los primeros y activador de los segundos. Cuando el pH ambiental se alcaliniza, PacC<sup>72</sup>, la forma “inactiva”, es procesado en dos pasos a PacC<sup>27</sup> [15-18], la forma “activa” que entra a núcleo y realiza su función reguladora [139].

La respuesta al pH alcalino es continua, en la que a partir de un umbral de pH es capaz de activarse la señalización. Ese umbral de pH está determinado como se ha visto en el presente trabajo, por los niveles de las proteínas que forman el complejo receptor-transductor, PalH y PalF, junto con la probabilidad de tener a PalF accesible a una ubiquitina ligasa. La respuesta al pH alcalino medida en función del procesamiento de PacC, se puede dividir en dos fases distintas, una primera donde se obtiene una respuesta de tipo aguda y relativamente lenta, y una segunda donde la respuesta es moderada y parece llegarse a un equilibrio entre las distintas formas de PacC, como si se llegara a una fase estacionaria. En la primera respuesta, PacC<sup>72</sup> es totalmente procesado a PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup>, desapareciendo durante casi una hora. Sin embargo, la velocidad de la respuesta puede considerarse lenta, ya que desde que PacC<sup>72</sup> es procesado a PacC<sup>27</sup>, pasan minutos. Este hecho indica que el paso limitante en el procesamiento es el “corte procesativo” de PacC<sup>53</sup> a PacC<sup>27</sup>, ya que PacC<sup>72</sup> es procesado a PacC<sup>53</sup> de forma relativamente rápida. El tiempo de duración de la respuesta aguda es de 90-150 minutos aproximadamente. Al

cabo de ese tiempo empieza la segunda respuesta, que se inicia con la aparición del PacC<sup>72</sup> de nueva síntesis a los 90-120 minutos. A partir de los 150 minutos, se llega a un equilibrio a lo largo del tiempo, tanto en los niveles de las distintas formas de PacC como en las tres formas entre sí. Por otro lado, al volver a un ambiente ácido después de haber entrado en la fase estacionaria se observa que el procesamiento de PacC se para, ya que no se obtiene PacC<sup>53</sup>, PacC<sup>72</sup> se incrementa con el tiempo y PacC<sup>27</sup> tarda mucho en desaparecer.



**Figura D.1-Representación esquemática de la regulación de *pacC*.** *pacC* es un gen “alcalino” que se encuentra regulado a distintos niveles. Por un lado, está reprimido por PacC<sup>72</sup> (1) y PacX (2) de manera dependiente del pH en el primer caso e independiente en el segundo. Se desconoce quién actúa como activador de *pacC* aunque se sospecha que podría ser PacC<sup>53</sup> (3). No se puede descartar que haya otros elementos que regulen positiva o negativamente a *pacC* (4).

El gen *pacC* se regula a nivel transcripcional de dos formas distintas, una dependiente del pH y la otra independiente, tal y como se muestra en la figura D.1. Por un lado, existe una autoregulación de *pacC* por alguna de sus tres formas proteicas y por tanto dependiente del pH alcalino. Hasta no hace mucho, se creía que PacC<sup>27</sup> era un potente activador de *pacC* [104,132,134]. Sin embargo, estudios transcripcionales realizados por Tilburn *et al.* (comunicación directa, datos no publicados), han demostrado que esa idea es errónea y que es PacC<sup>72</sup> el que actúa como represor de *pacC* (punto 1, figura D.1).

La otra forma de regulación, independiente del pH, se da como mínimo y de manera negativa a través del putativo factor de transcripción PacX (figura D.1, punto 2). Como se ha visto en este trabajo, el alelo nulo *pacX20* provoca que los niveles de PacC se incrementen de forma notable.

Estos resultados plantean un posible escenario donde *pacC* es un “gen alcalino” que tiene dos niveles de regulación negativa, a través del propio PacC<sup>72</sup> y mediante PacX. Por los resultados obtenidos por Joan Tilburn, PacC<sup>27</sup> no puede ser un activador de *pacC* ya que no hay un incremento en el transcrito de *pacC* cuando un transgén *pacC*<sup>27</sup> se expresa bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>* en una cepa “nula” para la proteína PacC pero que sigue conteniendo su gen. Eso quiere decir que pudiera existir otro activador para la transcripción de *pacC*. Una posibilidad es que PacC<sup>53</sup> pueda ser ese activador (figura D.1, punto 3), ya que Tilburn observó un incremento notable del transcrito de *pacC* en los 15 minutos posteriores a la alcalinización del medio. Otra posibilidad es que haya otra proteína que actúe como activador de *pacC* (punto 4, figura D.1), aunque se desconoce quién puede realizar esa función. Una última posibilidad sería la simple relajación de la represión mediada por PacC<sup>72</sup>.

## 5.2-PalH ES EL RECEPTOR DE LA RUTA DE pH AMBIENTAL

PalH es una proteína con siete dominios transmembrana [11], que se asemeja topológicamente a los GPCRs [3]. A lo largo de todo el trabajo realizado con PalH, cada vez se han generado más evidencias de que éste funciona como el receptor de pH ambiental en *A. nidulans*. La ruta de señalización por pH únicamente presenta dos proteínas transmembrana que podrían funcionar como receptores putativos, PalH [11,13] y PalI [13]. PalH resulta indispensable para la señalización, ya que una estirpe “nula” para PalH es incapaz de activar el procesamiento de PacC a pH alcalino. En cambio, PalI es prescindible para la señalización aunque su ausencia tiene un efecto negativo detectable sobre el procesamiento del factor de transcripción [212].

Por otra parte, no se han hallado evidencias de la implicación de una proteína G heterotrimérica en la señalización. En cambio, se ha demostrado un papel positivo de la arrestina PalF [19], cuya ubiquitinación es clave para la transducción de la señal. Esa modificación post-traducciona es dependiente del pH alcalino y de PalH, aunque parcialmente también depende de PalI [20]. Sin embargo, ese hecho podría explicarse por la ineficiencia que tiene PalH para permanecer en la membrana plasmática en ausencia de PalI [13]. Como se ha visto, PalH sobreexpresado tiende a localizarse en el sistema endovacuolar. Calcagno-Pizzarelli *et al.*, demostraron que la co-sobreexpresión de PalI y PalH permite que este último se relocalice a la membrana plasmática [212]. Posiblemente, la falta de PalI hace que haya menores niveles de PalH en la membrana plasmática, lo que podría afectar al número de complejos PalH-PalF que se podrían formar, claves para que PalF se ubiquitine y por ello, se encuentran menores niveles de arrestina ubiquitinada en una estirpe “nula” para *palI*. Además, el hallazgo del mutante de ganancia de función en PalH, el primer mutante de mimesis de

## Discusión

alcalinidad encontrado entre las proteínas Pal, el cual es epistático sobre el mutante nulo *palI32* e hipostático sobre el mutante *palF15* demuestra junto a los resultados anteriores, que de las dos proteínas de la ruta *pal* que residen en membrana, PalH es el receptor de la señalización por pH ambiental.

Una de las cuestiones que quedan por responder es cómo PalH es capaz de percibir la alcalinización del ambiente. Actualmente, se han encontrado diversos receptores 7-TM que se activan por iones de hidrógeno [91,92,213,214]. Estos GPCRs funcionan mediante la protonación/desprotonación del anillo imidazol de determinados residuos de histidina localizados en algunos bucles extracelulares y en la superficie extracelular de varios TM. Por debajo de un pH de 6, el anillo de imidazol de la histidina se protona, lo que permite que establezca nuevos puentes de hidrógeno, hecho importante para la activación del receptor [92]. Un abordaje factible sería mutagenizar las tres histidinas que hay en la región extracelular de PalH, dos de ellas situadas en la región N-terminal y la tercera localizada en el primer bucle extracelular. Puede ser que esas histidinas se desprotonen con la alcalinización del medio, rompiendo puentes de hidrógeno claves que mantendrían a PalH en su conformación cerrada, lo que permitiría su activación. No obstante no se puede descartar que existan otros mecanismos de percepción del pH alcalino, como formación o ruptura de interacciones electrostáticas entre residuos con distinta carga situados en los bucles extracelulares o en los dominios transmembrana. Además, no se puede obviar la posibilidad de que PalH no sólo sea un receptor de pH sino que también pueda percibir ciertos iones, lo que permitiría explicar la sensibilidad al litio en una cepa *palHA*.

Otra de las cuestiones que quedan por resolver, en ausencia de estudios estructurales, es la secuencia de reordenamientos previos a la activación de PalH. Estudios cristalográficos de distintos GPCRs han demostrado que los cambios conformacionales que desencadenan la activación están bastante conservados [62]. A pesar de que no existe una estructura cristalográfica de PalH que permita conocer qué cambios conformacionales son necesarios para su activación, es posible que el movimiento descrito en los GPCRs que implica a una prolina muy conservada situada en el TM6 [25,70] pueda suceder en PalH, ya que éste contiene también una prolina altamente conservada en esa misma hélice. Además, la mutagénesis de ese residuo altera drásticamente los niveles de PalH, lo que indica que la prolina<sup>316</sup> tiene un papel muy importante en la estabilidad estructural del receptor.

Hasta que no se conozcan más estructuras de GPCRs o hasta que no se cristalicen diversas estructuras de PalH, será imposible conocer qué serie de reordenamientos son importantes para la activación del receptor. Sin embargo, podrían realizarse estudios como los planteados en esta tesis mediante mutagénesis al azar de las hélices transmembrana que podrían facilitar el entendimiento de los residuos claves para la activación y de esa manera, generar posibles modelos de activación-desactivación de PalH.

### **5.2.1-La importancia de Phe319 y Trp332 en PalH**

En este trabajo se han encontrado diversos mutantes de ganancia de función en PalH, los primeros de mimesis de alcalinidad hallados en las proteínas Pal. Todos ellos comparten la implicación de dos residuos muy conservados, la Phe319 situada en el TM6 y el Trp332 situado en el TM7. Aunque no hay ninguna estructura cristalográfica de PalH y se desconocen la serie de reordenamientos que dan lugar a su activación, es casi seguro que este par de residuos participan en ella. Como se ha descrito en la introducción, existe un tipo de interruptor molecular que está implicado en la activación de los GPCRs, conocido como alternador rotamérico. Aunque actualmente su funcionamiento está en discusión, parece ser que modula el ángulo de torsión de la prolina situada en el TM6 de los GPCRs, la cual está muy conservada [25,70]. Al igual que los GPCRs, PalH contiene una prolina altamente conservada en la hélice VI y quizás uno de los cambios conformacionales que sufre el receptor de la ruta de pH implica directamente a esa prolina. Una posible hipótesis es que, al igual que sucede en el alternador rotamérico de los GPCRs, el triptófano y la fenilalanina participan en la modulación del grado de torsión de la prolina. Además, hay una sinergia en la participación de los dos residuos, ya que sus mutaciones por separado confieren cierto nivel de mimesis de alcalinidad pero juntas se obtiene un grado mayor de ganancia de función/activación. No obstante, por supuesto no se puede descartar que participen otros residuos adyacentes o que la implicación de estos dos en la activación del receptor sea a través de un mecanismo diferente a la modulación de la prolina. Además, el hecho de que el nivel de activación de la ruta en los mutantes de Phe319 y Trp332 es muy bajo, hace suponer que existen, como cabría esperar, otros mecanismos necesarios para la activación de PalH.

### **5.2.2-El posible papel de la fosforilación de PalH**

Al igual que ocurre con los GPCRs [6], PalH es fosforilado. Ese hecho únicamente ocurre en condiciones alcalinas, lo que muy probablemente es un reflejo de la activación del receptor o de la “sensibilización” de éste al pH. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los GPCRs, la fosforilación de PalH no parece que sea una señal para reclutar a la arrestina PalF o reforzar su interacción con el receptor, ya que la activación de la ruta es posible aún en ausencia de la región necesaria para la fosforilación de PalH identificada en su cola citosólica. Además, esa idea queda reforzada con los ensayos de *pull-down* realizados, que han demostrado que la interacción entre PalH y PalF ocurre a través de la cola citosólica del receptor y con que únicamente los dos sitios de unión a PalF localizados en ella son necesarios para la activación de la señalización. No obstante, podrían existir otras regiones de fosforilación que no se hayan

identificado mediante *western blot* y que fuesen claves para reforzar la interacción PalH-PalF. Es por ello, que es necesario un análisis más exhaustivo para identificar posibles regiones de fosforilación distintas a la ya encontrada. Además, un examen mediante mutagénesis dirigida de los residuos de la región conservada ya identificada podría permitir hallar el (los) residuo(s) clave(s) para que PalH se fosforilara. Por otro lado, no se puede descartar tampoco una participación de las serinas localizadas en el primer bucle intracelular, ya que su mutagénesis parece disminuir los niveles de la forma fosforilada de PalH, aunque por un lado, ese hecho no afecta a la activación de PacC y por otra parte, siguen observándose formas fosforiladas del receptor.

Si bien parece que la fosforilación de PalH no participa en su interacción con PalF para la activación de la señalización, una posibilidad es que sea una señal para “marcar” aquel receptor que está activo y debe ser endocitado. Esa idea queda reforzada por el hecho de haberse detectado receptor fosforilado a pH ácido en un mutante deficiente en endocitosis, donde PalH no se puede internalizar. Seguramente, tal y como ocurre en los GPCRs, que tienen niveles basales detectables de activación [62], PalH puede encontrarse por probabilidad molecular, en la conformación activa en ausencia de alcalinización del medio. En condiciones fisiológicas normales, ese receptor activo es fosforilado y endocitado, evitando la señalización en condiciones inadecuadas, por lo que únicamente se observa la banda correspondiente a PalH sin fosforilar en condiciones ácidas. Además, de esta manera se evitaría la sobre-señalización cuando se alcaliniza el medio, retirando de la superficie celular al receptor activo y manteniendo un número apropiadamente reducido de complejos de activación. No obstante, aunque es una posibilidad, parece ser que resulta una señal prescindible, ya que la delección de la región de fosforilación únicamente tiene consecuencias menores en la señalización por pH.

Otra posibilidad sería que la fosforilación participe en el tráfico de PalH como señal para su reciclado más o menos rápido, lo que permitiría explicar el retraso en la señalización a tiempos largos que se observa en el mutante de delección de la región de fosforilación. Si esto fuera así, el retraso en la señalización en este mutante indicaría que la fosforilación promueve el reciclado rápido a la membrana de PalH, y que sería largamente prescindible.

Tampoco se podría descartar su función en la dimerización u oligomerización de PalH, quizás participando en su reconocimiento. PalH, al igual que los GPCRs [215,216], se puede dimerizar (Bignell, comunicación en el ECFG12, Sevilla 2014, resultados no publicados). No está claro cuál es el papel de la dimerización [215], aunque puede estar implicada en diversos procesos. Quizás, al igual que ocurre en los GPCRs, PalH pueda señalar tanto en su forma monomérica como en su forma oligomérica pero quizás en esta forma la señalización sea más eficiente. Una hipótesis es que la fosforilación permita el reconocimiento entre receptores activos, y que este reconocimiento dé paso a la dimerización u oligomerización. Ese hecho permitiría explicar los niveles más bajos que se observan en el procesamiento de PacC en los

mutantes de delección de la cola citosólica *palH486* y *palH564*, además del retraso en el procesamiento a tiempos largos observado en el mutante *palH486*. La señalización no estaría impedida en cuanto al funcionamiento de PalH pero si se podrían generar menores niveles de PacC debido a la imposibilidad de la dimerización.

Por último, no se puede desechar la idea de que la fosforilación sirva como un sistema de reconocimiento y activación de rutas distintas de transducción de señales, quizás a través del propio PalF o de otras proteínas que interaccionen con PalH, formando andamiajes independientes de la ruta *pal*.

Lo que queda claro con estudios realizados en GPCRs y con el presente trabajo es que la fosforilación es un proceso complejo [217], en el que cada vez hay más evidencias sobre que pueden existir “códigos de barras de fosforilación” [218,219], que permiten regular distintos procesos biológicos a través de un mismo receptor. Lo que se deduce claramente del presente análisis es que la fosforilación no se requiere para el reclutamiento de PalF, ni para la activación de la ruta de pH. Futuros estudios en PalH deben ir encaminados a determinar si la fosforilación tiene un papel en la endocitosis o reciclado del receptor (como ocurre en el receptor de feromonas fúngico Ste2 [220,221]), además de intentar identificar la(s) quinasa(s) que puedan “marcar” a PalH. Un posible abordaje para responder a las dos cuestiones anteriores a la vez sería a través de la sobreexpresión de las quinastas de *A. nidulans* mediante el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*, e intentar detectar pérdida de función de PalH. Por otra parte, la hipótesis de que la fosforilación de PalH participe en su dimerización puede intentar ser respondida a través de ensayos de *cross-linking* de PalH en estirpes tanto silvestres como deficientes en fosforilación, viendo si en esas últimas también ocurre la dimerización del receptor.

### **5.2.3-La endocitosis de PalH no es necesaria para la activación de la ruta de pH**

Durante mucho tiempo, una de las grandes incógnitas en la ruta de señalización por pH ha sido el papel de la endocitosis en la activación de la señalización. El hecho de que la endocitosis es necesaria para la transducción de señales por  $\beta$ -arrestinas a través de la ruta independiente de proteína G [6], junto con el hallazgo de la implicación de los componentes de los ESCRTs en la señalización por pH [14,24], generó un modelo en el que existían dos complejos espacialmente diferenciados, uno situado en la membrana plasmática y otro en la membrana del endosoma. Según ese modelo, la endocitosis del complejo de membrana, formado por PalH y PalF, era necesaria para poder activar la señalización. Sin embargo, los estudios de Herrador sobre la interacción de Rim8 y Vps23 en *S. cerevisiae* primero [143], y los

trabajos de Galindo *et al.*, sobre la localización de PalC, PalA y Vps23 (proteínas que se creía formaban parte del complejo de la membrana del endosoma) en focos discretos de la membrana plasmática dependientes de la alcalinización del medio [14,21], mostraron que ese modelo parecía ser erróneo.

En este trabajo, se ha demostrado que la endocitosis de PalH no es necesaria para la activación de PacC. Los distintos mutantes deficientes en endocitosis ([170,171,205,207] y este trabajo), han sido capaces de activar de forma prácticamente normal el procesamiento de PacC, aun cuando PalH se encontraba anclado en la membrana. Además, el mutante de endocitosis hiperactiva [205] no mostró mayores niveles de procesamiento de PacC, lo que hubiese sido lo esperable si la endocitosis de PalH fuese el interruptor de activación de la ruta. Estos datos junto a los resultados obtenidos por A. Galindo, zanján de forma definitiva la idea de que la endocitosis es requerida para la señalización. No obstante, no se puede obviar la necesidad de la endocitosis como un proceso que participa en la regulación fina de la señalización por PalH, tal y como ocurre en los GPCRs [6,222,223]. De hecho, en algunos mutantes deficientes en endocitosis donde PalH se ha localizado exclusivamente en la membrana plasmática, se ha observado cierto procesamiento a pH ácido. Una posible explicación a ese hecho es que, al igual que ocurre con los GPCRs que tienen un cierto grado de activación basal [62], algunas moléculas de PalH sufran con poca probabilidad una activación conformacional en ausencia de la unión del ligando, y al hallarse en la membrana plasmática y ante la imposibilidad de ser endocitadas, se les pueda acoplar PalF y activar la señalización. Tampoco se puede rechazar la idea, como ya se ha comentado en el punto anterior, de que PalH pueda participar en otra(s) ruta(s) de transducción de señales distinta(s) a la del pH, donde la endocitosis del receptor tal y como ocurre en los GPCRs [6,223], sea necesaria para la activación de ésta(s).

### **5.2.4-La localización de PalH depende de PalF y PalI**

Como se ha comprobado con anterioridad [13] y en los estudios presentes en esta tesis, PalH demuestra una tendencia intrínseca a localizarse en el sistema endovacuolar. Los análisis de microscopía por co-sobreexpresión de PalH con PalF o con PalI muestran que estas últimas lo estabilizan en la membrana plasmática ([13,20] y este trabajo), dado que PalH está únicamente en la membrana en mutantes deficientes en endocitosis. Asimismo, en ninguno de los *western blots* de PalH se aprecia que el receptor se ubiquitine, por lo que o PalF o PalI deben ubiquitinarse y funcionar como adaptadores de tráfico para PalH. Herranz y colaboradores, demostraron que PalF se ubiquitina de manera dependiente del pH alcalino y de PalH [19]. PalF y PalH son capaces de interactuar independientemente del pH. Sin embargo, se observa muy poco tráfico de PalF cuando el medio se alcaliniza. Por otro lado, PalI sobreexpresado se

## Discusión

localiza casi exclusivamente en membrana y en focos discretos en ella ([13] y este trabajo), pero cuando el medio se alcaliniza se observa un ligero incremento de su tráfico que es mayor cuando se co-sobreexpresa a la vez con PalH y PalF. No obstante, se desconoce si PalI sufre modificaciones post-traduccionales de algún tipo. Asimismo, está claro que PalI y PalF no colaboran de manera directa en su localización en la membrana plasmática, ya que no se observa más fluorescencia de PalF en la membrana cuando se co-sobreexpresa con PalI.

Estos resultados plantean una serie de posibles escenarios para el tráfico de PalH, representados en la figura D.2. Por un lado, PalH, aunque es una proteína de membrana plasmática, se localiza muy ineficientemente en ella y viaja entre las rutas biosintética y degradativa a no ser que los niveles de PalF o PalI sean estequiométricos [13,20], lo que indica que necesita una(s) proteína(s) accesoria(s) que lo retengan en la membrana plasmática.

Una posibilidad es que PalF se encargue de la estabilización de PalH en la membrana plasmática (punto 1 y 7, figura D.2), dado que PalF *per se* tiene capacidad de unión a la membrana plasmática. Sin embargo, puede que tenga un papel menor en la internalización de PalH, quizás participando en el reciclado de éste de nuevo a la membrana plasmática o encargándose del destino final de los receptores que hayan sido activados (figura D.2, puntos 2, 3 y 6). Este hecho concordaría con la co-localización que se observa en el interior de las vacuolas cuando el medio se alcaliniza, aunque se desconoce si PalF es capaz de interactuar con la maquinaria endocítica tal y como lo hacen las  $\beta$ -arrestinas [6].

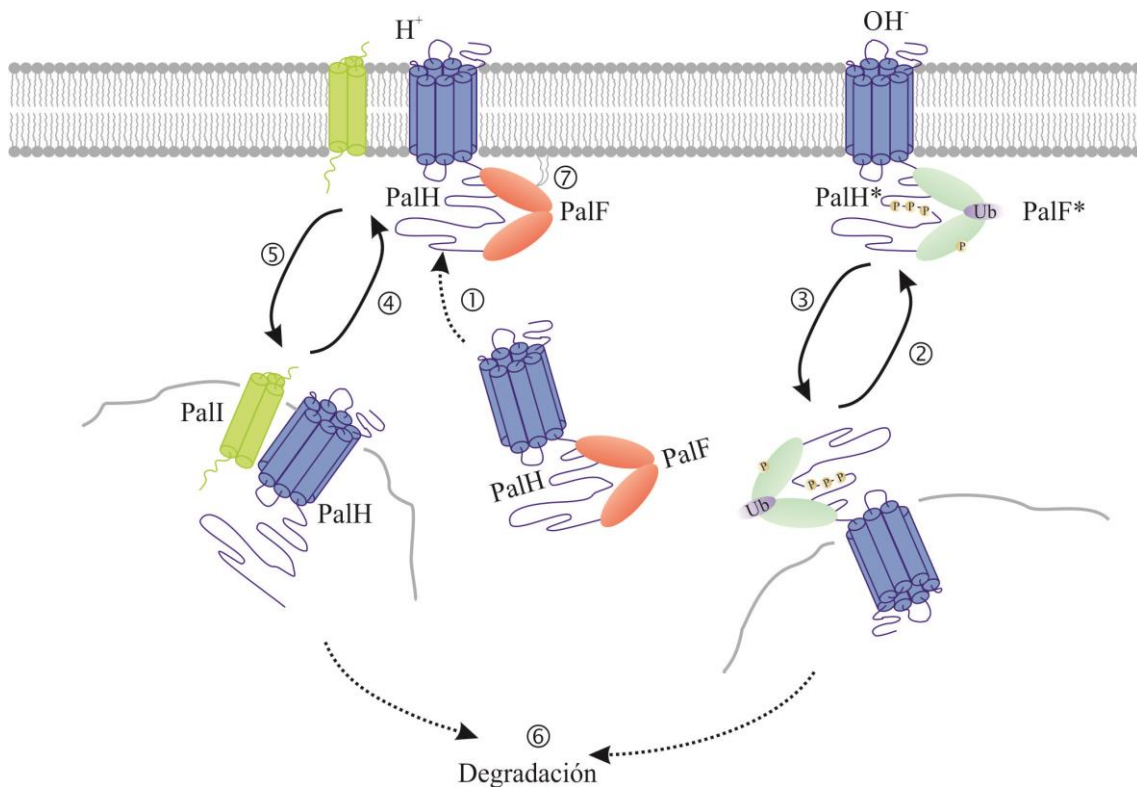
Otro escenario posible es que PalI participe en la estabilización en la membrana plasmática, así como en la internalización y destino final de PalH (figura D.2, punto 4, 5 y 6). Cada vez hay más evidencias en el caso de los GPCRs de que ciertas proteínas participan en su localización en la superficie celular, así como en su internalización [224]. Ese hecho explicaría el aumento en el tráfico de PalI que se observa cuando se co-sobreexpresa con PalH y PalF. Quizás PalI se pueda ubiquitinar y funcionar como adaptador de la maquinaria endocítica para internalizar a PalH o únicamente se internalice para “rescatar” a PalH y llevarlo de nuevo a la membrana.

Una tercera posibilidad es la conjunción de los dos escenarios anteriores. Por un lado, PalI colaboraría con PalF, reteniendo a PalH de manera eficiente en la membrana plasmática (punto 4, figura D.2) y PalF lo estabilizaría en ella (punto 7, figura D.2). Cuando el medio se alcaliniza, PalH se activaría y PalF se ubiquitinaría. Quizás existan patrones de ubiquitinación concretos que permitan la señalización por pH o la internalización del complejo PalH-PalF. El complejo PalH-PalF internalizado podría ser reciclado de nuevo a la membrana (punto 3, figura D.2) o seguir la ruta degradativa (punto 6, figura D.2). Por otro lado, el exceso de PalH activo y que no haya formado el complejo de señalización podría ser internalizado con PalI quizás mediante la ubiquitinación de éste y su interacción podría determinar el destino final de PalH,

aunque como se ha comentado en el escenario anterior, esa idea contrasta con la dispensabilidad de PalI.

Una última posibilidad es que PalH interactúe con otra proteína, tal como algún componente de la maquinaria endocítica, que permita su internalización. PalH contiene en su cola citosólica un motivo NPF [225], aunque su delección no parece afectar a la estabilidad y/o a los niveles de PalH.

Estudios más exhaustivos deben ser realizados para intentar comprobar y demostrar las hipótesis expuestas. Por un lado, habría que ver si PalF y PalI interactúan con alguno de los componentes de la maquinaria endocítica. Por otro lado, se desconoce si PalI sufre algún tipo de modificación post-traducciona. Se sabe que Rim9, el homólogo de PalI en *S. cerevisiae*, es fosforilado y glicosilado [226]. Puede ser que PalI también sufra alguna de las modificaciones que se dan en Rim9, u otras. Además, se debería comprobar si PalF y PalH sobreexpresados se localizan en la membrana en una estirpe nula para *palI*. Asimismo, se debería utilizar un etiquetado fluorescente distinto al mCherry y a la GFP para la visualización simultánea de las tres proteínas del complejo sensor de pH. Por último, se debería buscar si PalH interactúa con otras proteínas que puedan participar, directa o indirectamente en la endocitosis.



**Figura D.2-Posibles modelos de tráfico para PalH.** PalF y PalI pueden participar en el tráfico (flechas 1 y 4) y estabilización en membrana de PalH (7). PalF activo podría participar en el "turnover" de PalH (flechas 2 y 3) aunque esa función podría ser desempeñada también por PalI (flechas 4 y 5).

### 5.3-LA LOCALIZACIÓN DE PalF

PalF es la proteína similar a las  $\beta$ -arrestinas que participa en la transducción de la señalización por pH ambiental [19]. El paradigma clásico de los GPCRs y las  $\beta$ -arrestinas implica que éstas son reclutadas por los GPCRs activos y fosforilados para interrumpir la señalización por proteína G heterotrimérica [6,62]. Actualmente se sabe que las  $\beta$ -arrestinas además participan en la internalización y tráfico de ese tipo de receptores, en su ubiquitinación y en la señalización independiente de proteína G [5,6]. Una de las cuestiones que parecen claras tras el análisis llevado a cabo en esta tesis es que PalF, aunque mayoritariamente reside en el citosol, es la primera arrestina que se recluta a membrana sin necesidad de receptor [210]. Esta localización es clave para la señalización, como se ha visto en los mutantes con los dominios PLC $\delta$  fusionados a PalF. Posiblemente, la interacción de PalF con PalH estabiliza la localización de la arrestina en membrana y de esa manera es reconocida por alguna de las ubiquitina ligasas (como Rsp5, la Ub-ligasa que ubiquitina Rim8 en *S. cerevisiae* [143]), es ubiquitinada (en los GPCRs, se ha comprobado que la ubiquitinación refuerza la interacción receptor- $\beta$ -arrestina) y puede iniciar la señalización. Un posible experimento para acabar de demostrar ese hecho y que puede dar más fuerza a la idea de que la endocitosis no es necesaria para la señalización por pH es fusionar el dominio FYVE de Vps27 a PalF, el cual reconoce y se une al fosfoinositol-3-fosfato (PI-3-P) presente en la membrana de los endosomas [227], de manera que se relocalice a PalF en ellos y se compruebe que sucede con la señalización. Sin embargo, no puede descartarse que la localización en membrana plasmática en ausencia de PalH sea debida a la interacción con otro receptor como ocurre en los GPCRs, donde un sólo tipo de  $\beta$ -arrestina puede interactuar con diversos tipos de receptores 7-TM [6]. Como se ha visto en el punto anterior, posiblemente PalF participe en el tráfico de los receptores activos.

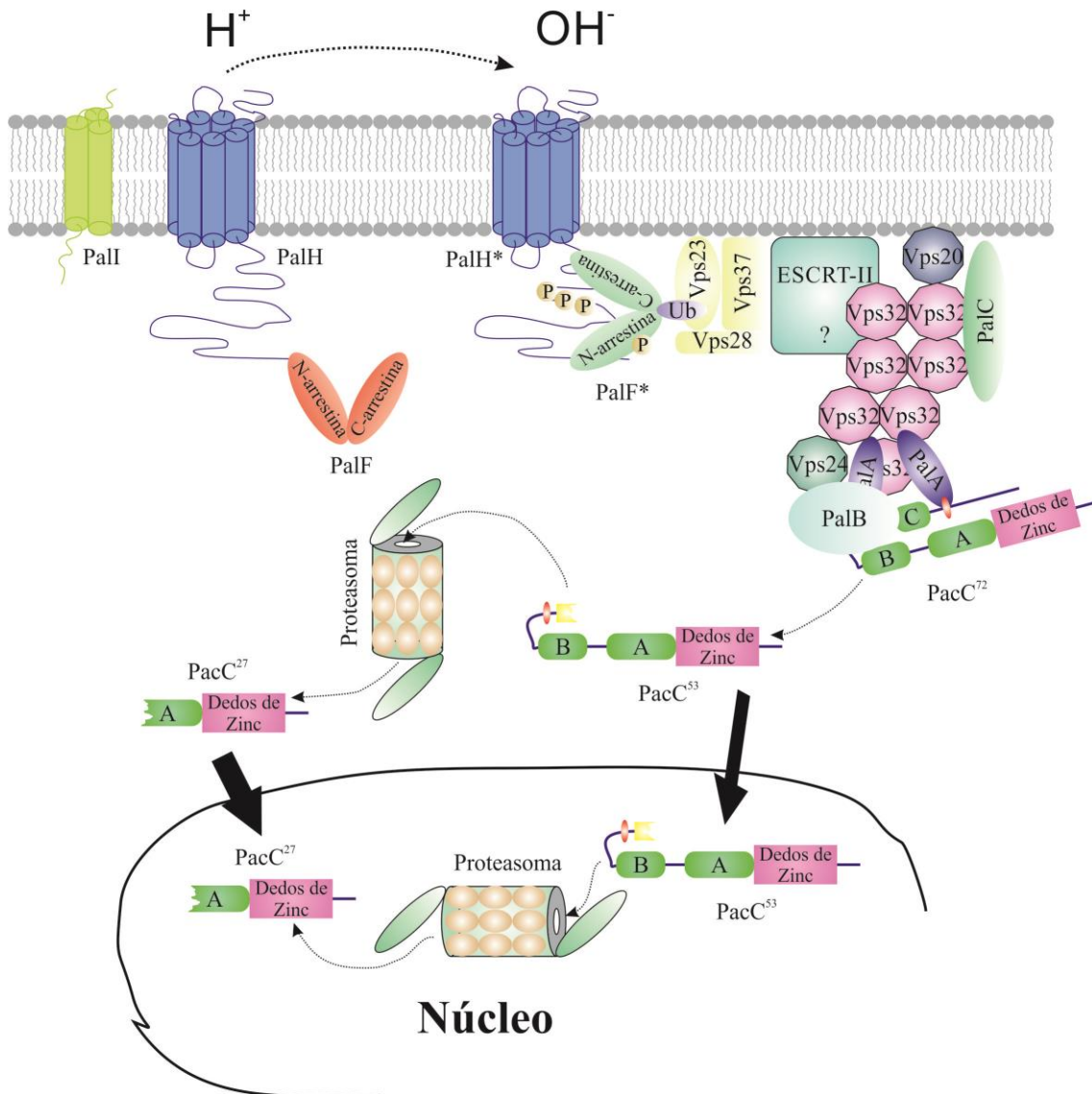
Uno de los hechos que queda claro con los resultados obtenidos en este trabajo, es que PalF ayuda a estabilizar de alguna manera los niveles de receptor. Ese hecho se ha podido comprobar tanto en los estudios de fosforilación de PalH en una cepa “nula” para *palF*, así como en el análisis de la interacción PalH-PalF y su localización, donde se ha observado que la falta de PalF o su alteración afectan de manera negativa a los niveles de PalH. Además, en el análisis de la interacción se observó que la mutación Ser86Pro deslocaliza a PalF de la membrana plasmática. Se desconoce si es un efecto de la substitución (la prolina puede generar algún tipo de torsión en la estructura que afecte a su correcto plegamiento y a su función) o es debido a la importancia intrínseca de la serina, lo que está claro es que en ese mutante cuando se co-sobreexpresa con PalH::GFP, este último presenta menores de fluorescencia y mucho menos tráfico y más cantidad de proteína localizada en las vacuolas. Sin embargo, PalH sigue siendo capaz de localizarse en el ápice de la hifa muy posiblemente gracias a PalI.

## 5.4-EL MODELO ACTUAL DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL

Como se ha visto en la introducción, anteriormente se creía en la existencia de dos complejos espacialmente diferenciados para la activación de la señalización por pH, un complejo situado en la membrana plasmática y formado por PalH, PalF y PalI, y otro localizado en la membrana de los endosomas y constituido por PalC, PalA, PalB y los componentes de la maquinaria ESCRT. En ese modelo, la señalización por pH requería de la endocitosis del complejo de membrana plasmática tal y como ocurre en la señalización por  $\beta$ -arrestinas, para conectarlo con el complejo situado en la membrana de los endosomas. Sin embargo, los estudios de Galindo *et al.*, indicaron que ese modelo es erróneo [14,21]. Actualmente podría presentarse un modelo en el que existen dos complejos funcionalmente diferenciados. Por un lado, existiría el complejo receptor-transductor formado por el receptor de pH PalH, el transductor PalF y la proteína accesoria PalI, cuya localización ocurre en la membrana plasmática. Por otra parte, existiría otro complejo, el complejo efector formado por el resto de proteínas Pal y los componentes ESCRT. En el escenario actual y a diferencia de lo que ocurre con la señalización dependiente de  $\beta$ -arrestinas, no sería necesaria la endocitosis del complejo receptor-transductor para la activación de la señalización sino que las proteínas del complejo efector serían reclutadas de forma secuencial a la membrana plasmática.

PalH se localiza en la membrana plasmática con ayuda de PalI y PalF. La alcalinización del ambiente provocaría una serie de reordenamientos en el receptor en el que estarían implicados la Phe319 y Trp332, quizás modulando la torsión de la Pro316 del TM6, que finalizarían con la activación de PalH. PalH activado sería capaz de reclutar o de aumentar la afinidad de PalF por él. La unión de la arrestina PalF a PalH activado, aumentaría la estabilidad de la arrestina en la membrana plasmática, y a su vez la haría accesible a la fosforilación y ubiquitinación. La ubiquitinación junto con los 4 dominios SXP presentes en PalF reclutarían a la proteína del ESCRT-I, Vps23, a través de su dominio UEV. De esta manera, a través de Vps23 se reclutaría al resto de componentes ESCRT [21]. Una vez localizados los complejos ESCRT en la membrana plasmática, la presencia de Vps32, un componente del ESCRT-III, reclutaría a PalC [21]. No se sabe cuál es la función concreta de PalC aunque su presencia es necesaria para reclutar a PalA a los complejos de señalización [21]. A su vez, la presencia de PalA es necesaria para que PalB se localice en los focos de señalización (Galindo, comunicación directa, resultados no publicados). PalA recluta a PalC a través de los dos

motivos YPxL/I presentes en PacC [23]. A su vez, PalB interacciona con Vps24 [24] y entonces PacC es procesado a PacC<sup>53</sup>[18], liberándose además de su unión con PalA [19].



**Figura D.3-Modelo actual de la ruta *pal* de señalización en *Aspergillus nidulans*.** PalH, PalF y PalI forman el complejo sensor asociado a la membrana plasmática. PalH es el receptor de pH ambiental que cuando se activa por la alcalinización del medio, se fosforila y recluta a PalF. PalF a su vez se fosforila (P) y ubiquitina (Ub) en respuesta a la alcalinización del medio, de manera dependiente del pH y de PalH y parcialmente dependiente de PalI. La ubiquitinación de PalF es clave para la señalización ya que recluta a Vps23 (proteína del ESCRT-I), a la membrana plasmática. Vps23 reclutaría a ESCRT-II y después a ESCRT-III. La proteína de ESCRT-III, Vps32, a su vez recluta a PalC y a PalA. Esto permite que PacC<sup>72</sup> se reclute a través de su interacción con PalA. La proteasa señalizadora, probablemente PalB, es reclutada por Vps24 (otro componente de ESCRT-III) y corta a PacC<sup>72</sup> en la caja señalizadora (eliminando su extremo C-terminal inhibitorio) y da lugar a PacC<sup>53</sup>. PacC<sup>53</sup> es procesada por el proteasoma que provoca la degradación en la región 252-254 para dar lugar a PacC<sup>27</sup>. PacC<sup>72</sup> tiene localización citoplásmica y nuclear, mientras que PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup> se localizan exclusivamente en el núcleo.

Hay diversas cuestiones que quedan por resolver, como por ejemplo cual es el papel de PalC y PalA en la formación y/o estabilización de los complejos ESCRT; demostrar si PalB es la proteasa señalizadora y como se activa.

## Discusión

Respecto a las proteínas del complejo receptor-transductor, diversas son las cuestiones que se han ido planteando a lo largo de esta discusión. Como ya se ha comentado con anterioridad, todavía no está claro quién regula el tráfico de PalH. Además, aunque los indicios parecen indicar que PalH y PalF interactúan independientemente del pH, hacen falta estudios adicionales que corroboren esa idea. Un posible abordaje sería a través de estudios de *cross-linking* en condiciones ácidas y alcalinas. Si existiese una interacción independientemente del pH, se desconoce cuál podría ser su función, aunque una posible hipótesis es que esa interacción tuviese una función reguladora de los niveles de PalH en la membrana plasmática. Otra pregunta que plantea este trabajo es el papel de la dimerización u oligomerización de PalH. Se desconoce si la dimerización refuerza la señal o estabiliza a PalH en membrana. En los GPCRs se desconoce la función concreta de la dimerización [215] aunque se especula que pueda participar en la atenuación de la señal por  $\beta$ -arrestinas ya que los dominios N y C de éstas son capaces de unirse a los GPCRs [6], o pueda tener un papel en el plegamiento proteico o en la salida del retículo y del Golgi. Por otro lado, queda estudiar a fondo el papel de PalI.

Discusión

***CONCLUSIONES***

## 6-CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de esta tesis doctoral son las siguientes:

1-PalH es el receptor de pH ambiental.

2-La Phe319 y el Trp332 de PalH juegan un papel clave en la activación de PalH.

3-Una serie de residuos de PalH situados en el segundo bucle extracelular y sus alrededores son críticos para la señalización.

4-PalH se fosforila exclusivamente a pH alcalino.

5-La fosforilación de PalH no sirve como señal para reclutar a PalF, ni es esencial para la señalización.

6-La endocitosis de PalH no es necesaria para la señalización por pH.

7-PalF se localiza *per se* en la membrana plasmática.

8-La sola localización en membrana plasmática de PalF activa la señalización.

9-PalF y PalH colaboran mutuamente para localizarse en la membrana plasmática.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

## 7-BIBLIOGRAFÍA

1. Rodbell M (1994) Signal Transduction: Evolution of an idea. Nobel Lecture: 18.
2. Birnbaumer L (2007) The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochim Biophys Acta* 1768: 756-771.
3. Lefkowitz RJ (2000) The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol* 2: E133-136.
4. Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69: 511-534.
5. Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ (2011) Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* 36: 457-469.
6. Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308: 512-517.
7. Denison SH, Orejas M, Arst HN, Jr. (1995) Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J Biol Chem* 270: 28519-28522.
8. Maccheroni W, Jr., May GS, Martinez-Rossi NM, Rossi A (1997) The sequence of palF, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 194: 163-167.
9. Denison SH, Negrete-Urtasun S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer WA, et al. (1998) Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *saccharomyces* are homologous. *Mol Microbiol* 30: 259-264.
10. Negrete-Urtasun S, Denison SH, Arst HN, Jr. (1997) Characterization of the pH signal transduction pathway gene palA of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J Bacteriol* 179: 1832-1835.
11. Negrete-Urtasun S, Reiter W, Diez E, Denison SH, Tilburn J, et al. (1999) Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol Microbiol* 33: 994-1003.
12. Tilburn J, Sanchez-Ferrero JC, Reoyo E, Arst HN, Jr., Penalva MA (2005) Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. *Genetics* 171: 393-401.

## Bibliografía

13. Calcagno-Pizarelli AM, Negrete-Urtasun S, Denison SH, Rudnicka JD, Bussink HJ, et al. (2007) Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot Cell* 6: 2365-2375.
14. Galindo A, Hervas-Aguilar A, Rodriguez-Galan O, Vincent O, Arst HN, Jr., et al. (2007) PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic* 8: 1346-1364.
15. Mingot JM, Tilburn J, Diez E, Bignell E, Orejas M, et al. (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol Cell Biol* 19: 1390-1400.
16. Diez E, Alvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suarez T, et al. (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J* 21: 1350-1359.
17. Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN, Jr., et al. (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.
18. Hervas-Aguilar A, Rodriguez JM, Tilburn J, Arst HN, Jr., Penalva MA (2007) Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J Biol Chem* 282: 34735-34747.
19. Herranz S, Rodriguez JM, Bussink HJ, Sanchez-Ferrero JC, Arst HN, Jr., et al. (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12141-12146.
20. Hervas-Aguilar A, Galindo A, Penalva MA (2010) Receptor-independent Ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. *J Biol Chem* 285: 18095-18102.
21. Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN, Jr., Penalva MA (2012) An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J Cell Sci* 125: 1784-1795.
22. Galindo A (2009) Las proteínas con dominio Bro1 de la ruta *pal*: su papel en la transducción de la señal de pH en *Aspergillus nidulans*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
23. 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.
24. Rodriguez-Galan O, Galindo A, Hervas-Aguilar A, Arst HN, Jr., Penalva MA (2009) Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated

## Bibliografía

- recruitment of Aspergillus PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J Biol Chem* 284: 4404-4412.
25. Tobin AB (2009) G-protein-coupled receptor structure: what can we learn? *F1000 Biol Rep* 1: 11.
  26. Wiener N (1961) *Cybernetics*. MIT Press.
  27. Erhlich P (1913) *Lancet* 2: 6.
  28. Langley JN (1909) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances: Part IV. The effect of curari and of some other substances on the nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. *J Physiol* 39: 235-295.
  29. Limbird LE (1996) *Cell Surface Receptors: a Short Course on Theory and Methods*. Boston, Massachusetts: Kluwer Academic.
  30. Lagerstrom MC, Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7: 339-357.
  31. Stryer L (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* 9: 87-119.
  32. Hargrave PA, McDowell JH, Curtis DR, Wang JK, Juszczak E, et al. (1983) The structure of bovine rhodopsin. *Biophys Struct Mech* 9: 235-244.
  33. Ovchinnikov Yu A (1982) Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Lett* 148: 179-191.
  34. Nathans J, Hogness DS (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34: 807-814.
  35. Hubbard R (1954) The molecular weight of rhodopsin and the nature of the rhodopsin-digtonin complex. *J Gen Physiol* 37: 381-399.
  36. Caron MG, Srinivasan Y, Pitha J, Kociolek K, Lefkowitz RJ (1979) Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 254: 2923-2927.
  37. Wood CL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1979) Separation of solubilized alpha and beta adrenergic receptors by affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 88: 1-8.
  38. Caron MG, Limbird LE, Lefkowitz RJ (1979) Biochemical characterization of the beta-adrenergic receptor of the frog erythrocyte. *Mol Cell Biochem* 28: 45-66.
  39. Brandt DR, Asano T, Pedersen SE, Ross EM (1983) Reconstitution of catecholamine-stimulated guanosinetriphosphatase activity. *Biochemistry* 22: 4357-4362.

## Bibliografía

40. Cerione RA, Codina J, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Birnbaumer L, et al. (1984) The mammalian beta 2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry* 23: 4519-4525.
41. Cerione RA, Sibley DR, Codina J, Benovic JL, Winslow J, et al. (1984) Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system. The pure beta-adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confer hormone responsiveness on the resolved catalytic unit. *J Biol Chem* 259: 9979-9982.
42. May DC, Ross EM, Gilman AG, Smigel MD (1985) Reconstitution of catecholamine-stimulated adenylate cyclase activity using three purified proteins. *J Biol Chem* 260: 15829-15833.
43. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, et al. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321: 75-79.
44. Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, et al. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455: 497-502.
45. Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454: 183-187.
46. Park PS, Lodowski DT, Palczewski K (2008) Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 107-141.
47. Violin JD, Lefkowitz RJ (2007) Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 416-422.
48. Standfuss J, Edwards PC, D'Antona A, Fransen M, Xie G, et al. (2011) The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* 471: 656-660.
49. Choe HW, Park JH, Kim YJ, Ernst OP (2011) Transmembrane signaling by GPCRs: insight from rhodopsin and opsin structures. *Neuropharmacology* 60: 52-57.
50. Deupi X, Edwards P, Singhal A, Nickle B, Oprian D, et al. (2012) Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 119-124.
51. Westfield GH, Rasmussen SG, Su M, Dutta S, DeVree BT, et al. (2011) Structural flexibility of the G alpha s alpha-helical domain in the beta2-adrenoceptor Gs complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16086-16091.
52. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, et al. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469: 175-180.

## Bibliografía

53. Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, et al. (2011) Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* 332: 322-327.
54. Lebon G, Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, et al. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* 474: 521-525.
55. Schioth HB, Fredriksson R (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* 142: 94-101.
56. Attwood TK, Findlay JB (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 7: 195-203.
57. Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2: 1-7.
58. Xue C, Hsueh YP, Heitman J (2008) Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32: 1010-1032.
59. Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366: 381-416.
60. Kobilka BK, Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 397-406.
61. Nygaard R, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Schwartz TW (2009) Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* 30: 249-259.
62. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 531-556.
63. Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 481-519.
64. Liu JJ, Horst R, Katritch V, Stevens RC, Wuthrich K (2012) Biased signaling pathways in beta2-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR. *Science* 335: 1106-1110.
65. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, et al. (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477: 549-555.
66. Vogel R, Mahalingam M, Ludeke S, Huber T, Siebert F, et al. (2008) Functional role of the "ionic lock"--an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors. *J Mol Biol* 380: 648-655.

## Bibliografía

67. Warne T, Serrano-Vega MJ, Tate CG, Schertler GF (2009) Development and crystallization of a minimal thermostabilised G protein-coupled receptor. *Protein Expr Purif* 65: 204-213.
68. Li B, Nowak NM, Kim SK, Jacobson KA, Bagheri A, et al. (2005) Random mutagenesis of the M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in yeast: identification of second-site mutations that restore function to a coupling-deficient mutant M3 receptor. *J Biol Chem* 280: 5664-5675.
69. Biebermann H, Schoneberg T, Schulz A, Krause G, Gruters A, et al. (1998) A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling. *FASEB J* 12: 1461-1471.
70. Shi L, Liapakis G, Xu R, Guarnieri F, Ballesteros JA, et al. (2002) Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem* 277: 40989-40996.
71. Katritch V, Reynolds KA, Cherezov V, Hanson MA, Roth CB, et al. (2009) Analysis of full and partial agonists binding to beta2-adrenergic receptor suggests a role of transmembrane helix V in agonist-specific conformational changes. *J Mol Recognit* 22: 307-318.
72. Vilar S, Karpiak J, Berk B, Costanzi S (2011) In silico analysis of the binding of agonists and blockers to the beta2-adrenergic receptor. *J Mol Graph Model* 29: 809-817.
73. Pfister C, Chabre M, Plouet J, Tuyen VV, De Kozak Y, et al. (1985) Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228: 891-893.
74. Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, et al. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8879-8882.
75. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248: 1547-1550.
76. Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, et al. (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267: 17882-17890.
77. Boase NA, Kelly JM (2004) A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol Microbiol* 53: 929-940.
78. Alvarez CE (2008) On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 8: 222.
79. Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C (2001) Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* 9: 869-880.

80. Gurevich VV, Gurevich EV (2004) The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* 25: 105-111.
81. Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* 278: 14498-14506.
82. Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375: 503-515.
83. Lefkowitz RJ, Hausdorff WP, Caron MG (1990) Role of phosphorylation in desensitization of the beta-adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* 11: 190-194.
84. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69: 483-510.
85. Shenoy SK (2007) Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circ Res* 100: 1142-1154.
86. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, et al. (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 281: 1261-1273.
87. Resnick LM, Gupta RK, Sosa RE, Corbett ML, Laragh JH (1987) Intracellular pH in human and experimental hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7663-7667.
88. Orłowski J, Grinstein S (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* 447: 549-565.
89. Madshus IH (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* 250: 1-8.
90. Bignell E (2012) The Molecular Basis of pH Sensing, Signaling, and Homeostasis in Fungi. *Adv Appl Microbiol* 79: 1-18.
91. Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F (2005) Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal* 17: 1466-1476.
92. Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, et al. (2003) Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425: 93-98.
93. Justus CR, Dong L, Yang LV (2013) Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* 4: 354.
94. Okajima F (2013) Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cell Signal* 25: 2263-2271.

95. Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* 319: 689-693.
96. Martinez-Munoz GA, Kane P (2008) Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 283: 20309-20319.
97. Hesse SJ, Ruijter GJ, Dijkema C, Visser J (2002) Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem* 269: 3485-3494.
98. Bowman EJ, Kendle R, Bowman BJ (2000) Disruption of *vma-1*, the gene encoding the catalytic subunit of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase, causes severe morphological changes in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 275: 167-176.
99. Bowman EJ, Bowman BJ (2000) Cellular role of the V-ATPase in *Neurospora crassa*: analysis of mutants resistant to concanamycin or lacking the catalytic subunit A. *J Exp Biol* 203: 97-106.
100. Dechant R, Binda M, Lee SS, Pelet S, Winderickx J, et al. (2010) Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J* 29: 2515-2526.
101. Barwell KJ, Boysen JH, Xu W, Mitchell AP (2005) Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 4: 890-899.
102. Su SS, Mitchell AP (1993) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* 133: 67-77.
103. Futai E, Maeda T, Sorimachi H, Kitamoto K, Ishiura S, et al. (1999) The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol Gen Genet* 260: 559-568.
104. 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.
105. Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Phillips TD, Burow GB (1997) pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87: 643-648.
106. Penalva MA, Arst HN, Jr. (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 426-446, table of contents.
107. Penalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN, Jr. (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* 16: 291-300.

## Bibliografía

108. Davis D, Edwards JE, Jr., Mitchell AP, Ibrahim AS (2000) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 68: 5953-5959.
109. Nobile CJ, Solis N, Myers CL, Fay AJ, Deneault JS, et al. (2008) *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol* 10: 2180-2196.
110. Bignell E, Negrete-Urtasun S, Calcagno AM, Haynes K, Arst HN, Jr., et al. (2005) The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol* 55: 1072-1084.
111. Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, et al. (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med* 200: 1213-1219.
112. Caracuel Z, Roncero MI, Espeso EA, Gonzalez-Verdejo CI, Garcia-Maceira FI, et al. (2003) The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 48: 765-779.
113. Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, et al. (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun* 72: 1760-1766.
114. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AW (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5: 141-238.
115. Thom CR, K. B. (1945) A manual of the Aspergilli. Baltimore: Williams and Wilkins.
116. Casselton L, Zolan M (2002) The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* 3: 683-697.
117. Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, et al. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105-1115.
118. Todd RB, Davis MA, Hynes MJ (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* 2: 811-821.
119. Todd RB, Davis MA, Hynes MJ (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* 2: 822-830.
120. 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.

## Bibliografía

121. Caddick MX, Brownlee AG, Arst HN, Jr. (1986) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 203: 346-353.
122. Penalva MA, Arst HN, Jr. (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 58: 425-451.
123. Arst HN, Jr., Rand KN, Bailey CR (1979) Do the tightly linked structural genes for nitrate and nitrite reductases in *Aspergillus nidulans* form an operon? Evidence from an insertional translocation which separates them. *Mol Gen Genet* 174: 89-100.
124. 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.
125. Davis DA, Bruno VM, Loza L, Filler SG, Mitchell AP (2002) *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* 162: 1573-1581.
126. Lamb TM, Mitchell AP (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23: 677-686.
127. Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, et al. (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 43614-43624.
128. Spielvogel A, Findon H, Arst HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P, et al. (2008) Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 414: 419-429.
129. Hernandez-Ortiz P, Espeso EA (2013) Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 89: 532-551.
130. Arst HN, Penalva MA (2003) pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet* 19: 224-231.
131. Arst HN, Jr., Bignell E, Tilburn J (1994) Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 245: 787-790.
132. Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, et al. (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.
133. Arst HN, Jr., Penalva MA (2003) Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal Genet Biol* 40: 1-3.

134. 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.
135. Hutchings H, Stahmann KP, Roels S, Espeso EA, Timberlake WE, et al. (1999) The multiply-regulated *gabA* gene encoding the GABA permease of *Aspergillus nidulans*: a score of exons. *Mol Microbiol* 32: 557-568.
136. Espeso EA, Roncal T, Diez E, Rainbow L, Bignell E, et al. (2000) On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J* 19: 719-728.
137. MacCabe AP, Orejas M, Tamayo EN, Villanueva A, Ramon D (2002) Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *J Biotechnol* 96: 43-54.
138. Espeso EA, Tilburn J, Sanchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, et al. (1997) Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 274: 466-480.
139. Mingot JM, Espeso EA, Diez E, Penalva MA (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol* 21: 1688-1699.
140. Hervás-Aguilar A (2007) Procesamiento proteolítico del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*: Universidad Complutense de Madrid.
141. Fernández-Martínez J (2007) Mecanismos y señales que regulan el transporte nuclear del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*: Universidad Complutense de Madrid.
142. Fernandez-Martinez J, Brown CV, Diez E, Tilburn J, Arst HN, Jr., et al. (2003) Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* 334: 667-684.
143. Herrador A, Herranz S, Lara D, Vincent O (2010) Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol Cell Biol* 30: 897-907.
144. Luhtala N, Odorizzi G (2004) Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* 166: 717-729.
145. Nikko E, Marini AM, Andre B (2003) Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. *J Biol Chem* 278: 50732-50743.

## Bibliografía

146. Odorizzi G, Katzmann DJ, Babst M, Audhya A, Emr SD (2003) Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 116: 1893-1903.
147. Sadoul R (2006) Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse? *Biol Cell* 98: 69-77.
148. Mattei S, Klein G, Satre M, Aubry L (2006) Trafficking and developmental signaling: Alix at the crossroads. *Eur J Cell Biol* 85: 925-936.
149. Xu W, Mitchell AP (2001) Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* 183: 6917-6923.
150. Futai E, Kubo T, Sorimachi H, Suzuki K, Maeda T (2001) Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus atypicus* calpain PalB. *Biochim Biophys Acta* 1517: 316-319.
151. Sorimachi H, Suzuki K (2001) The structure of calpain. *J Biochem* 129: 653-664.
152. Rodríguez-Galán O (2008) Estudios Celular y Molecular del Complejo ESCRT-III de *Aspergillus nidulans* y su relación con la señalización de pH ambiental. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
153. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905.
154. Hurley JH (2010) The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 463-487.
155. Castrejon F, Gomez A, Sanz M, Duran A, Roncero C (2006) The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryot Cell* 5: 507-517.
156. Platara M, Ruiz A, Serrano R, Palomino A, Moreno F, et al. (2006) The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* 281: 36632-36642.
157. Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR, Arino J (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* 46: 1319-1333.
158. Davis D (2003) Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet* 44: 1-7.
159. Li M, Martin SJ, Bruno VM, Mitchell AP, Davis DA (2004) *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot Cell* 3: 741-751.

## Bibliografía

160. Ramon AM, Fonzi WA (2003) Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryot Cell* 2: 718-728.
161. Baek YU, Martin SJ, Davis DA (2006) Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall beta-glycosidase Phr2. *Eukaryot Cell* 5: 1550-1559.
162. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A (2007) Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun* 75: 2126-2135.
163. Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24.
164. Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* 123: 305-320.
165. Rodal AA, Kozubowski L, Goode BL, Drubin DG, Hartwig JH (2005) Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. *Mol Biol Cell* 16: 372-384.
166. Young ME, Cooper JA, Bridgman PC (2004) Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *J Cell Biol* 166: 629-635.
167. Huckaba TM, Gay AC, Pantalena LF, Yang HC, Pon LA (2004) Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 167: 519-530.
168. Kaksonen M, Sun Y, Drubin DG (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* 115: 475-487.
169. Jonsdottir GA, Li R (2004) Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Curr Biol* 14: 1604-1609.
170. Hervas-Aguilar A, Penalva MA (2010) Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 9: 1504-1518.
171. Upadhyay S, Shaw BD (2008) The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 68: 690-705.
172. Penalva MA (2010) Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* 13: 684-692.
173. Pelham HR (2002) Insights from yeast endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14: 454-462.

## Bibliografía

174. Lewis MJ, Nichols BJ, Prescianotto-Baschong C, Riezman H, Pelham HR (2000) Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* 11: 23-38.
175. Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, et al. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* 19: 4577-4588.
176. Cowles CR, Odorizzi G, Payne GS, Emr SD (1997) The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* 91: 109-118.
177. Kirchhausen T (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 705-732.
178. Phillips SA, Barr VA, Haft DH, Taylor SI, Haft CR (2001) Identification and characterization of SNX15, a novel sorting nexin involved in protein trafficking. *J Biol Chem* 276: 5074-5084.
179. Bonifacino JS, Hurley JH (2008) Retromer. *Curr Opin Cell Biol* 20: 427-436.
180. Black MW, Pelham HR (2000) A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins. *J Cell Biol* 151: 587-600.
181. McNiven MA, Thompson HM (2006) Vesicle formation at the plasma membrane and trans-Golgi network: the same but different. *Science* 313: 1591-1594.
182. Prescianotto-Baschong C, Riezman H (1998) Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol Biol Cell* 9: 173-189.
183. Prescianotto-Baschong C, Riezman H (2002) Ordering of compartments in the yeast endocytic pathway. *Traffic* 3: 37-49.
184. Pelham HR (1999) SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. *Exp Cell Res* 247: 1-8.
185. Levine TP, Munro S (2002) Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol* 12: 695-704.
186. Burd CG, Babst M, Emr SD (1998) Novel pathways, membrane coats and PI kinase regulation in yeast lysosomal trafficking. *Semin Cell Dev Biol* 9: 527-533.
187. Pfeffer SR (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol* 11: 487-491.
188. Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-117.

## Bibliografía

189. Cove DJ (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 113: 51-56.
190. Mooney JL, Yager LN (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* 4: 1473-1482.
191. Clutterbuck AJ (1990) *Aspergillus nidulans*.
192. Sambrook J, Fritsch E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
193. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, et al. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 205-221.
194. Stimpson HE, Lewis MJ, Pelham HR (2006) Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J* 25: 662-672.
195. Yang L, Ukil L, Osmani A, Nahm F, Davies J, et al. (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.
196. 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.
197. Nicholas KB, Nicholas H.B.Jr., & Deerfield, D.W. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 4.
198. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363.
199. Yao X, Parnot C, Deupi X, Ratnala VR, Swaminath G, et al. (2006) Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. *Nat Chem Biol* 2: 417-422.
200. Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H, et al. (1997) Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *EMBO J* 16: 6737-6747.
201. Bailey RJ, Hay DL (2007) Agonist-dependent consequences of proline to alanine substitution in the transmembrane helices of the calcitonin receptor. *Br J Pharmacol* 151: 678-687.
202. Rajagopal K, Lefkowitz RJ, Rockman HA (2005) When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J Clin Invest* 115: 2971-2974.
203. Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazan L, Dou X, Espeso EA, et al. (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 19: 1439-1449.

## Bibliografía

204. Pantazopoulou A, Penalva MA (2011) Characterization of *Aspergillus nidulans* RabC/Rab6. *Traffic* 12: 386-406.
205. Yamashita RA, May GS (1998) Constitutive activation of endocytosis by mutation of myoA, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 273: 14644-14648.
206. Benedetti H, Raths S, Crausaz F, Riezman H (1994) The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol Biol Cell* 5: 1023-1037.
207. Lee SC, Schmidtke SN, Dangott LJ, Shaw BD (2008) *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot Cell* 7: 1278-1288.
208. Gillingham AK, Munro S (2007) The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 579-611.
209. Weinberg J, Drubin DG (2012) Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol* 22: 1-13.
210. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274: 32248-32257.
211. Stefan CJ, Audhya A, Emr SD (2002) The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *Mol Biol Cell* 13: 542-557.
212. Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R (2013) RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)* 3: 2233-2238.
213. Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T (2004) G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 279: 42484-42491.
214. Im DS (2005) Two ligands for a GPCR, proton vs lysolipid. *Acta Pharmacol Sin* 26: 1435-1441.
215. Gurevich VV, Gurevich EV (2008) How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol Sci* 29: 234-240.
216. Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA (2001) G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 92: 71-87.
217. Tobin AB (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S167-176.

## Bibliografía

218. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, et al. (2011) Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal* 4: ra51.
219. Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, et al. (2011) Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem* 286: 11506-11518.
220. Toshima JY, Nakanishi J, Mizuno K, Toshima J, Drubin DG (2009) Requirements for recruitment of a G protein-coupled receptor to clathrin-coated pits in budding yeast. *Mol Biol Cell* 20: 5039-5050.
221. Hicke L, Zanolari B, Riezman H (1998) Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* 141: 349-358.
222. Wolfe BL, Trejo J (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8: 462-470.
223. Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2011) beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 32: 521-533.
224. Roux BC, G. (2014) G Protein-Coupled Receptors: What a Difference a 'Partner' Makes. *Int J Mol Sci* 15: 1112-1142.
225. de Beer T, Hoofnagle AN, Enmon JL, Bowers RC, Yamabhai M, et al. (2000) Molecular mechanism of NPF recognition by EH domains. *Nat Struct Biol* 7: 1018-1022.
226. Obara K, Yamamoto H, Kihara A (2012) Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 287: 38473-38481.
227. Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD (2003) Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 162: 413-423.