

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Coordinación de los mecanismos reguladores que median en  
Aspergillus nidulans la respuesta a la alcalinización  
extracelular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Irene Picazo Domínguez**

Director

**Eduardo Antonio Espeso Fernández**

Madrid

© Irene Picazo Domínguez, 2023

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

COORDINACIÓN DE LOS MECANISMOS REGULADORES QUE MEDIAN EN  
*Aspergillus nidulans* LA RESPUESTA A LA ALCALINIZACIÓN EXTRACELULAR

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Irene Picazo Domínguez

DIRECTOR

Eduardo Antonio Espeso Fernández



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

***Coordinación de los mecanismos  
reguladores que median en *Aspergillus  
nidulans* la respuesta a la alcalinización  
extracelular***

**Programa de Doctorado en Biología**

Memoria para optar al grado de Doctora presentada por:

**Irene Picazo Domínguez**

Madrid, 2023

Director: Eduardo Antonio Espeso Fernández





Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Doctor Eduardo Antonio Espeso Fernández.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado a través de diferentes proyectos:

- Programa Retos 2018 financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, la Agencia Estatal de Investigación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). RTI2018-094263B-I00.



- Las Ayudas Especiales a la Preparación de Proyectos. 2021AEP108.



- Proyectos Estratégicos Orientados a la Transición Ecológica y a la Transición Digital 2021 financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación, la Agencia Estatal de Investigación y por los fondos Next Generation EU. TED2021-129607B-I00.





***A mi familia  
y amigos***



## Agradecimientos

Cuando comencé en el laboratorio durante mi trabajo de fin de grado, leía las tesis doctorales que había por el “labo”, y siempre me gustaba parar a leer esta sección donde se percibe la emoción del crecimiento científico y personal de sus autores. Ahora, con mi manuscrito terminado, mis agradecimientos no serán muy diferentes de los leídos en otras tesis, pero es muy emocionante poder estar escribiéndolos.

En primer lugar quería dar las gracias a mi director de tesis, Edu. Nunca estaré lo suficientemente agradecida por la primera oportunidad de entrar en el “labo” para hacer el TFG, ni de la segunda para el TFM, y la tercera con esta tesis. Has sido y eres un gran mentor, consejero y jefe. Gracias también por la increíble paciencia que has tenido mientras empezaba en el duro camino investigador, me siento muy afortunada de haber podido aprender y trabajar en el campo de la genética en un laboratorio como el tuyo.

Miguel, prometí que intentaría ser breve, pero quería agradecerte por aquí desde las clases sobre el manejo del microscopio de fluorescencia como una “pro”, o cómo evitar la contaminación de placas Petri en ausencia de mechero, hasta tus consejos para sacarme de algún que otro bloqueo mental surgido en el proceso de escritura.

Muchas gracias a la compañía de los laboratorios “de chicos” y “de chicas”, a los que están y a los que estuvieron. Gracias a Mario, Juan, Marisa, Sara, Silvia e Ignacio por el apoyo todo este tiempo, el compañerismo, los desayunos imperiales y las risas. Gracias también a Miguelito, Elereq, Irene Tomico y Ana por hacer mi comienzo en la carrera científica algo inolvidable.

Saliendo del laboratorio, también hay personas que han “sufrido” conmigo esta aventura doctoral. Me gustaría agradecer a mi familia todo el apoyo y el ánimo que me han dado siempre. Mamá, Pablo, Abuela, Tías y Tíos, os quiero mucho, procuraré recuperar con vosotros el tiempo que he invertido en esta tesis. A mis amigos, mis “Topes”, “las jarritas” sanabresas, y la “*spanish inquisition*” biológica, gracias, gracias y mil gracias más, sin todos vosotros amenizando mi vida fuera del “labo” este viaje habría sido menos fructífero y más aburrido. Antonio gracias por tu paciencia y apoyo durante literalmente toda la tesis, desde el mensaje deseándome suerte en mi primer congreso en Roma a la última felicitación por haber terminado de escribir la memoria, te quiero.



## Índice

Glosario .....	1
Resumen .....	3
Summary .....	8
Bibliografía del Resumen y Summary .....	11
Introducción .....	13
1. Los factores de transcripción .....	15
2. Los hongos filamentosos y su versatilidad adaptativa .....	19
3. El sistema de regulación transcripcional Pal/PacC .....	22
4. El sistema de regulación transcripcional SlT .....	30
Objetivos .....	35
Materiales y métodos .....	39
1. Medios de cultivo .....	41
2. Ensayos de estrés ambiental .....	42
3. Listado de cepas y oligonucleótidos .....	44
4. Extracción de DNA genómico .....	48
5. Extracción de RNA total .....	49
6. Protocolos básicos y avanzados de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR .....	49
7. Protocolo de PCR cuantitativa, qPCR .....	51
8. Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	52
9. Cruces de cepas y selección de progenie .....	54
10. Obtención de extractos totales de proteína y Western Blot .....	55
11. Microscopía de epifluorescencia .....	57
12. Herramientas bioinformáticas .....	58
12.1. Análisis de datos de secuenciación masiva de RNA .....	58
12.2. Análisis estadísticos de los perfiles de expresión génica por qPCR .....	58
12.3. Análisis <i>in silico</i> de la familia ALR .....	59
Resultados .....	61
Capítulo 1. Respuesta al estrés del sistema SlT .....	63
1.1. Efecto del estrés ambiental en la dinámica del procesamiento proteolítico de SlTA ...	63
1.2. Perfil de expresión de los genes <i>sltA</i> y <i>sltB</i> en condiciones de estrés abiótico .....	65
Capítulo 2. Patrón de la expresión génica en respuesta a la alcalinización del medio y la	
salinidad; el papel regulador de SlTA .....	69
2.1. Estrategia y evaluación de los datos del análisis transcriptómico .....	69
2.2. Papel transcripcional de SlTA en ausencia de estrés .....	72
2.3. Efecto transcripcional de la alcalinización del medio extracelular .....	76
2.4. Papel regulador de SlTA a pH alcalino .....	79
2.5. Efecto transcripcional de una elevada concentración de sodio en el medio extracelular	
.....	83
2.6. Papel regulador de SlTA en presencia de altos niveles de sodio extracelular .....	86

Capítulo 3. El sistema Pal/PacC como diana del factor transcripcional SltA.....	91
3.1 Regulación de la expresión de <i>pacC</i> utilizando la técnica de qPCR .....	91
3.2. Desacoplamiento entre transcripción y traducción de PacC .....	94
3.3. PalF: Regulación de su nivel de expresión y modificaciones post-traduccionales.....	97
3.4. Señalización de la ruta Pal a pH alcalino: localización subcelular de Vps23 .....	100
3.5. Efecto de la delección de <i>sltA</i> en la localización celular de PalA .....	103
Capítulo 4. Estableciendo la relación entre SltA y el regulador negativo PacX.....	105
4.1. Estudio de los niveles de expresión de <i>pacX</i> en condiciones de estrés y su dependencia de SltA. ....	106
4.2. Relación genética entre <i>sltA</i> y <i>pacX</i> . Estudio fenotípico de las cepas doble mutantes <i>slt<sup>-</sup> pacX20</i> .....	107
4.3. Efecto de <i>pacX20</i> sobre los niveles de expresión de <i>sltA</i> , <i>pacC</i> y <i>palF</i> .....	108
4.4. Niveles de proteína PacC y PalF en mutantes <i>pacX20</i> .....	110
4.5. Niveles de proteína PacX y su localización celular en ausencia de función SltA.....	114
Capítulo 5. Rescate del correcto procesamiento de PacC .....	119
5.1. Estudio del efecto de formas mutantes SltA ( <i>sltBΔ</i> SltA <sup>78kDa</sup> , <i>sltA1</i> , <i>sltA60</i> ) .....	119
5.2. Análisis del procesamiento de PacC a tiempos largos de exposición al pH alcalino y efecto conjunto del pH alcalino y el calcio .....	121
5.3. Estudio del procesamiento proteolítico de PacC <sup>72kDa</sup> en ausencia de las funciones PalB y SltA.....	123
5.4. Efecto de la delección de <i>sltA</i> durante la activación constitutiva de la ruta Pal .....	126
5.5. Efecto de la ausencia de SltA en un mutante de mimesis de alcalinidad (I): El alelo <i>pacC14900</i> .....	128
5.6. Efecto de la ausencia de SltA en un mutante de mimesis de alcalinidad (II): El alelo <i>pacC700</i> .....	131
Capítulo 6. Estudios de posibles efectores de la función SltA y de la respuesta al estrés... 133	
6.1. Transportadores de magnesio.....	133
6.2. Estudio del gen <i>AN7792</i> codificante de una lisofosfolipasa .....	140
6.3. Regulación de la proteína activadora de la función GTPasa de Rab7, <i>AN6618</i> (AnGYP7) .....	142
6.4. Localización y detección de las ATPasas EnaA y EnaB en el fondo <i>sltAΔ</i> .....	145
6.5. Análisis funcional de los homólogos IST2 en <i>A. nidulans</i> .....	148
Discusión .....	153
1. El significado de la respuesta transcripcional al sodio y al pH alcalino ambiental .....	155
2. El modelo de regulación del sistema Slt en respuesta a estrés ambiental.....	158
3. La conexión entre los sistemas Slt y Pal/PacC: la importancia de la función SltA sobre PacC.....	162
Conclusiones .....	173
Bibliografía.....	177

## Glosario

Af: *Aspergillus fumigatus*

cAMP/PKA: proteína quinasa A dependiente de adenosín monofosfato cíclico

cDNA: hebra de DNA complementaria

Crz: "Calcineurin-responsive zinc finger protein"

DNA: Ácido desoxiribonucleico, ADN

DTT: 1,4-ditiotreitol

EMSA: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

ESCRT: *Endosomal sorting complex required for transport*

FT (TF): Factor de transcripción (*Transcription factor*)

gDNA: DNA genómico

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

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

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

kb: kilobase

kDa: kilo Dalton

MAPK: "Mitogen-Activated Protein Kinase"

MIT: "Microtubule Interacting and Trafficking domain"

MPT: Modificación post-traducciona

mRFP: proteína fluorescente roja (*Monomeric Red Fluorescent Protein*)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MVB: "Multivesicular Body"

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

p/v: peso/volumen

Paba: Ácido para-aminobenzoico

PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

pb: pares de bases

PBS: Solución tampón fosfato, (*Phosphate buffer solution*)

PCA: Análisis de componentes principales, (*Principal Component Analysis*)

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

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

PEG: Polietilenglicol

PSA: Persulfato amónico

Pyro: piridoxina

Ribo: Riboflavina

RNA: Ácido ribonucleico, ARN

RNA Pol II: Enzima RNA Polimerasa II

RNAsa: Ribonucleasa

rpm: Revoluciones por minuto

RT: temperatura ambiente, ("*Room Temperature*")

SDS: Dodecilsulfato sódico

TAE: Solución tampón de electroforesis Tris-Acetato-EDTA

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: N, N, N, N-tetrametilendiamina

TPM: transcrito por millón de lecturas, ("*transcript per million reads*")

Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano

Ub: Ubiquitina o ubiquitinado

UTR: región no traducida, ("*Untranslated region*")

UV: radiación ultravioleta

v/v: volumen/volumen

Vps: *vesicular protein sorting*

WT: silvestre (*wild-type*)

xg: fuerza centrífuga relativa

Δ: delta, nulo, *knock-out* para referirse a mutantes con un gen deletado

°C: grados centígrados

# **Resumen/*Summary***



## Resumen

Los cambios en el patrón de transcripción y traducción de un organismo son el resultado de una respuesta a cambios en el ambiente intra o extracelular, que permiten la adaptación y supervivencia del organismo. El patrón transcripcional es dinámico y está sometido a la actividad de elementos reguladores como son los factores transcripcionales (FTs). La principal característica los FTs es la presencia de dominios de unión a DNA que reconocen secuencias diana en los genes bajo su dominio, permitiendo así regular positiva o negativamente su expresión (Lacthman 2003, Etxebeste and Espeso 2019). Además, la función de algunos FTs se activa solo en determinadas condiciones ambientales que activan rutas de señalización que resultan en modificaciones post-traduccionales de las formas primarias de los FTs. Entre los múltiples procesos de regulación transcripcional que pueden estudiarse, el estrés ambiental es un potente inductor de estas rutas y conlleva una coordinación entre diferentes sistemas de regulación transcripcional mediada por FTs dando lugar a las redes de regulación transcripcional ("*gene regulatory network*", GRN) (Etxebeste 2021, Brown et al., 2017).

Los hongos del filo Ascomycete configuran uno de los grupos más numerosos y diversos del reino Fungi gracias a su capacidad de adaptación a todo tipo de ambientes, algunos de ellos extremos. El hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* es un organismo modelo haploide usado en el estudio de estas redes de regulación transcripcional por su fácil manejo en el laboratorio que permite el uso de técnicas de genética clásica y en reverso (Mellado 2014). Además, al igual que el resto de hongos del filo, son muy versátiles en ambientes muy variados y resisten condiciones ambientales de estrés hídrico, osmótico, de ambientes alcalinos o de radiación UV.

El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio por un lado de los cambios transcripcionales en *A. nidulans* en condiciones de estrés ambiental por altas concentraciones de sodio o por pH alcalino ambiental, y por el otro de cómo los sistemas mediados por FTs que participan en esta respuesta se coordinan entre sí. En *A. nidulans* la respuesta a pH alcalino esta mediada por al menos tres sistemas cuyos FTs presentan un dominio de unión a DNA de tipo dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>: PacC, SltA y CrzA (Tilburn et al., 1995, Spielvogel et al., 2008). Estos FTs llevan a cabo su función como regulador transcripcional en condiciones de alcalinidad y/o de estrés por altas concentraciones de cationes, pero hasta el momento no se ha determinado si estos sistemas están interconectados o si existe una jerarquía entre ellos. El sistema Slt es el menos conocido

de los tres FTs y del cual se han descrito únicamente dos elementos: el factor transcripcional SltA y su proteasa procesativa SltB (O'neil et al., 2002, Mellado et al 2015). Este sistema a diferencia de PacC y CrzA, se encuentra únicamente en hongos del subfilo Pezizomycotina, donde es esencial para el desarrollo del hongo en ambientes de estrés catiónico o alcalino.

Tanto la respuesta transcripcional a estrés ambiental como el papel regulador de SltA, se ha estudiado mediante secuenciación masiva de RNA los diferentes patrones transcripcionales en una cepa silvestre y en una cepa mutante carente del gen *sltA* (*sltAΔ*), analizando las diferencias entre condiciones estándar y en condiciones de estrés por 1M de catión sodio y de pH alcalino (Picazo et al., 2020). Esta técnica nos permitió identificar las agrupaciones de genes con diferente grado de dependencia de la función SltA ya sea por regulación directa o indirecta. Entre dichos genes se encontraron grupos con un perfil de expresión similar al gen *sltB*, cuya expresión es dependiente de la función de SltA, y los cuales fueron estudiados usando técnicas de genética en reverso, así como ensayos de fenotipo o microscopía para determinar si alguno de ellos forma parte del sistema Slt.

Entre los genes cuya expresión estaba afectada en el fondo genético *sltAΔ* se encontró un amplio número de genes que codifican para FTs de diferentes tipos y entre los que se encontraba PacC. Este factor de transcripción cuenta con una forma primaria de 72kDa que es señalizada por la ruta Pal cuando el pH ambiental se alcaliniza, provocando la proteólisis a una forma intermedia de 53kDa que se procesa independientemente del pH en el proteosoma a su forma activa de 27kDa. El procesamiento de la forma primaria de PacC<sup>72kDa</sup> permite que los niveles de expresión del gen *pacC* se eleven a pH alcalino (Peñalva et al., 2014, Bussink et al., 2015). La ausencia de SltA afecta a este sistema tanto a nivel transcripcional evitando la elevación de los niveles de expresión de *pacC* a pH alcalino como a nivel de traducción donde se observa un patrón de procesamiento de las formas de PacC anómalo.

Usando diferentes estrategias de mutaciones en elementos de los sistemas Pal/PacC y Slt se pudieron delimitar los puntos de la ruta donde el papel de la proteína SltA parece ser determinante. La ausencia de función del regulador negativo de *pacC*, PacX (Bussink et al., 2015), y de SltA no rescató el patrón de procesamiento de PacC anómalo ni el fenotipo de tolerancia a pH alcalino. El estudio de la ruta Pal en un fondo genético *sltAΔ* evidenció que, a pesar de una señalización y modificación postraduccional deficiente de PalF, los elementos de la ruta Pal eran reclutados correctamente hasta el paso previo al procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup>. Por otro lado, mutaciones en *pacC* que

generaban formas similares a la intermedia y procesada eran capaces de rescatar el correcto procesamiento de PacC pero no así el fenotipo de tolerancia al pH alcalino en el fondo *sltAΔ*. Estos resultados evidencian que existe una coordinación en la respuesta a pH alcalino entre los sistemas Slt y Pal/PacC donde la función de SltA es epistática sobre el sistema de respuesta a pH alcalino Pal/PacC.



## Summary

Changes in the transcriptional and translational patterns of an organism are the result of a response to changes in the intra- or extracellular environment, allowing the organism to adapt and survive. The transcriptional pattern is dynamic and subject to the activity of regulatory elements such as transcription factors (TFs). The main characteristic of TFs is their DNA-binding domains, which recognize target sequences in the genes under their domain, driving their expression in a positively or negatively manner (Lachman 2003, Etxebeste and Espeso 2019). In addition, the function of some TFs is only activated under certain environmental conditions that trigger signaling pathways resulting in post-translational modifications of the primary forms of the TFs. Among the many transcriptional regulatory processes that can be studied, environmental stress is a powerful inducer of these pathways, leading to coordination between different transcriptional regulatory systems mediated by TFs forming gene regulatory networks (GRNs) (Etxebeste 2021, Brown et al., 2017).

One of the most numerous and diverse groups of the Fungi kingdom is the Ascomycete phylum due to their ability to adapt to all types of environments, some of which are extreme. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is a haploid model organism used to study these transcriptional regulatory networks because of its ease of handling in the laboratory, which allows the use of classical and reverse genetics techniques (Mellado 2014). Similarly to the rest of the fungi of the phylum, they are very versatile in a wide variety of environments and tolerating environmental conditions such as water and osmotic stresses, alkaline environments and UV radiation.

The main objective of this work was to study the transcriptional changes in *A. nidulans* under environmental stress conditions caused by high sodium concentrations or alkaline environmental pH. And how the TF-mediated systems involved in this response coordinate with each other. In *A. nidulans* the response to alkaline pH is mediated by at least three systems whose TFs contain a DNA-binding domain of the C2H2 zinc finger type: PacC, SltA and CrzA (Tilburn et al., 1995, Spielvogel et al., 2008). These TFs carry out their function as transcriptional regulators under conditions of alkalinity and/or high cation stress, but so far it has not been determined whether these systems are interconnected or whether there is a hierarchy among them. The Slt system is the least known of the three TFs and of which only two elements have been described: the transcription factor SltA and its processing protease SltB (O'neil et al., 2002, Mellado et al 2015). This system, unlike PacC and CrzA, is found only in fungi of the Pezizomycotina

subphylum, where it is essential for fungal development in cationic or alkaline stress environments.

Both the transcriptional response to environmental stress and the regulatory role of SltA, were studied by massive RNA sequencing. The different transcriptional patterns in a wild-type strain and in a mutant strain lacking the *sltA* gene (*sltAΔ*) were determined by analyzing the differences between standard and stress conditions induced by 1M sodium cations and alkaline pH (Picazo et al., 2020). This technique allowed us to identify clusters of genes with different degrees of dependence on SltA function, either through direct or indirect regulation. Among these genes we found clusters with an expression profile similar to that of *sltB* gene, whose expression is fully dependent on SltA function. These selected genes were studied using reverse genetics techniques, as well as phenotypic and microscopy assays to determine whether any of them were part of the Slt system.

Among the genes whose expression was affected by the *sltAΔ* genetic background, a large number of genes encoding TFs of different families were found, including PacC. This transcription factor has a 72kDa primary form that is signaled by the Pal pathway when the environmental pH is alkalized, triggering proteolysis to a 53kDa intermediate form that is processed independently of pH in the proteasome to its active 27kDa form. Processing of the primary form of PacC<sup>72kDa</sup> allows *pacC* gene expression levels to rise at alkaline pH (Peñalva et al., 2014, Bussink et al., 2015). The absence of SltA affects this system both at the transcriptional level by preventing the upregulation of *pacC* expression levels at alkaline pH and at the translational level showing an anomalous PacC processing pattern.

A strategy using different mutants in elements of the Pal/PacC and Slt systems allowed us to delimit those steps in the PacC-signaling pathway where the role of the SltA protein appears to be determinant. The absence of PacX function, the negative regulator of *pacC*, (Bussink et al., 2015), did not rescue the anomalous PacC processing pattern or the alkaline pH tolerance phenotype in the null *sltA* background. Also, the study of mutants in the Pal pathway evidenced that despite deficient PalF signaling and post-translational modification, Pal pathway elements were correctly recruited upstream of the PacC<sup>72kDa</sup> processing step in the *sltAΔ* background. Mutations in *pacC* generating intermediate-like and fully processed forms displayed a correct PacC processing but did not suppressed the alkaline pH tolerance phenotype observed in the *sltAΔ* background. These results evidenced the coordination between the Slt and Pal/PacC systems in the

alkaline pH response, where the function of SitA is epistatic over the Pal/PacC alkaline pH response system.

## Bibliografía del Resumen/Summary Bibliography

Brown, A. J. P., Cowen, L. E., di Pietro, A., & Quinn, J. (2017). Stress Adaptation. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0048-2016>

Bussink, H. J., Bignell, E. M., Múnera-Huertas, T., Lucena-Agell, D., Scazzocchio, C., Espeso, E. A., Bertuzzi, M., Rudnicka, J., Negrete-Urtasun, S., Peñas-Parilla, M. M., Rainbow, L., Peñalva, M. A., Arst, H. N., & Tilburn, J. (2015). Refining the pH response in *Aspergillus nidulans*: A modulatory triad involving PacX, a novel zinc binuclear cluster protein. *Molecular Microbiology*, 98(6), 1051-1072. <https://doi.org/10.1111/mmi.13173>

Etxebeste, O. (2021). Transcription factors in the fungus *Aspergillus nidulans*: Markers of genetic innovation, network rewiring and conflict between genomics and transcriptomics. *Journal of Fungi*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/jof7080600>

Etxebeste, O., & Espeso, E. A. (2019). *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology*, 23(1), 5-22. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00064-6>

Latchman, D. S. (2003). *Eukaryotic Transcription Factors*: 4<sup>th</sup> Ed. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-437178-1.X5000-0>

Mellado, L. (2014). Respuesta al estrés catiónico en *Aspergillus nidulans*: estudio del proceso de señalización del factor transcripcional SitA. Universidad Complutense de Madrid.

Mellado, L., Calcagno-Pizarelli, A. M., Lockington, R. A., Cortese, M. S., Kelly, J. M., Arst, H. N., & Espeso, E. A. (2015). A second component of the SitA-dependent cation tolerance pathway in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 116-128. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.06.002>

O'neil, J. D., Bugno, M., Stanley, M. S., Barham-Morris, J. B., Woodcock, N. A., Clement, D. J., Clipson, N. J. W., Whitehead, M. P., Fincham, D. A., & Hooley, P. (2002). Cloning of a novel gene encoding a C2H2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Mycological Research*, 106(4). <https://doi.org/10.1017/S0953756202005701>

Picazo, I., Etxebeste, O., Requena, E., Garzia, A., & Espeso, E. A. (2020). Defining the transcriptional responses of *Aspergillus nidulans* to cation/alkaline pH stress and the role of the transcription factor SitA. *Microbial Genomics*, 6(8), 1-18. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000415>

Spielvogel, A., Findon, H., Arst, H. N., Araújo-Bazán, L., Hernández-Ortíz, P., Stahl, U., Meyer, V., & Espeso, E. A. (2008). Two zinc finger transcription factors CrzA and SitA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Journal*, 414(3), 419-429. <https://doi.org/10.1042/BJ20080344>

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*, 14(4), 779-790.



# Introducción



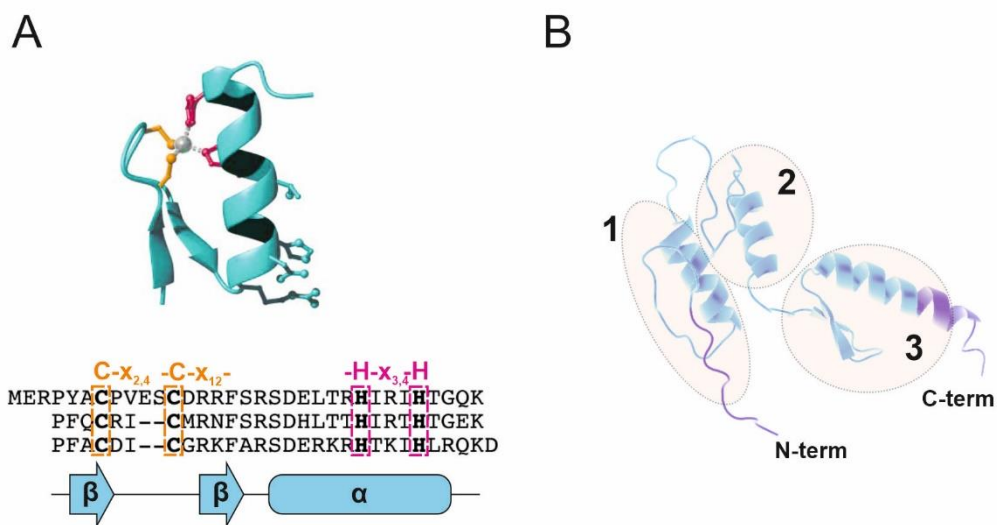
## 1. Los factores de transcripción

El correcto funcionamiento celular en cualquier tipo de organismo depende de la capacidad para controlar y adaptar sus procesos de transcripción y traducción en cada momento de su ciclo vital (Alberts et al., 2017). Estos mecanismos de control se sustentan sobre maquinaria molecular más o menos específica que será la responsable de modular estos procesos. Así, la regulación de los niveles de transcripción está mediada por los denominados factores transcripcionales (FTs) (Weidemüller et al., 2021). Los FTs son proteínas modulares y poseen diferentes dominios funcionales entre los que se encuentran aquellos que determinan la unión a secuencias específicas de DNA (Latchman, 2003). Cada FT reconoce a través de estos dominios de unión a DNA las denominadas secuencias diana que se encuentran localizadas en las regiones promotoras de los genes. La unión de los FTs a sus correspondientes secuencias diana facilitan, modulan o impiden el reclutamiento del complejo enzimático RNA Pol II que lleva a cabo la transcripción de la mayoría de los genes presentes en los genomas eucarióticos (Latchman, 2003). En función del tipo de dominio de unión a DNA, los factores de transcripción pueden actuar solos, como monómeros u homodímeros, o en coordinación con otros elementos o FT formando heterómeros, lo que permite aumentar su potencial regulador (de Mendoza & Sebé-Pedrós, 2019). Además, en muchos casos, la función de los factores de transcripción no se limita a la regulación de la transcripción de genes ya que también pueden interactuar con otras proteínas o con moléculas de RNA (Cassiday & Maher, 2002; de Jonge et al., 2022).

Los niveles de expresión de una gran mayoría de genes en un determinado genoma están sujetos a regulación. La modulación de estos niveles es el resultado de la percepción e integración de señales intra o extracelulares que activan diferentes rutas de señalización que conllevan modificaciones post-traduccionales (MPTs) en los factores de transcripción para su activación (Ryšlavá et al., 2013). Las MPTs modifican la funcionalidad de los dominios presentes en los FTs. En algunos casos las MPTs afectan a la localización intracelular (Filtz et al., 2014; Hernández-Ortiz & Espeso, 2013; Lucena-Agell et al., 2015). Así, se pueden activar señales de localización nuclear (NLS) o desactivar señales de exportación nuclear (NES) causando la acumulación del FT en el núcleo dando lugar a la activación de su función reguladora para generar respuestas transcripcionales específicas y eficientes ante una gran variedad de estímulos (Etxebeste & Espeso, 2019). Además de los genes cuya expresión es altamente dependiente de la función de un FT, en ocasiones estos también pueden regular su

propia expresión, así como la expresión de genes que codifican para otros FTs, lo que resulta en complejas redes de organización jerárquica de regulación transcripcional.

Las familias de FTs se clasifican habitualmente en función del tipo de dominio de unión a DNA que presentan. Una de las superfamilias más numerosas en todos los organismos eucariotas es la que porta un dominio de unión DNA con varios residuos de cisteína o cisteína/histidina unidos a uno o más átomos de zinc (Etxebeste, 2021; Klug, 1999; MacPherson et al., 2006; Razin et al., 2012).



**Figura I.1.** Dominio de unión a DNA de dedos de zinc “clásicos” de tipo C2H2. **A)** Estructura secundaria de un dedo de zinc (representación adaptada de Pabo et al., 2001) mostrando la localización de los residuos de cisteína (indicado en naranja) e histidina (indicado en magenta) que coordinan los átomos de zinc (indicado en gris). **B)** Ejemplo de dominio de unión a DNA con tres dedos de zinc de tipo C2H2 del factor de transcripción PacC en *A. nidulans*. El modelo fue obtenido en el servidor de AlphaFold y adaptado en PyMol.

Los denominados dedos de zinc “clásicos” o de tipo Cys2His2 (comúnmente abreviados como C2H2) son aquellos factores de transcripción que presentan un motivo muy conservado con la estructura C-x<sub>2,4</sub>-C-x<sub>12</sub>-H-x<sub>3,4</sub>-H y un conector de 7 aminoácidos, donde x indica cualquier residuo, C cisteína y H histidina (Klug, 1999; Pabo et al., 2001) (Figura I.1.A). Los dos residuos de cisteína y los dos de histidina se coordinan con un átomo de zinc (Zn<sup>2+</sup>) generando una estructura cuya representación original se asemejaba a los dedos de un guante. Este dominio está altamente conservado y ampliamente distribuido filogenéticamente hasta eucariotas superiores (Latchman, 2003; Razin et al., 2012). Estructuralmente este dominio está formado por dos láminas beta antiparalelas ( $\beta$ ) y una hélice alfa ( $\alpha$ ) donde se localizan los residuos cuyas cadenas laterales interactúan directamente con las bases en el DNA (Figura I.1). El número de dedos de zinc varía en función del factor de transcripción y de la complejidad del genoma. El reconocimiento específico de secuencia en el DNA se basa en la cantidad

de dedos de zinc presentes (Figura I.1.B) y la composición de aminoácidos en ciertas posiciones de la hélice alfa de cada dedo. A diferencia de otros tipos de factores de transcripción, el dominio de unión a DNA de tipo C2H2 no requiere de la formación de dímeros, aunque en algunos casos se han identificado dominios adicionales que participan en procesos de dimerización (Etxebeste, 2021; Fedotova et al., 2017; MacPherson et al., 2006; Razin et al., 2012).

Otra de las familias de FTs es la que contiene en sus secuencias dedos de zinc multicisteína. En este caso la estructura que reconoce el DNA se estabiliza mediante la unión a uno o más átomos de zinc por varios residuos de cisteína. En esta familia encontramos un grupo especial que son los dominios “*binuclear zinc cluster*” (abreviado comúnmente como Zn<sub>2</sub>C<sub>6</sub>), los cuales están presentes exclusivamente en determinados FTs del reino Fungi (MacPherson et al., 2006; Todd & Andrianopoulos, 1997). Esta restricción filogenética y el alto número de genes que codifican para factores de transcripción de este tipo los convierten en potenciales candidatos para su uso como dianas terapéuticas en el tratamiento de infecciones fúngicas (MacPherson et al., 2006). Este tipo de dominio también está altamente conservado donde un total de seis cisteínas se encuentran unidas a dos átomos de zinc. Los factores de transcripción con este tipo de dominios pueden realizar funciones reguladoras diferentes según si actúan como monómeros, homodímeros o heterodímeros (MacPherson et al., 2006; Todd & Andrianopoulos, 1997). Al igual que los factores de transcripción con un dominio de dedos de zinc clásicos, los FTs con dominios Zn<sub>2</sub>C<sub>6</sub> pueden regular los niveles de expresión de otros genes que codifiquen para factores transcripcionales, además de su propia expresión, y pueden ser señalizados y modificados post-traduccionalmente en condiciones específicas participando así en las redes de regulación transcripcional en respuesta a estímulos intracelulares y extracelulares (Bussink et al., 2015; Etxebeste, 2021; MacPherson et al., 2006).

Cuando las rutas de señalización son activadas pueden actuar sobre estos FTs y otros tipos de proteínas, añadiendo modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones son muy variadas y pueden combinarse dando lugar a cambios en la localización subcelular, permitiendo la interacción con otras proteínas o complejos en procesos de señalización, o de regulación transcripcional en el caso de los factores de transcripción (Filtz et al., 2014). Estas combinaciones de MPTs pueden ser reversibles o irreversibles ampliando la variedad de funciones celulares de una proteína dependiendo del tipo o número de MPTs a las que está sujeta.

Las MPTs reversibles, pueden modular la actividad de las proteínas diana mediante la adición o eliminación de diferentes grupos químicos y es llevada a cabo por enzimas específicas para cada tipo de modificación (Ramazi & Zahiri, 2021). La MPT más común en procesos de señalización es la fosforilación, en la que mediante la actividad de una proteína quinasa se transfiere un grupo fosfato a la proteína diana de forma ATP-dependiente. La desfosforilación ocurre por la actividad de una proteína fosfatasa que retira dicho grupo fosfato y devuelve la proteína a su estado inicial (Latchman, 2003). La segunda MPT más habitual es la acetilación, la cual puede ser de varios tipos incluyendo un tipo de modificación irreversible. Los residuos más frecuentemente modificados son los de serina, lisina o treonina (Ramazi & Zahiri, 2021).

Particularmente para esta tesis son de especial interés las MPTs de tipo irreversible. La principal MPT irreversible es la digestión proteolítica parcial o total de proteínas que poseen motivos específicos que las señalizan para su procesamiento. Este tipo de MPT se detecta en procesos de señalización celular para la activación o inactivación de la actividad de proteínas como los factores de transcripción, pero también para procesos de apoptosis o degradación de proteínas mal plegadas (Andréasson et al., 2006; Klein et al., 2018; Walsch & Christopher, 2006). El reconocimiento de los motivos de proteólisis puede ser más o menos específico y puede ser llevado a cabo por proteínas señalizadoras con actividad proteasa que pueda romper enlaces peptídicos, o por el macro complejo denominado proteosoma. Esta maquinaria enzimática consta de múltiples subunidades y degrada proteínas enteras o parte de las mismas respondiendo a señales en la proteína diana o a señales de otras MPTs como la ubiquitinación (Ramazi & Zahiri, 2021; Tanaka, 2009). En el caso de la señalización de proteínas como factores de transcripción, este tipo de MPT por proteólisis suele promover su activación mediante cambios conformacionales de la proteína permitiendo la exposición de ciertos dominios funcionales, como señales de localización celular o subcelular, o de interacción con otras proteínas o de unión a secuencias consenso de DNA (Latchman, 2003). Otras modificaciones irreversibles implican cambios en las proteínas por la adición de grupos químicos para los que no existan efectores que reviertan esta reacción, o que dicha MPT provoque cambios en la estructura terciaria de la proteína bloqueando la modificación bidireccional como es el caso de las reacciones de miristoilación o prenilación (Ramazi & Zahiri, 2021; Walsch & Christopher, 2006). Esta tesis profundiza en la coordinación de la señalización de dos sistemas de regulación transcripcional mediados por los factores de transcripción StA y PacC en respuesta a la alcalinidad ambiental, donde ambos necesitan de la combinación de MPT de proteólisis y de fosforilación (Mellado et al., 2015; Peñas et al., 2007).

## 2. Los hongos filamentosos y su versatilidad adaptativa.

La supervivencia de los organismos depende del proceso de adaptación y respuesta a eventos que pueden generar estrés celular y que conlleva la modulación de una serie de rutas y mecanismos de señalización celular coordinados que median en la regulación génica con el fin de mantener la homeostasis celular. Los tipos de estrés celular se pueden dividir en: estrés causado por factores abióticos o ambientales y el estrés por factores bióticos originados por la interacción de un organismo con otros (Fulda et al., 2010; Suzuki et al., 2014). El reino Fungi lo forman organismos eucariotas con una gran capacidad de adaptación a ambientes extremos como entornos con limitada disponibilidad hídrica o de nutrientes, como fuentes de carbono, nitrógeno o zinc, ambientes hipersalinos, valores de pH y temperatura extremos, o radiación ultravioleta, que generan en muchos casos procesos de estrés oxidativo (Schoch et al., 2009). Gracias a rutas de señalización y a la coordinación de diferentes redes de regulación transcripcional, en las que median uno o varios FTs, estos microorganismos pueden desarrollar tolerancia y crecer en estos ambientes extremos (Brown et al., 2017; Etxebeeste & Espeso, 2019).

Las redes de regulación génica que se activan en cada caso pueden presentar similitudes o compartir rutas de señalización o FTs, mientras que otros pueden ser específicos del tipo de estrés inducido. La respuesta esperada ante ambientes adversos puede suponer un cambio en el patrón transcripcional que resulte en un proceso de detoxificación celular. Entre los mecanismos más comunes se encuentra el transporte desde el interior celular al medio ambiente de los productos causantes de dicha toxicidad o el almacenamiento de determinados compuestos en las vacuolas u otros orgánulos con el fin de mantener la homeostasis celular (Brown et al., 2017). Para ello, las rutas de tráfico intracelular, las proteínas transportadoras transmembrana o las proteínas quelantes de iones juegan un papel esencial (Brown et al., 2017).

Tomando como ejemplo la respuesta de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al estrés salino encontramos la ruta de señalización HOG (“*High Osmolarity Glycerol pathway*”) que activa la proteína quinasa Hog1p (MAPK). En condiciones de aumento de la concentración de cationes en el medio extracelular, el sensor Sln1p y la proteína fosfotransmisora Ypd1p, que normalmente se encuentran fosforiladas, integran la señal de estrés mediante desfosforilación, proceso en el que se incluye también a la proteína “*mitogen-activated protein kinase*” (MAPKKK) Ssk1p que actúa como intermediario en la señalización. La desfosforilación de estas proteínas permite la interacción del resto de las proteínas MAP quinasas Ssk2p/Ssk22p (MAPKKK) y Pbs2p (MAPKK) con la

última proteína MAP quinasa de la ruta de señalización, Hog1p (MAPK), permitiendo su fosforilación y translocación al núcleo, donde mediante fosforilación regula la actividad de FTs como Msn2p/Msn4p, Hot1p o Sko1p entre otras funciones (Brewster & Gustin, 2014; Duran et al., 2010). La función reguladora de estos factores de transcripción puede generar respuestas inmediatas mediante la expresión de genes que codifiquen para proteínas transportadoras generales y/o específicas del tipo de estrés, modificar la actividad de las rutas del metabolismo primario, y posteriormente en una respuesta a medio y largo plazo potenciar rutas de generación de estructuras de resistencia como esporas o cuerpos fructíferos, o generar metabolitos secundarios. Esta ruta puede activarse no solo en condiciones de estrés por salinidad, sino también en otras condiciones o como resultado de la combinación de diferentes tipos de estrés (Brewster & Gustin, 2014; Rep et al., 2000). Además de la ruta HOG, existen otras rutas de señalización que siguen el mismo modelo como en el caso de la ruta que regula la integridad de la pared celular (Mpk1) o la ruta de crecimiento filamentoso (Fus3). Las funciones o la activación de rutas de señalización y regulación transcripcional, pueden variar entre diferentes especies (Hagiwara et al., 2016)

En el reino Fungi, el filo Ascomycota cuenta con el mayor número de especies. Su diversidad es tan amplia que para su estudio se ha recurrido en muchos casos a organismos modelo, es decir especies cuyo manejo experimental en condiciones controladas es sencillo y permite el uso de diferentes técnicas de edición genética para definir las diferentes rutas de regulación transcripcional, señalización o del metabolismo. Entre los hongos levaduriformes el organismo modelo es *S. cerevisiae* mientras que en el estudio de hongos filamentosos se recurre a *Aspergillus nidulans*, el cual se ha empleado para este trabajo. *A. nidulans* es un hongo filamentoso perteneciente al subfilo pezizomycotina. Es un organismo heterótrofo que puede sobrevivir en una gran variedad de ambientes y cuenta con diferentes ciclos de reproducción: asexual, sexual y parasexual (Mellado, 2014) La capacidad de inducir *in vitro* estos ciclos reproductivos facilita en gran medida el uso de este hongo filamentoso en estudios de genética en reverso, mientras que su resistencia a presiones ambientales en fondos mutantes permite el desarrollo de estudios de genética clásica. Además, este organismo es habitualmente haploide lo que facilita el análisis genético mediante la observación del fenotipo en los posibles fondos mutantes. El genoma de *A. nidulans* está organizado en 8 cromosomas y fue de los primeros genomas secuenciados en hongos filamentosos (Galagan et al., 2005).

En el proceso de reproducción asexual de *A. nidulans* se forman las conidiosporas o conidia (conidios), con forma esférica, color característico verde y que contienen un

único núcleo, lo que las hace ser un material biológico de gran interés genético para el mantenimiento de la homogeneidad genómica entre las diferentes cepas. En el laboratorio el ciclo de vida del hongo comienza con la germinación de los conidios ya que se utilizan para la propagación. A partir de cada conidio, en condiciones adecuadas de disponibilidad de fuentes de carbono, nitrógeno y de temperatura, entre otros factores ambientales, se desarrolla el tubo germinativo en un punto concreto que dará lugar a la hifa, la célula fúngica que en su conjunto se conoce como micelio. Las hifas de *A. nidulans* tienen una organización sincitial. Los compartimentos son multinucleados y solo el compartimento apical muestra un crecimiento polarizado. A diferencia de la mayoría de las células animales, que carecen de pared celular, o de las células vegetales, cuyas paredes celulares están formadas principalmente por celulosa o hemicelulosa, los hongos poseen una pared celular compuesta principalmente de quitina. En su interior las células se conectan mediante septos semicerrados por los que pueden transportarse ciertos compuestos como proteínas o iones de manera bidireccional a grandes distancias. En cada célula además podemos encontrar uno o varios núcleos que a su vez pueden ser idénticos o diferentes (homocarionte o heterocarionte) (Mellado, 2014). Su crecimiento apical polarizado requiere de una maquinaria de tráfico intracelular compleja para recorrer grandes distancias en la hifa, por lo que también es un potencial organismo modelo en el estudio de los axones que forman parte de las células neuronales (Etxebeste & Espeso, 2016).

El tráfico intracelular es clave en la capacidad de adaptación de *A. nidulans* y del resto de hongos ya que, para generar una respuesta adecuada a un evento de estrés por cambios en el ambiente, no solo es necesaria la activación de las rutas de señalización y de regulación transcripcional, sino que las proteínas resultantes como proteínas transportadoras entre otras, deben localizarse correctamente en la célula para poder llevar a cabo su función.

Aunque los tipos de estrés ambiental son numerosos, como la temperatura, la concentración de metales pesados o compuestos mutagénicos, este trabajo se ha enfocado en el estudio del efecto a nivel de transcripción de cambios repentinos en la concentración de cationes o en cambios por el aumento de pH ambiental. Estas respuestas transcripcionales suelen estar mediadas por factores de transcripción que se activan de forma dependiente de estos estímulos. Los principales sistemas dirigidos por factores de transcripción descritos en *A. nidulans* que responden a cambios por pH ambiental y/o por concentración de diversos cationes son los sistemas Pal/PacC, Slt y el mediado por calcineurina, Crz, como veremos a continuación.

### 3. El sistema de regulación transcripcional Pal/PacC

El principal sistema de regulación transcripcional en respuesta a cambios de pH en el medio extracelular es el mediado por la ruta de transducción de señal Pal que actúa sobre el factor transcripcional PacC (Peñalva et al., 2014; Tilburn et al., 1995). Este sistema regulador que ha sido descrito en profundidad desde el punto de vista genético y funcional, está ampliamente representado en el reino Fungi. El factor de transcripción PacC y la mayoría de los elementos de su ruta de señalización fueron descritos por Dorn en su trabajo bioquímico y genético mostrando la regulación de la expresión de las fosfatasas a diferentes valores de pH extracelular (Dorn, 1965). Posteriormente este estudio genético fue ampliado por Caddick y colaboradores al analizar las mutaciones en diferentes loci que afectaban a la secreción de fosfatasas ácidas a pH ácido y/o de fosfatasas alcalinas a pH alcalino (Caddick et al., 1986; Dorn, 1965). Este trabajo, utilizando técnicas de genética clásica, identificó al gen *pacC* (del inglés "*phosphatase acid mutant locus C*") como el regulador transcripcional y a un determinado número de genes *pal* (del inglés "*phosphatase alkaline mutants*") como pertenecientes a una posible ruta de señalización.

El trabajo de genética molecular y clonaje mediante complementación realizado por el grupo del Prof. Arst y del laboratorio del CIBMS-CISC permitió determinar la secuencia del gen y comenzar a comprender el efecto de las mutaciones en la función de PacC (Tilburn et al., 1995). Este factor transcripcional consta de 674 aminoácidos, aunque se siguen numerando los residuos desde una metionina previa a 4 aminoácidos (Espeso et al., 1997; Mingot et al., 1999). La secuencia de PacC contiene un dominio de unión a DNA de tres dedos de zinc de tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> entre los residuos 78 y 164 (Tilburn et al., 1995) y este dominio reconoce la secuencia consenso 5'-GCCARG-3' tanto en promotores de genes que se expresan preferentemente a pH alcalino o a pH ácido (Espeso et al., 1993; Espeso & Arst, 2000; Tilburn et al., 1995).

En *pacC* se identificaron básicamente dos tipos de mutaciones. Las mutaciones constitutivas en *pacC* (*pacC<sup>c</sup>*) mimetizan los efectos del pH alcalino en condiciones de ausencia de estrés como ocurre en los fondos mutantes *pacC<sup>c</sup>5*, *pacC<sup>c</sup>14* o *pacC<sup>c</sup>700*, mientras que la delección de *pacC* o mutaciones que prevengan su funcionalidad, designadas *pacC<sup>-</sup>* y *pacC<sup>+/-</sup>* resultan en un fenotipo opuesto, es decir mimetizan el crecimiento a pH ácido. Las mutaciones en los genes *palA*, *B*, *C*, *F*, *H* e *I* resultan en el fenotipo de mimesis de crecimiento a pH ácido similar al que causan las mutaciones *pacC<sup>-</sup>* y *pacC<sup>+/-</sup>*. La relación de epistasia de las mutaciones *pacC<sup>c</sup>* sobre las mutaciones

*pal* sugerían que los productos de los genes *pal* formarían parte del proceso señalizador de PacC.

La caracterización de cada uno de los genes anteriores fue modelando nuestra comprensión del sistema de regulación por pH ambiental. La identificación de PacC y la secuenciación de los mutantes clásicos identificados por Dorn, como son *pacC*<sup>c5</sup>, *pacC*<sup>c14</sup> y otros aislados por Caddick y demás miembros del grupo del Prof. Arst, explicaron los dos fenotipos que mostraban las mutaciones en PacC. Así las mutaciones causan cambios puntuales en determinados aminoácidos o, por lo general, truncamientos en la secuencia de PacC a partir del aminoácido 250 que dan lugar al fenotipo *pacC*<sup>c</sup>. Las mutaciones *pacC*<sup>-</sup> y *pacC*<sup>+/-</sup>, en la mayoría de los casos, suponen truncamientos en la proteína antes del aminoácido 250 o sustituciones de aminoácidos en los dedos de zinc (Caddick et al., 1986; Tilburn et al., 1995).

Los genes *palH* y *pall* codifican dos proteínas con siete y tres dominios transmembrana respectivamente, que actúan como sensores de los cambios de pH extracelular. En *A. nidulans* el aumento del pH ambiental provoca cambios en la conformación de PalH permitiendo el inicio de la señalización de la ruta Pal. Este proceso de señalización requiere de la función complementaria de Pall para la correcta localización de PalH en la membrana plasmática (H. N. Arst et al., 1994; Calcagno-Pizarelli et al., 2007). Mutaciones de pérdida de función en *palH* similares a una delección como *palH72*, que da lugar a una proteína truncada en el residuo 12, o *palH17* presentan un fenotipo de mimesis de acidez impidiendo la señalización de PacC<sup>72kDa</sup> para su procesamiento (H. N. Arst et al., 1994; Hervás-Aguilar, Galindo, et al., 2010) Por otro lado, las mutaciones en *pall* de pérdida de función total, como *pall30* o *pall32*, tienen un efecto más leve en la alteración de la señalización de la ruta Pal, y PacC<sup>72kDa</sup> es capaz de señalizarse y procesarse al resto de formas a pH 8 (Denison et al., 1998; Lucena-Agell et al., 2016). En *S. cerevisiae* los genes homólogos *RIM21*(*palH*) y *RIM9* (*pall*) (Denison, 2000) junto con *DGF16* forman el complejo sensor del pH extracelular, en el cual se cree que la función sensor recae en el dominio C-terminal citoplasmático de Rim21p asociado a la membrana plasmática y que se activa detectando cambios en la asimetría lipídica de la membrana plasmática, proceso que aún no se ha demostrado en la ruta Pal de *A. nidulans* (Ikeda et al., 2008; Nishino et al., 2015; Obara et al., 2012). El siguiente elemento que aparece en la ruta de señalización es *palF* (*RIM8*), el único gen del sistema Pal/PacC junto al propio *pacC* cuya expresión es dependiente del pH ambiental. El gen *palF* se expresa preferentemente a pH ácido y su expresión disminuye a pH alcalino por una posible regulación negativa de las formas procesadas de PacC (Bussink et al., 2015). La proteína codificada por *palF* se corresponde con una proteína similar a

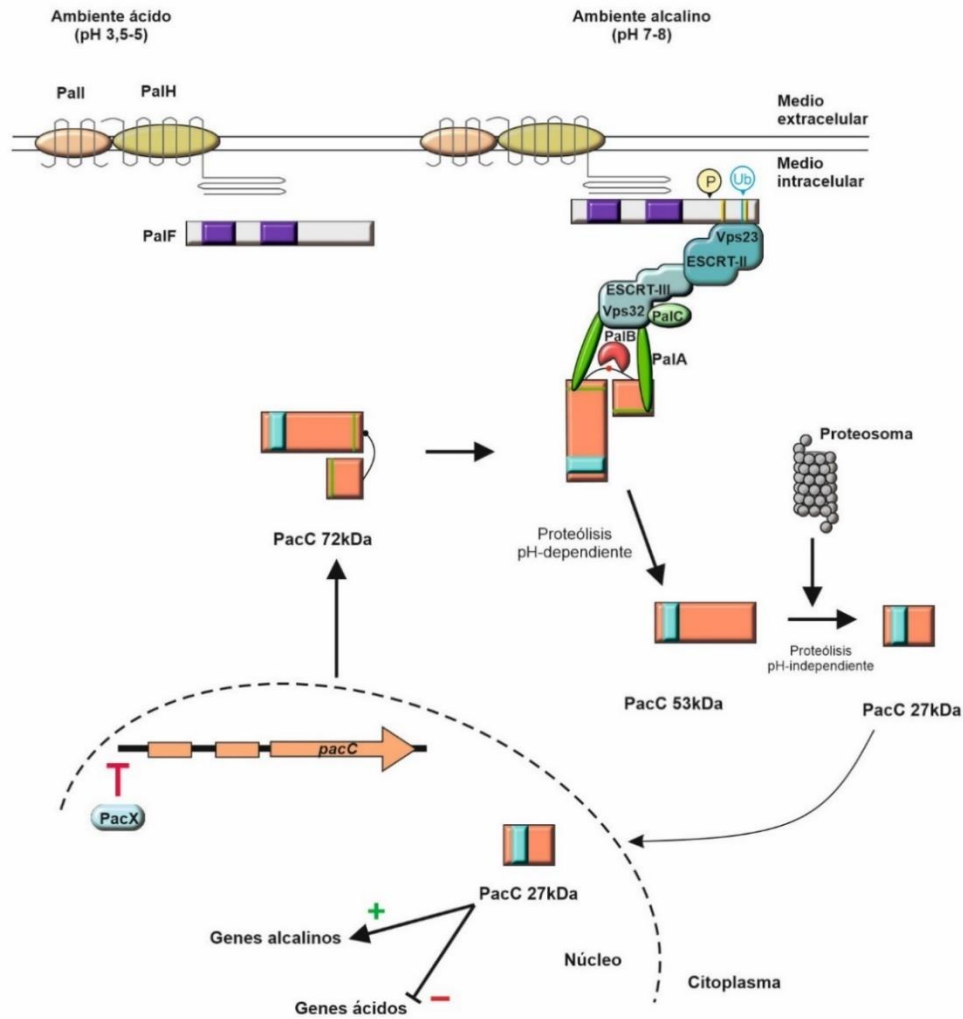
las  $\beta$ -arrestinas de células animales. Las arrestinas forman una familia de proteínas cuya principal función es de señalización celular, donde habitualmente actúa como puente o punto de conexión entre la proteína receptora de la membrana plasmática y el resto de elementos que componen dicha ruta. En mamíferos las arrestinas suelen participar en la desensibilización de estas proteínas transmembrana como los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), mientras que en el caso de PalF esta función es la opuesta promoviendo la activación de la ruta de señalización (Herranz et al., 2005; Jean-Charles et al., 2016). A pH 8 PalF interacciona con PalH mediante los dominios N-arrestina y C-arrestina y, se modifica post-traduccionamente (fosforilación y ubiquitinación) para reclutar al siguiente elemento de la ruta Pal, Vps23. La mutación clásica *palF15* (Dorn, 1965) resulta en un truncamiento temprano que elimina los motivos que se modifican post-traduccionamente impidiendo la señalización del resto de la ruta Pal igual que en *S. cerevisiae* y dando lugar al fenotipo de mimesis de acidez (Caddick et al., 1986; Galindo et al., 2012; Herrador et al., 2010; Herranz et al., 2005). Tras el reclutamiento de los elementos ESCRT en la ruta Pal, el siguiente elemento en reclutarse es PalC que se une a Vps32 (ESCRT-III) mediante los dominios de interacción de tipo Bro1 dependientemente de PalF y del pH alcalino (Galindo et al., 2007). Al igual que en el resto de las mutaciones de los genes *pal* descritas, a excepción de *palI*, la mutación *palC4* se considera como una mutación de pérdida de función similar a una delección, con el consiguiente fenotipo de sensibilidad a pH alcalino (Dorn, 1965; Negrete-Urtasun et al., 1999). En un primer momento no se identificó el homólogo de este gen en *S. cerevisiae* (Tilburn et al., 1995) y en estudios posteriores de *palC* se determinó mediante alineamientos de los dominios de unión de PalC a Vps32, que el posible homólogo en *S. cerevisiae* era el gen *YGR122w* (Galindo et al., 2007). La localización de PalC a pH alcalino es necesaria para el posterior reclutamiento de la proteína PalA al complejo mediante la interacción con Vps32 aunque dichas proteínas Pal no interaccionen entre sí (Galindo et al., 2012). El gen *palA* codifica para una proteína que cuenta con dos tipos de dominios que le permiten interaccionar con Vps32 y con PacC<sup>72kDa</sup> (Peñalva et al., 2014; Vincent et al., 2003). La mutación *palA1* supone un truncamiento temprano de la proteína, que impide tanto su interacción con Vps32 como el reclutamiento de PacC<sup>72kDa</sup> para su procesamiento, resultando en el fenotipo *palI* de sensibilidad a pH alcalino (Dorn, 1965; Galindo et al., 2012; Vincent et al., 2003). Por último, encontramos a la proteasa señalizadora de PacC<sup>72kDa</sup>, PalB. Algunas mutaciones clásicas de *palB* presentan diferentes grados de pérdida de función, como *palB38* que supone un truncamiento en el residuo 54 y que resulta en un fenotipo similar a un nulo *palB* en el que no existe procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup>, mientras que la mutación *palB7* descrita por Dorn (Dorn, 1965) es un truncamiento próximo a la región C-terminal que

conserva algo de función señalizadora para el procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> pero que no es suficiente para tolerar la alcalinidad ambiental (Dorn, 1965; Peñalva et al., 2014; Peñas et al., 2007). Esta proteína cuenta con varios dominios funcionales como el dominio MIT (“*microtubule interacting and trafficking domain*”) que interacciona con el complejo de señalización a través de Vps24, o el dominio similar a calpaína-proteasa y el dominio calpaína III (Peñas et al., 2007; Rodríguez-Galán et al., 2009). En *S. cerevisiae*, su homólogo Rim13p también es la proteína encargada de señalar al homólogo de PacC, Rim101p, para su proteólisis que da lugar a la forma activa en levaduras con un único paso proteolítico (Peñalva & Arst, 2002). El aislamiento de mutantes afectados en la función PacC se vio facilitada por los fenotipos inversos que manifiestan las cepas que portan mutaciones en *pacC* de ganancia de función (*pacC<sup>c</sup>*) frente a las que tienen mutaciones de pérdida de función (*pacC<sup>-</sup>*) o en cualquiera de los genes *pal* (*pal<sup>l</sup>*). Así, las mutaciones de ganancia de función en PacC causan, además de la tolerancia al pH alcalino, tolerancia a determinadas concentraciones del anión molibdato y sensibilidad a neomicina. La pérdida de función PacC o en las proteínas Pal, causan el fenotipo opuesto, es decir sensibilidad a molibdato y al pH alcalino, y tolerancia a neomicina (Fernández-Martínez et al., 2003; Peñalva & Arst, 2002; Tilburn et al., 1995).

La caracterización de los nuevos mutantes en PacC, la producción de anticuerpos específicos frente a la región C-terminal de PacC y frente al dominio de unión al DNA, así como los experimentos de cambio de movilidad electroforética (“*EMSA*s” y “*Supershifts*”) (Espeso & Arst, 2000) permitieron establecer un modelo bioquímico de la activación de este factor transcripcional (Espeso et al., 2000; Orejas et al., 1995).

La activación de PacC en *A. nidulans* requiere de dos cortes proteolíticos, siendo el primero dependiente de la alcalinización del pH ambiental y del funcionamiento de la ruta Pal, y el segundo corte que está mediado por el proteosoma de forma independiente del pH extracelular (Díez et al., 2002; Hervás-Aguilar et al., 2007). Una serie de interacciones intramoleculares previenen la inadecuada activación de la proteína PacC.

A valores de pH extracelular ácido, la proteína PacC solo se encuentra en su forma primaria de aproximadamente 72kDa en una conformación “cerrada” que evita su proteólisis (Espeso & Arst, 2000). El proceso de señalización por alcalinización ambiental se ilustra en la figura 1.2. A valores alcalinos de pH extracelular las proteínas PalH y Pall, que se localizan en la membrana plasmática, reclutan a PalF (Herranz et al., 2005). Las regiones de unión de PalH a PalF se localizan entre los residuos 349 y 385, y entre los residuos 657 y 760 con el dominio N-arrestina (residuos 64 a 206) de PalF (Herranz et al., 2005). La señalización por pH alcalino y mediado por PalH y Pall resultan



**Figura I.2.** Modelo del sistema Pal/PacC en condiciones de pH ambiental ácido y alcalino. El pH ambiental ácido mantiene a PalF deslocalizado y la ruta de señalización Pal inactiva, evitando el procesamiento de la forma primaria de PacC de 72kDa (esquina superior izquierda del modelo). PacC presenta su dominio de unión a DNA en el extremo N-terminal (indicado en azul) y a pH ácido esta forma de 72kDa se mantiene en una conformación cerrada que impide su proteólisis. La alcalinización del medio extracelular promueve la señalización de PalI y PalH que conlleva el reclutamiento de PalF a través de sus dominios de tipo arrestina (dominios en morado) y su posterior modificación post-traduccion (fosforilación, P y ubiquitinación, Ub), que permite el reclutamiento del resto de elementos de señalización de la ruta Pal en la que participan también algunas proteínas Vps de los complejos ESCRT (esquina superior derecha). La señalización de la ruta Pal resulta en el reclutamiento mediante la proteína PalA (motivos de reclutamiento indicados en verde) y en el procesamiento proteolítico de PacC<sup>72kDa</sup> mediado por PalB (indicado en rojo) a su forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> (Proteólisis pH-dependiente). Esta forma intermedia es procesada en el proteosoma a su forma activa de 27kDa (Proteólisis pH-independiente). La forma activa se localiza al núcleo donde lleva a cabo su función como regulador transcripcional. El regulador “binuclear zinc cluster” PacX se ha propuesto como un posible regulador negativo de la expresión de *pacC*.

en la fosforilación y ubiquitinación de PalF. La diana más probable de esta última modificación postraduccion es la lisina 715, una modificación esencial para el reclutamiento de la proteína Vps23 que forma parte del complejo ESCRT-I (Herrador

et al., 2010). Las regiones de unión de las formas modificadas post-traduccionalmente de PalF a Vps23 se reconocen por los motivos SxP (Ser-x-Pro) en la región C-terminal de PalF, próximas al sitio de ubiquitinación (K715). El reclutamiento de Vps23 y otros elementos de los complejos ESCRT-II y ESCRT-III no implica la internalización a endosomas llevada a cabo por estos complejos en la ruta de MVB ("*Mutivesicular body pathway*"), y toda la ruta de señalización por pH ocurre en puntos concretos de la membrana plasmática (Calcagno-Pizarelli et al., 2011; Lucena-Agell et al., 2015). En *A. nidulans* son necesarios en la ruta de señalización Pal, además de Vps23, Vps36 (ESCRT-II), Vps20 y Vps32 (ESCRT-III) (Calcagno-Pizarelli et al., 2011; Peñalva et al., 2014). La proteína Vps32, la cual es esencial, se une a PalC, una proteína que contiene un dominio similar a la proteína Bro1p en *S. cerevisiae* en su región N-terminal, que media en esta unión con Vps32 (Galindo et al., 2007). Este dominio Bro1 también se encuentra en PalA, la cual también se une a Vps32 después de PalC (Galindo et al., 2012). PalA se encarga de reclutar a la forma PacC<sup>72kDa</sup> mediante la unión a dos motivos YPx[L/I], lo que permite el reconocimiento y acceso de la proteasa PalB al sitio de corte de la forma primaria de PacC<sup>72kDa</sup> (Vincent et al., 2003). Finalmente es probable que se recluten a este complejo de señalización Vps24 y Vps2 u otros elementos adicionales que recluten la calpain-proteasa PalB mediante el dominio MIT ("*microtubule interacting and trafficking domain*") presente en la región N-terminal (Rodríguez-Galán et al., 2009). La proteólisis de PacC<sup>72kDa</sup> llevada a cabo por PalB, da lugar a una forma de PacC intermedia de aproximadamente 500 aminoácidos con tamaño estimado de 53 kDa (H. N. Arst & Peñalva, 2003a). La forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> es entonces procesada en el proteosoma independientemente del pH ambiental, dando lugar a la forma activa PacC<sup>27kDa</sup> que consta de aproximadamente 254 residuos (Hervás-Aguilar et al., 2007; Peñalva et al., 2014) (Figura I.2).

La forma de menor tamaño obtenida a pH 8 se encarga de regular positivamente la expresión de algunos genes alcalinos ("*alkaline expressed genes*") como las fosfatasas alcalinas, aunque la regulación también puede ser negativa sobre genes ácidos ("*acid expressed genes*"), reprimiendo su expresión de manera directa o indirecta (Figura I.2). Algunos de los genes cuya expresión es dependiente de la función PacC son el gen *ipnA* que codifica para la N-isopenicilina sintasa, una de las proteínas que participa en la ruta de biosíntesis de penicilina (H. N. Arst & Peñalva, 2003a; Espeso et al., 1993), o sobre la expresión de los genes *enaA*, *enaB* y *enaC* que codifican para ATPasas de sodio y cuya expresión está altamente regulada por PacC detectándose transcritos en condiciones de alcalinidad ambiental. Concretamente, la función de las ATPasas EnaA y EnaB son esenciales en el fenotipo de tolerancia al pH alcalino extracelular tanto en

*A. nidulans* como en otras especies (Markina-Iñarrairaegui et al., 2020). Además, PacC también puede actuar como represor como en el caso de la expresión del gen *gabA* que codifica para la permeasa de  $\gamma$ -aminobutirato a pH alcalino (H. N. Arst & Peñalva, 2003a). Por otro lado, PacC regula su propia expresión, ya que la forma primaria parece actuar como represor que al degradarse a pH 8 en favor de las otras formas, permite la expresión de *pacC*, por lo que se le ha considerado un gen alcalino. En el sistema Pal/PacC, además de *pacC*, la expresión de *palF* es aparentemente dependiente de pH siendo mayor a pH ácido y disminuyendo tras inducir estrés ambiental por alcalinidad (Bussink et al., 2015). Hasta el momento además de PacC solo se ha descrito otro elemento que actúa como regulador negativo sobre la expresión de *pacC* en hongos de la clase Leotiomycetes, la proteína “*binuclear zinc cluster*” PacX (Figura 1.2). Esta proteína de 661 aminoácidos posee un dominio de unión a DNA de tipo Zn<sub>2</sub>C<sub>6</sub> entre los residuos 445 y 472 y un dominio “*coiled-coil*” en la región N-terminal. Mutaciones de pérdida de función total en *pacX* causan un aumento de los niveles de expresión y de proteína PacC en cualquiera de sus formas e independientemente de la condición ambiental (Bussink et al., 2015) pero sin afectar a su señalización por la ruta Pal ni a los pasos proteolíticos que ocurren a pH 8.

El proceso de señalización y procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> ocurre de forma rápida y en los primeros 5 minutos tras la alcalinización del medio se detectan las formas intermedia y activa. Entre los 15 y 60 minutos de inducción la forma de 72kDa apenas se detecta y transcurrido ese tiempo muy lentamente se vuelve a acumular la forma primaria, mientras que la acumulación de las formas PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> se puede mantener hasta más de 4 horas (Bussink et al., 2015). Hasta el momento no se ha descrito función alguna para PacC<sup>53kDa</sup>, ni más función para la forma primaria de 72kDa aparte de su propia represión cuando se acumula de nuevo en la célula.

PacC es un factor transcripcional que regula la expresión de genes en ambientes alcalinos tanto en *A. nidulans* como en otros filos del reino Fungi, aunque existen pequeñas variaciones en la ruta de señalización y en las MPTs de PacC/Rim entre especies. Existen dos modelos principales de activación de este sistema: la ruta Pal de *A. nidulans* en hongos filamentosos y la ruta RIM de *S. cerevisiae* en levaduras. La relación entre la función PacC y la patogenicidad en plantas y animales se ha descrito en especies como *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* o *Cryptococcus neoformans*, entre otras. El papel como regulador transcripcional de PacC a pH alcalino permite la tolerancia a cambios de pH en los microambientes de los tejidos del organismo hospedador regulando al alza la expresión de genes que facilitan el inicio de la infección y que codifican por ejemplo, proteasas secretadas al medio extracelular o

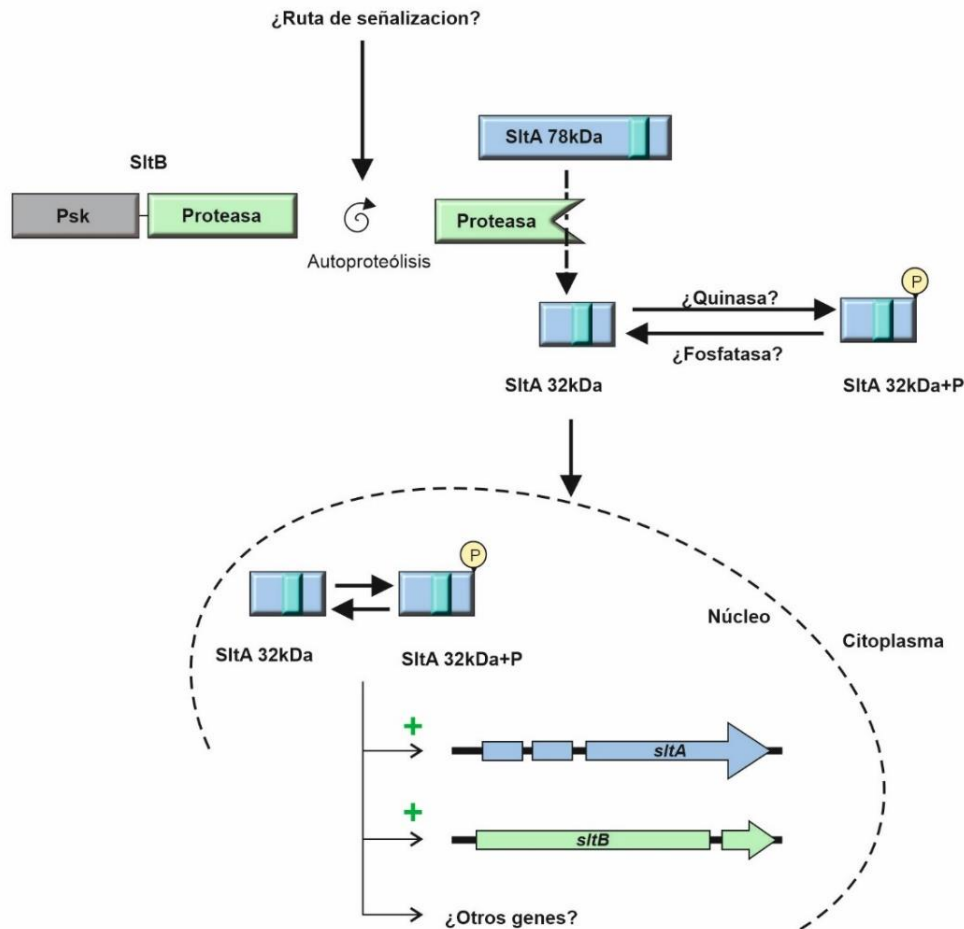
micotoxinas resultantes de la regulación de rutas del metabolismo secundario. *A. fumigatus* es el principal patógeno causante de la aspergilosis en animales inmunocomprometidos incluyendo los humanos (Bignell et al., 2005). Su proximidad filogenética con *A. nidulans* nos hace creer que la ruta de señalización y las funciones de PacC serían muy similares. En el estudio de aspergilosis invasiva por *A. nidulans* en ratones se describió el procesamiento de PacC como necesario en la infección y virulencia. Las mutaciones de ganancia de función *pacC<sup>c</sup>* resultaban en un aumento de la rapidez de crecimiento, mientras que la ausencia de función *pacC* por mutaciones *pacC<sup>-</sup>* o *paI* regulaba a la baja la expresión de genes que codifican para proteínas transportadoras, proteasas que se secretan al medio extracelular, micotoxinas u otros metabolitos secundarios (Bignell et al., 2005). En *A. fumigatus* se ha demostrado que la función reguladora de PacC es necesaria tanto en estadios iniciales de la infección como en la invasión celular por el crecimiento de las hifas, y la posterior infección llevada a cabo por una amplia variedad de proteasas (Bertuzzi et al., 2014). En el caso de *C. albicans* solo existe un paso proteolítico como en *S. cerevisiae* aunque este se produce también en condiciones de pH ácido. Al igual que en *A. fumigatus* PacC/RIM101 regula la expresión de genes relacionados con la estructura y composición de la pared celular, del transporte de iones de disponibilidad limitada como el hierro o el zinc, esenciales en procesos metabólicos, además de la regulación de genes que participan específicamente en la transición de la forma de levaduriforme a la filamentosa (Cornet & Gaillardin, 2014), lo que supone un agravamiento en el curso de la infección. En *C. neoformans* se desconoce aún como es esta ruta de señalización pero se cree que actúa coordinada con la ruta cAMP/PKA. En fitopatogénesis, los patógenos pueden modular el pH ambiental localmente para facilitar el proceso de infección y para ello muchos de los genes que codifican para proteínas secretadas al medio extracelular dependen de la regulación transcripcional de PacC. La infección por *A. carbonarius* u otras especies en frutas como la nectarina o la uva en post-cosecha suponen grandes pérdidas económicas para el sector agroalimentario, ya que a lo largo de este proceso de infección fúngica las rutas del metabolismo secundario generan micotoxinas, como la ocratoxina A (OTA), que suponen un riesgo para el consumo humano (Barda et al., 2020; Li et al., 2022). Por otro lado, encontramos una función reguladora negativa de PacC en *F. oxysporum*, donde la pérdida de función de este factor transcripcional incrementa la virulencia en comparación con los mutantes constitutivos *pacC<sup>c</sup>* en la infección de la raíz del tomate (Caracuel et al., 2003; Li et al., 2022).

## 4. El sistema de regulación transcripcional Slt

Otro de los sistemas de señalización y de respuesta por regulación transcripcional a eventos de estrés por factores ambientales es el sistema Slt, cuya función es, entre quizás otras, la regulación de la respuesta transcripcional en condiciones de estrés por alcalinidad y/o por altas concentraciones de varios cationes monovalentes y divalentes (Etxebeste & Espeso, 2019; Spielvogel et al., 2008). Hasta el momento solo se han descrito dos elementos de este sistema: el factor transcripcional SltA y su proteasa procesativa SltB. Una peculiaridad de este sistema es que, al igual que ocurre con la proteína PacX, se encuentra filogenéticamente restringido a hongos filamentosos del subfilo pezizomycotina y por tanto no se han encontrado proteínas ortólogas al sistema Slt en levaduras.

El factor transcripcional SltA es una proteína de 698 aminoácidos que presenta un dominio de unión a DNA de tres dedos de zinc de tipo C2H2 (O'neil et al., 2002) entre los residuos 416 y 500 que reconocen la secuencia consenso 5'-AGGCA-3' (Spielvogel et al., 2008). A pesar de que este dominio está altamente conservado, la región C-terminal inmediata al dominio de unión a DNA se encuentra pobremente conservada (Chilton et al., 2008; Mellado, 2014). El gen *sltA* se describió por primera vez en el mutante designado *sltA1*, el cual consta de una señal de codón stop prematuro que da lugar a una proteína de 502 residuos, excluyendo la región C-terminal inmediata al tercer dominio de dedos de zinc (O'neil et al., 2002) Esta mutación genera una forma no funcional de SltA cuyo fenotipo es igual al de un mutante nulo *sltA* (*sltAΔ*) (Spielvogel et al., 2008). En ausencia de estrés ambiental, el fenotipo del alelo nulo *sltA* presenta un leve descenso del crecimiento de la colonia y de la conidiación, y la acumulación de pigmentación oscura bajo la colonia. En condiciones de estrés ambiental, la pérdida de función SltA causa sensibilidad a elevadas concentraciones de cationes monovalentes como sodio, potasio, litio, cesio y divalentes como magnesio, pero no al calcio, el cual en ausencia de estrés mejora el fenotipo de crecimiento colonial de estos mutantes. También presenta extrema sensibilidad a productos citotóxicos, radiación UV, neomicina y al aumento de pH ambiental (O'neil et al., 2002; Spielvogel et al., 2008).

La obtención de mutaciones supresoras en fondos mutantes en genes *VPS* que codifican para proteínas que participan en la regulación del tráfico intracelular permitió identificar un segundo elemento dentro de la ruta Slt. El gen que codifica para la proteína SltB se identificó y comenzó su caracterización gracias a una mutación denominada *sltB2* que suprimía un fenotipo *vps31Δ* (Calcagno-Pizarelli et al., 2011). El mutante *sltB2*



**Figura I.3.** Modelo del sistema Sit. El factor de transcripción SitA cuenta con el dominio de unión a DNA en el extremo C-terminal (indicado en azul). Este factor de transcripción se puede encontrar en tres formas en la célula: una forma primaria de 78kDa y una forma de 32kDa que puede estar fosforilada (SitA<sup>32kDa</sup>+P) o desfosforilada (SitA<sup>32kDa</sup>). El procesamiento de SitA<sup>78kDa</sup> a su forma de 32 kDa está mediada por su proteasa procesativa SitB. Esta proteína cuenta con un dominio pseudoquinasa (Psk, indicado en gris) y un dominio proteasa (indicado en verde). SitB se autoproteoliza para llevar a cabo su función procesativa sobre SitA<sup>78kDa</sup>. Actualmente se desconoce tanto la existencia de una ruta de señalización para el procesamiento de SitB y de SitA, así como las posibles quinases y fosfatasas que modifican a SitA<sup>32kDa</sup>. Estas formas procesadas se localizan en el núcleo y llevan a cabo su función como regulador transcripcional actuando positivamente sobre su propia expresión y sobre la expresión de *sitB*, además de tener un papel regulador tanto positivo como negativo sobre otros genes.

presentaba un fenotipo de sensibilidad a estrés por alta concentración de cationes y pH alcalino en el medio extracelular similar al observado en fondos mutantes no funcionales de SitA (Mellado et al., 2015). Además, en estudios previos ya se había observado la aparición de mutaciones supresoras en *sitA* que recuperaban el fenotipo altamente sensible de mutantes nulos en determinados loci *VPS*, algunos cuyos productos están involucrados en la ruta de señalización de PacC (Calcagno-Pizarelli et al., 2011; Mellado et al., 2015) y otras involucradas en el proceso de maduración de endosomas formando parte de los complejos HOPS y CORVET (López-Berges et al., 2017).

SltB es la proteasa procesativa de SltA<sup>78kDa</sup>. SltB, es una serina proteasa de 1272 aminoácidos que contiene dos principales dominios funcionales: un dominio pseudo-quinasa de tipo Ser/Thr entre los aminoácidos 1 y 600 (región N-terminal) el cual aparentemente no es funcional, y un dominio proteasa en la región C-terminal. En el dominio proteasa existen residuos altamente conservados que podrían conformar la triada catalítica His-Ser-Asp (residuos His939, Ser1142 y Asp1036) similar a la proteasa Ssy5 de levaduras (Mellado et al., 2015).

A diferencia de lo descrito en el sistema Pal/PacC, el sistema Slt aparentemente no requiere de una ruta de señalización ya que la activación de la proteasa procesativa SltB es constitutiva en las condiciones ambientales estudiadas y tanto la forma primaria como las formas procesadas de SltA coexisten en la célula independientemente de la condición ambiental (Mellado et al., 2016). La forma primaria de SltA se estima que tiene un tamaño de 78kDa que tras su proteólisis da lugar a una forma de 32kDa que puede estar o no modificada post-traduccionalmente por fosforilación (SltA<sup>32kDa+P</sup> y SltA<sup>32kDa</sup>, respectivamente) (Mellado et al., 2016) (Figura I.3). Aunque se ha logrado obtener de manera exclusiva tanto la forma primaria SltA<sup>78kDa</sup> mediante la pérdida de función total de SltB, como las formas procesadas de 32kDa mediante la mutación SltA<sup>Met400</sup> (forma sintética de SltA expresa la proteína a partir del aminoácido 400 bajo el promotor de tiamina) (Mellado et al., 2016) no se ha logrado identificar las quinasas o fosfatasa que participan en las modificaciones postraduccionales de SltA<sup>32kDa</sup>, sin poder asignar funciones específicas a cada forma (Figura I.3). Se ha propuesto que la forma primaria de 78kDa debe tener un papel importante en la respuesta específica a pH alcalino ambiental ya que el mutante SltA<sup>Met400</sup> es capaz de responder al estrés ambiental causado por elevadas concentraciones de ciertos cationes pero presenta cierta sensibilidad al pH alcalino, mientras que las formas procesadas deben poseer la principal función como regulador transcripcional en ambas condiciones de estrés (Mellado et al., 2016). En trabajos previos se ha tratado de identificar la quinasa responsable de la fosforilación de SltA<sup>32kDa</sup>. Entre las proteínas quinasa candidatas se contemplan a CkiA y GskA, que además estarían encargadas de fosforilar al factor de transcripción CrzA que participa en la tolerancia a estrés por pH alcalino o por elevadas concentraciones de calcio (Apostolaki et al., 2012; Hernández-Ortiz & Espeso, 2013), o las quinasas HalA y PkaA por su relación con la respuesta a estrés osmótico o por su participación en otras rutas de señalización celular (Picazo, 2016). Sin embargo, los datos actuales no han permitido identificar aún la/s quinasa/s implicada/s. Además de los elementos aún desconocidos que forman parte del sistema Slt, tampoco se ha logrado determinar experimentalmente la localización subcelular de SltA de manera

directa. Al igual que ocurre con Vps32, el etiquetado de SltA con proteínas fluorescentes como GFP generan formas de SltA no funcionales y únicamente el etiquetado con la proteína hemaglutinina (HA), ha permitido la inmunodetección de las formas de SltA y detectar su localización subcelular con técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Estos análisis ubican la forma completa de 78kDa en el citoplasma mientras que las formas procesadas se localizan en los núcleos celulares independientemente de la condición ambiental (Mellado et al., 2016). A diferencia de SltA, la fusión de SltB con GFP fue viable tanto en el extremo C-terminal como N-terminal, presentando en ambos casos una localización citoplasmática. Tanto la delección de *sltB* como de alguno de sus dos dominios inhibe el procesamiento de SltA<sup>78kDa</sup> a las formas de 32 kDa, y en condiciones de estrés ambiental estas mutaciones resultan en un fenotipo de alta sensibilidad, indistinguible de los mutantes no funcionales de SltA (Mellado et al., 2015, 2016). En Mellado y colaboradores (Mellado et al., 2016), se han propuesto dos posibles modelos de la señalización en el procesamiento de SltA, en los que o SltB reclutaría a SltA<sup>78kDa</sup> y posteriormente se autoactivaría mediante autodigestión para después llevar a cabo la proteólisis de SltA<sup>78kDa</sup>, o tendría lugar primero la autoactivación de SltB que permitiese la interacción con SltA<sup>78kDa</sup> para su consiguiente proteólisis por la forma activa de SltB.

En cuanto a la función de SltA como regulador transcripcional encontramos que de manera similar a lo que ocurre con PacC, SltA parece tener un papel dual actuando positivamente sobre la expresión de ciertos genes y negativamente sobre otros. Como genes regulados positivamente encontramos al propio *sltA* y a *sltB*. Al igual que PacC, SltA también parece actuar como regulador positivo sobre ciertas rutas relacionadas con la morfogénesis, así como sobre rutas del metabolismo secundario como la biosíntesis de esterigmatocistina, compuesto precursor de las aflatoxinas, en condiciones de estrés por elevadas concentraciones de catión potasio (Shantappa et al., 2013). También se ha detectado que actúa como regulador positivo en respuesta a otros tipos de estrés ambiental como elevadas concentraciones de boro a través de la familia SLC de proteínas transportadoras de aniones sulfato, borato y carbonato, SbtA y SbtB (Villarino et al., 2017). Por otro lado, se ha identificado un papel regulador negativo sobre la expresión de *vcxA*, que codifica para una proteína transportadora de Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> en las membranas vacuolares, y cuyos niveles de expresión aumentan en ausencia de *sltA* en una condición de estrés por alta concentración de catión calcio en *A. nidulans* (Spielvogel et al., 2008).

El fenotipo de sensibilidad a ciertos estreses ambientales en mutantes *slt* tiene como excepción el estrés causado por el aumento de la concentración del calcio extracelular. Este fenotipo descrito como auxotrofia de calcio puede tener un efecto aditivo al

combinarlo con alelos *halA*<sup>-</sup> (*halA24*, *halAΔ*), cuyos mutantes simples también presentan dicho fenotipo de auxotrofia al calcio y sensibilidad a altas concentraciones de cationes de sodio o potasio (O'neil et al., 2002; Spielvogel et al., 2008). La ausencia de SltA funcional causa una hipertrofia vacuolar con cambios en el tamaño de las vacuolas y en su distribución a lo largo de la hifa en cualquier condición ambiental en comparación con una cepa silvestre (Findon et al., 2010; Spielvogel et al., 2008). El estudio en profundidad del fenotipo de auxotrofia de calcio permitió identificar a los genes *pmcA* y *pmcB* que codifican dos proteínas ATPasa de calcio en la vacuola como los más probables responsables de la hipertrofia vacuolar y del fenotipo observado. Por un lado, la ausencia de función SltA incrementaba los niveles de expresión de ambos genes *pmc* indicando un papel de regulación negativa de SltA sobre estos genes. Por el otro, el fenotipo de auxotrofia de calcio y la hipertrofia vacuolar eran suprimidos mediante la delección de ambos genes en un fondo genético mutante *sltAΔ* y en mutantes cuádruples *sltAΔ*, *halAΔ*, *pmcAΔ*, *pmcBΔ* (Findon et al., 2010).

La distribución filogenética de SltA se reduce al subfilo Pezizomycotina, a diferencia de los otros FTs que regulan la tolerancia a la alcalinidad ambiental o al estrés catiónico CrzA y PacC. En levaduras no se ha logrado identificar un FT homólogo a SltA y únicamente se ha descrito como posible homólogo el represor transcripcional Ace1 de los genes que codifican para celulasa y xilanasas en *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) (O'neil et al., 2002; Spielvogel et al., 2008). Entre las especies más cercanas filogenéticamente a *A. nidulans*, dentro de la clase Eurotiomycetes, se han descrito recientemente nuevas funciones reguladoras de SltA sobre la expresión de genes relacionados con la ruta de biosíntesis de ergosterol y en otras proteínas transportadoras que participan en la resistencia a azoles en el patógeno *A. fumigatus* en coordinación con otros factores de transcripción como CrzA, SrbA y AtrR (Du et al., 2021). También se ha identificado como regulador transcripcional de algunos genes que participan en rutas del metabolismo secundario de síntesis de micotoxinas que se activan en la invasión de células hospedadoras durante la infección de aspergilosis (H. Liu et al., 2021). En especies fitopatógenas como *Colletotrichum gloeosporioides* el papel regulador de SltA no parece tan importante en la tolerancia a estrés ambiental por diferentes cationes, aunque sí mantiene el fenotipo de auxotrofia de calcio descrito en *A. nidulans*, y un papel regulador en el proceso de formación del apresorio, una estructura celular clave en la infección de frutas como el aguacate o el mango (Dubey et al., 2016).

# Objetivos



Los objetivos de esta tesis doctoral se enfocan en entender el papel regulador del factor transcripcional SltA tanto en condiciones de ausencia de estrés como en condiciones en las que la función SltA es necesaria, como es el caso del estrés causado por la alcalinización del medio y por altos niveles de sodio. Para ello nos centraremos en definir los patrones de expresión génica en *Aspergillus nidulans* en respuesta a estos estreses y tras estudiar el papel de SltA, se elegirán diferentes rutas para un estudio más detallado. En particular hemos definido los siguientes objetivos generales:

**1. Describir la respuesta transcripcional de *Aspergillus nidulans* en condiciones de estrés por alta concentración de sodio y por pH alcalino.**

Evaluando en la cepa silvestre el efecto de cada tipo de estrés comparado con una condición de cultivo estandarizada y a continuación evaluar el patrón de expresión en estas condiciones en un fondo nulo *sltA*.

**2. Analizar las rutas y/o genes desregulados en el fondo nulo *sltA* con una relación estrecha a la respuesta a los estreses abióticos propuestos.**

De los análisis transcriptómico realizado en el objetivo 1 se seleccionarán aquellas rutas/genes con alta dependencia de SltA para una caracterización más detallada.

**3. Definir el nivel de jerarquía entre SltA y el factor que media la respuesta a la alcalinización ambiental PacC.**

SltA se ha descrito como un factor transcripcional que regula la respuesta a estrés por cationes y pH ambiental pero no es el único sistema de este tipo presente en *A. nidulans*. Existen otros sistemas reguladores encabezados por factores transcripcionales de dedos de zinc como SltA: PacC y CrzA. El sistema PacC y su ruta de señalización y respuesta al pH ambiental Pal, han sido ampliamente estudiados en el laboratorio.



# **Materiales y Métodos**



## 1. Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados para este trabajo se ha estandarizado en el laboratorio y se detalla en otros trabajos (Cove, 1966; Mellado, 2014; Pontecorvo et al., 1953).

En todos los experimentos mostrados en la sección de Resultados en los que se requería el crecimiento de micelio en medio líquido en matraz se usó el medio mínimo de *Aspergillus* (MMA). Este medio está compuesto para un volumen final de 1 L por 20 mL de una solución concentrada (20x) de sales (26 g/L KCl, 26 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 76 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y por 1 mL de una solución concentrada de elementos traza sin fosfatos (1000x) (40 mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 400 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 800 mg FeCl<sub>3</sub>, 8 g ZnCl<sub>2</sub>, 800 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O). Este mismo medio incluyendo agar Oxoid al 1% (p/v) se usó para mantenimiento o purificación de cepas en placas de Petri. Para la regeneración de los protoplastos en placas de Petri, el medio mínimo usado incluye además sacarosa al 1% (p/v) y se describe en el protocolo de transformación como medio mínimo de regeneración (MMR) o medio mínimo de regeneración TOP (MMR-TOP) según el porcentaje de agar en cada caso, un 1% (p/v) o un 0,4% (p/v), respectivamente. En todos los cultivos de medio mínimo, a excepción del MMR-TOP, es necesario añadir las fuentes de carbono (D-glucosa 1% (p/v)) y nitrógeno (5 mM tartrato de amonio), además de los suplementos específicos que complementen las auxotrofías de cada cepa. Por otro lado, el medio mínimo específico para microscopía de fluorescencia no contiene los fosfatos (MMA-P) en la solución de sales empleada en el MMA estándar. Este medio se suplementa con una fuente de carbono de D-glucosa 0,1% y con tartrato de amonio (5 mM) como fuente de nitrógeno. Además, se incluyen una fuente de fosfato (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y los suplementos necesarios para cubrir las auxotrofías de cada cepa. Excepcionalmente la adición de riboflavina en cultivos para microscopía de fluorescencia se realiza en una concentración final menor a la habitual en otros cultivos para evitar interferencias en la detección la señal GFP.

En el rescate y el replicado de cepas conservadas en la colección se recurrió al medio completo de *Aspergillus* (MCA) que también consta de la solución de sales, solución de casaminoácidos (1 mL por 100 mL), 10 g/L D-glucosa, 2 g/L bactopectona, 1 g/L extracto de levadura y agar Oxoid al 1 % (p/v). En la preparación de las placas con este medio de cultivo se requiere únicamente de la adición de la fuente de nitrógeno elegida (5 mM tartrato de amonio) y 1 mL/100 mL (v/v) de la solución concentrada de vitaminas (Mellado, 2014).

Antes de su uso, en todos los medios de cultivo se ajustó el pH a un valor de 6,8 mediante la adición de NaOH y posteriormente dichos medios se autoclavaron. Salvo que se indique lo contrario los cultivos en medio líquido se incubaron en matraces de 250 mL a 37°C en un agitador orbital a 250 rpm durante 15-18 horas antes de su recolección y los cultivos en medio sólido, en placas de Petri, se incubaron a 37°C durante 48 horas.

El micelio crecido en cultivos de medio líquido se recupera por filtración empleando Miracloth (muselina con un poro de 22-25  $\mu\text{m}$ ), para su tratamiento posterior en función del procedimiento experimental. Para la extracción de RNA total, el micelio se congeló añadiendo nitrógeno líquido para su pulverización, como se indica en el protocolo del apartado 5 de esta sección. Para la extracción de DNA genómico (apartado 4) o para la obtención de proteína total mediante lisis alcalina (apartado 10), el micelio filtrado se congeló rápidamente a -80°C antes de su proceso de liofilizado (Cryodos, Telstar) durante 16 horas. El micelio liofilizado se pulverizó en el homogeneizador "Fast-prep" (BIO101) (velocidad 4 m/s, 20 segundos) con bolas de cerámica en tubos de tapón de rosca de 2 mL.

## 2. Ensayos de estrés ambiental

La inducción *in vitro* de las condiciones de estrés ambiental en las células fue diferente en función del tipo de cultivo diferenciándose entre medio líquido para los análisis de RNAseq, qPCR, Inmunodetección ("*Western Blot*"), medio de microscopía y el medio de cultivo con agar para análisis fenotípicos.

Los cultivos en medio líquido para la obtención de micelio se prepararon en matraces de 250 mL con 50 mL de MMA suplementado con las fuentes de carbono, D-glucosa al 1% (p/v), y de nitrógeno, 5 mM tartrato de amonio, y los requerimientos específicos de cada cepa. En cada matraz se inocularon 5 mL de una suspensión de conidiosporas en solución Tween 80 al 0,1%. Los matraces se incubaron entre 16 y 18 horas a 37°C con agitación orbital de 250 rpm. Posteriormente uno de los cultivos se reservó en esta condición de cultivo estándar como control y en el resto se adicionó uno de los compuestos indicados en la Tabla 1 para inducir la condición de estrés ambiental a estudiar (estrés por elevadas concentraciones de catión sodio, calcio, o magnesio, o por alcalinización ambiental). El micelio de cada matraz se recogió en los tiempos de inducción de estrés indicados en cada caso. En los ensayos de estrés por alcalinización ambiental (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) se registró el pH del medio de cultivo en la condición

estándar (control) y tras la incubación de los cultivos en la condición de alcalinidad en cada tiempo experimental estudiado.

**Tabla 1.** Listado de los productos utilizados en la inducción de estrés ambiental

Compuesto	Concentración stock	Concentración final
Cloruro de sodio (NaCl)	-*	1 M
Fosfato de disodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2 M	100 mM
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	5 M	10 mM
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	5 M	200 mM

\* El símbolo “-“indica que el compuesto se añade directamente, sólido o líquido

Para los análisis de fenotipo sobre medio sólido en condiciones de estrés las conidiosporas se inocularon puntualmente usando palillos estériles. Normalmente se usó MMA-agar al 1% y suplementado con las fuentes de carbono y nitrógeno habituales, además de los suplementos necesarios como se ha descrito anteriormente. Las condiciones estudiadas incluyen, además de las mencionados en la tabla 1, otros compuestos cuyas concentraciones stock y finales se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Listado complementario de los productos utilizados en la inducción de estrés ambiental

Compuesto	Concentración stock	Concentración final
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> )	-*	5 mM y 15 mM
Cloruro de litio (LiCl)	5 M	0,3 M
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	5 M	0,2 M y 50mM
Cloruro de potasio (KCl)	-*	1 M

\* El símbolo “-“indica que el compuesto se añade directamente, sólido o líquido

En los ensayos de microscopía de fluorescencia los cultivos se prepararon en placas de cultivo para microscopía de 8 pocillos (Ibidi GmbH) con 300 µL de MMA-P suplementados con las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato además de los suplementos específicos de cepa (apartado 1 de Materiales y Métodos). En cada pocillo se inocularon conidiosporas directamente desde la placa, o 5 µL de una solución de conidiosporas en Tween 80 al 0,1%. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 15 horas. Una vez crecido el micelio, la inducción de alcalinización ambiental se llevó a cabo cambiando el medio de cultivo estándar por medio fresco alcalinizado con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. En los ensayos de tinción con CMAC para la visualización de endosomas tardíos y vacuolas el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco con 10 µM CMAC y se procedió seguidamente a la toma de imágenes durante 30 minutos.

### 3. Listado de cepas y oligonucleótidos

A continuación, se muestra en la Tabla 3 el listado de las cepas usadas en este trabajo, así como las cepas obtenidas mediante transformación o cruce con el código de colección, el genotipo y el origen de la obtención de estas estirpes.

**Tabla 3.** Cepas usadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD973	<i>yA2, pabaA1, argB2, pacC<sup>°</sup>700</i>	Colección CIB
MAD1132	<i>wA3, sltA1, pantoB100</i>	Colección CIB
MAD1427	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::argB (argB2), riboB2</i>	(Mellado, 2014)
MAD1445	<i>yA2, pabaA1, pacC<sup>°</sup>14900</i>	(Hervás-Aguilar et al., 2007)
MAD1652	<i>yA2, pabaA1, pacX20, pacC900</i>	(Bussink et al., 2015)
MAD1775	<i>pyrG89, pyroA4, inoB2, nkuAΔ::bar, palBΔ::pyroA, pacC900</i>	Colección CIB
MAD1929	<i>pyroA4, pacX-GFP, hhoA-mRFP, riboB2</i>	Colección CIB
MAD2221	<i>inoB2, palA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>, palH72</i>	(Galindo et al., 2012)
MAD2234	<i>palA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	
MAD2352	<i>wA4, pyrG89, pyroA4, inoB2, palF::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Af</sup>, nkuAΔ::bar, pacC900</i>	(Bussink et al., 2015)
MAD2733	<i>pabaB22, nkuAΔ::argB (argB2)</i>	(Marquina Iñarraeagui, 2011)
MAD3367	<i>pantoB100, vps23::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	(Galindo et al., 2012)
MAD3369	<i>pyroA4, palF15, vps23::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	
MAD3419	<i>inoB2, pacC900, sltA60</i>	Colección CIB
MAD3652	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::argB (argB2), sltA::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Af</sup>, riboB2</i>	(Mellado et al., 2016)
MAD3693	<i>pyrG89, pabaB22, argB2, nkuAΔ::argB, sltA::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Af</sup>, riboB2, sltBΔ::riboB<sup>Af</sup></i>	
MAD3816	<i>pyroA4, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup>, riboB2, nkuAΔ::argB(argB2)</i>	
MAD3919	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::argB (argB2), sltAΔ::riboB<sup>Af</sup>, riboB2</i>	
MAD4096	<i>Protótrofa</i>	(Sebastián-Pérez et al., 2016)
MAD4097	<i>sltAΔ</i>	
MAD4296	<i>yA2, pyrG89, biA1, pabaA1, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup>, argB2, pacC<sup>°</sup>14900</i>	(Mellado et al., 2016)
MAD4499	<i>pabaA1, pantoB100, pacC900, pyroA4::[gpdA<sup>mini</sup>::palF(cDNA)::ha<sub>3x</sub>::Ub::pyroA<sup>trunc</sup>]</i>	Colección CIB
MAD5736	<i>pyrG89, pyroA4</i>	Colección CIB
MAD6669	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::argB(argB2), riboB2, sltA::ha<sub>3x</sub>::riboB<sup>Af</sup></i>	(Picazo et al., 2020)
MAD25ED	<i>pyrG89, enaA::gfp::pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, nkuAΔ::bar</i>	(Markina-Iñarraeagui et al., 2020)
MAD26ED	<i>pyrG89, enaB::gfp::pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, nkuAΔ::bar</i>	
MAD7621	<i>nkuAΔ::argB(argB2)?, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup>, pacX20</i>	Este trabajo
MAD7622	<i>wA3, sltA1, pacX20</i>	Este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD7623	<i>yA2, pyrG89?, pabaA1?, pabaB22?, nkuAΔ::argB(argB2)?, sltBΔ::riboB<sup>Af</sup>, sltA::ha<sub>3x</sub>::pyrG<sup>Af</sup>, pacX20, pacC900, riboB2?</i>	Este trabajo
MAD7624	<i>nkuAΔ::argB(argB2)?, pacX20, sltA::ha<sub>3x</sub>::riboB<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD7625	<i>pyrG89?, pyroA4, nkuAΔ::argB(argB2)?, sltAΔ::riboB<sup>Af</sup>, pacX-GFP, hhoA-mRFP, riboB2?</i>	Este trabajo
MAD7626	<i>pyrG89?, pyroA4, nkuAΔ::argB(argB2)?, pacX-GFP, hhoA-mRFP, riboB2</i>	Este trabajo
MAD7627	<i>wA4, nkuAΔ::argB(argB2)?, nkuAΔ::bar?, pacC900, palF500</i>	Este trabajo
MAD7628	<i>pyroA4, inoB2, nkuAΔ::argB(argB2)?, nkuAΔ::bar?, pacX20, pacC900, palF500</i>	Este trabajo
MAD7629	<i>wA4, pyroA4, nkuAΔ::argB(argB2)?, nkuAΔ::bar?, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup>, pacX20, pacC900, palF500</i>	Este trabajo
MAD7630	<i>pyroA4, nkuAΔ::argB(argB2)?, nkuAΔ::bar?, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup>, pacC900, palF500</i>	Este trabajo
MAD7632	<i>pyroA4, pabaA1, nkuAΔ::argB(argB2)?, argB2?, pacC<sup>C</sup>700, riboB2</i>	Este trabajo
MAD7633	<i>yA2, pyroA4, pabaA1, nkuAΔ::argB(argB2)?, argB2?, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup>, pacC<sup>C</sup>700, riboB2</i>	Este trabajo
MAD7634	<i>wA4, inoB2, nkuAΔ::argB(argB2)?, nkuAΔ::bar?, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup>, pacC900, gpdA<sup>mini</sup>::palF (cDNA)::ha3x::Ub::pyroA<sup>trunc</sup></i>	Este trabajo
MAD7667	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::argB(argB2), sltAΔ::riboB<sup>Af</sup>, riboB2, enaA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD7668	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::argB(argB2), sltAΔ::riboB<sup>Af</sup>, riboB2, enaB::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD7669	<i>pyrG89, pyroA4, nkuAΔ::bar, vps23::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD7670	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::bar, sltAΔ::riboB<sup>Af</sup>, riboB2, vps23::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD7797	<i>pyrG89, pabaB22, riboB2, nkuAΔ::argB(argB2), AN6618Δ::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD7798	<i>pyrG89, pabaB22, riboB2, nkuAΔ::argB(argB2), AN7792Δ::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD8032	<i>pyrG89, pabaB22, nkuAΔ::bar, sltAΔ::riboB<sup>Af</sup>, riboB2, palA::gfp::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD8108	<i>pyrG89, nkuAΔ::bar, pyroA4, inoB2, palBΔ::pyroA, sltAΔ::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD8230	<i>pyrG89, pabaB22, riboB2, nkuAΔ::argB(argB2), AN2477Δ::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD8231	<i>pyrG89, pabaB22, riboB2, nkuAΔ::argB(argB2), AN7165Δ::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD8232	<i>pyrG89, pabaB22, riboB2, nkuAΔ::argB(argB2), AN2477Δ::pyrG<sup>Af</sup>, AN7165Δ::riboB<sup>Af</sup></i>	Este trabajo
MAD8233	<i>pyrG89, nkuAΔ::bar, pyroA4, AN2477::gfp::pyrG<sup>Af</sup>, AN7165::cherry-red::pyroA</i>	Este trabajo
MAD8234	<i>pyrG89, nkuAΔ::bar, pyroA4, AN6940Δ::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este trabajo

En la Tabla 4 se listan los oligonucleótidos usados en este trabajo, indicándose el número con el que se han guardado en la colección de oligonucleótidos, el nombre de cada oligonucleótido diseñado y la secuencia génica del mismo. En el nombre de cada oligonucleótido de qPCR se indica numéricamente cual es el “forward” (1) y el “reverse” (2). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por las casas comerciales Sigma-Aldrich e IDT y se guardaron a -20°C con una concentración stock de 100 µM.

**Tabla 4.** Listado de oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nº	Nombre	Secuencia (5' → 3')
1	qPCR-sltA1	TCCTCAGCAACAGACTACCTCGC
2	qPCR-sltA2	CAAGATCGAACGGTTCAGACGG
3	qPCR-sltB1	ATCAACCAGGATCGCTTAGACGC
4	qPCR-sltB2	GTACGTTACCATCGTCAACGC
5	qPCR-pacC1	CTACATTGCCAACCGTCTTGAGC
6	qPCR-pacC2	GGGATACATCACACTGTCCTCGG
7	qPCR-palF1	CTCTTGCCTAGTCAACCTCCGTG
8	qPCR-palF2	CGCTCCAACCTCTGTTTATCCTC
9	qPCR-pacX1	TCAGCAGTAAGGGAGGTGTCTCC
10	qPCR-pacX2	GATCCTGATCCCGCTCCATATC
11	qPCR-AN7792-1	GGAACAGTGGATAGGCAGTGGCC
12	qPCR-AN7792-2	CCACGTCCAAGTCAACAGAGCCA
13	qPCR-AN6618-1	GTCGGCAGATTGAAGCCATTGAC
14	qPCR-AN6618-2	CGAGTGCTGGCTATTCCCATTG
15	qPCR-AN11138-1	AAAGCCGACGTTATTCGTGG
16	qPCR-AN11138-2	GTAGCGATAAGTGTCACTTGC
17	qPCR-AN5856-1	CAATGTACGGCGTTCGTATCC
18	qPCR-AN5856-2	ACACGTTCGAGCATTTCACC
19	qPCR-AN3231-1	AACAGGGCGTAGACACAATGG
20	qPCR-AN3231-2	TGGCCATCATTGTCAAGACG
21	qPCR-AN6940-1	TGGCCATCATTGTCAAGACG
22	qPCR-AN6940-2	TCCAAAGAACCATGCCAACG
23	qPCR-AN2477-1	CTGATTGTTGCTATGTCTGCTCC
24	qPCR-AN2477-2	GCTCCTCAGCAACCGTATTATGC
25	qPCR-AN7165-1	ACATTGCCGAGGTCCGTGTCTCG
26	qPCR-AN7165-2	TGTACACGCTGACTCGGTCGCG
27	qPCR-benA1	AGATGCGCAACATCCAGAGC
28	qPCR-benA2	CTGGTACTCGGAGACGAGATCG
29	vps23-GSP1	CAACAGATTGCTCCAGCACAGC
30	vps23-GSP4	CCTGCACCGAATGTGCAACTATAC
31	palA-GSP1	CATGCCGAAGAAATGCGTCAAC
32	palA-GSP4	CTTACTTTCCGACCTCCACATC
33	pacX-UP	TTGCGTCTTGGTTGTCTCTCGC
34	pacX-DW	ACTCTACCACGTCCAACCAGG
35	AN6940-PP1	GTTCTGGAGGATGAAGCTCGGCTACGATCG
36	AN6940-PP2	CTCCAATTAGGCTGCAGCGAAATTTGCAGG
37	AN6940-SMP1	CCTGCAAATTTGCTGTCAGCCTAATTGGAGACCGGTCGCCTC AAACAATGCTCT
38	AN6940-GFP2	GGCATAACAGGCACTATCTGCTCTGTCTGAGAGGAGGCA CTGATGCG

Nº	Nombre	Secuencia (5' → 3')
39	AN6940-GSP3	AGAGAGCAGATAGTGCCTGTTATGCC
40	AN6940-GSP4	CGTCGAGTGGACAGAAGGCATTGAGC
41	AN7792-PP1	TCAGGAATCAATCAGCAACGTCTGCG
42	AN7792-PP2	CGCTCTTCAGGCAGAGGAGATACC
43	AN7792-SMP1	GGTATCTCCTCTGCCTGAAGAGCGACCGGTGCGCTCAAACA ATGCTCT
44	AN7792-GFP2	CCAGAGTGTTCACGCCAGTGACCAGTCTGAGAGGAGGC ACTGATGCG
45	AN7792-GSP3	TGGTCACTGGCGTGAGAAACACTCTGG
46	AN7792-GSP4	TGCCACAAGTCTGGATCACTGAACTCG
47	AN6618-PP1	GCACTTCGTACCAGGTCGGCGGGTAGTATA
48	AN6618-PP2	CTCAAGATCTATACCTGAGGCAACCTTGAG
49	AN6618-SMP1	CTCAAGATCTATACCTGAGGCAACCTTGAGACCGGTGCGCTC AAACAATGCTCT
50	AN6618-GFP2	TAGCTAAAGTGCCTTTCTTACCATATAGTTGTCTGAGAGGAG GCACTGATGCG
51	AN6618-GSP3	AACTATATGGTAAGAAAGGCACTTTAGCTA
52	AN6618-GSP4	CACATGCTCCAGAAGAGAGTTCAGTGAAGC
53	enaA-PP1	CGGAAAGACCTTACCATGATTCGC
54	enaA-GSP4	CAACCACAACCTCGATACTTCGC
55	enaB-PP1	CAACAACCAGCTCAGCCGTTTGC
56	enaB-GSP4	AGCTAGCCCTCCAAGCCAACAC
57	AN2477-PP1	CGTCGCCTGTTGTCAGCATTGCCTATGAGC
58	AN2477-PP2	CTCAATGATTTGGTCAAAGCCTAGTTTAGGC
59	AN2477-SMP1	GCCTAAACTAGGCTTTGACCAAATCATTGAGACCGGTGCGCT CAAACAATGCTCT
60	AN2477-GSP1	TATGACCAGGTTACAGGCGAGACAAGG
61	AN2477-GSP2	TTGCTGCTTCTTCATATCCGGTTTCGCC
62	AN2477-GFP1	GGCGAAACCGGATATGAAGAAGCAGCAAGGAGCTGGTGCAG GCGCTGGAGCC
63	AN2477-GFP2	GGGAGTTGACAAACGCGTACTCTGCATACAGTCTGAGAGGA GGCACTGATGCG
64	AN2477-GSP3	TGTATGCAGAGTACGCGTTTGTCAACTCCC
65	AN2477-GSP4	TTCTGAGCCTCATCCCAGTAAACAGGCTCC
66	AN7165-PP1	AGGGTCTACAAGAGTCAGTGGCTCCTTGC
67	AN7165-PP2	TGCATGGATGAACACTGATACGACTGAACAACG
68	AN7165-SMP1	CGTTGTTTCAGTCGTATCAGTGTTTCATCCATGCAACCGGTGCGC CTCAAACAATGCTCT
69	AN7165-GSP1	CGTTCGCAGTCGGGAAGTGTCTTTGG
70	AN7165-GSP2	CATCTCCTTCTCCCCCTTCCGCC
71	AN7165-GFP1	GGCGGAAGGGGAGAAGGAGATGGGAGCTGGTGCAGGCGC TGGAGCC
72	AN7165-GFP2	CCTTGCTCGGCAGCCCTACGCTCAGACTGTCTGAGAGGAGG CACTGATGCG
73	AN7165-GSP3	AGTCTGAGCGTAGGGCTGCCGAGCAAGG
74	AN7165-GSP4	GCACTCAGACTCGCTTTACAGGGCAGC

#### 4. Extracción de DNA genómico

Tanto para generar construcciones génicas (casetes), como para la verificación de mutantes obtenidos mediante cruce o transformación, se han realizado extracciones de DNA genómico (gDNA) mediante dos protocolos que parten de muestras biológicas tratadas de manera diferente. Por un lado, se realizó el protocolo de extracción de DNA a partir de micelio liofilizado, que permite obtener una alta concentración y grado de pureza de gDNA para la obtención de fragmentos que se usaron en las transformaciones. Por otro lado, la obtención de gDNA a partir de conidiosporas, recogidas directamente de la placa, permite obtener una concentración y calidad suficientes para el genotipado de cepas transformantes o progenie de un cruce.

Para la extracción de gDNA se recogieron aproximadamente 300 mg de micelio liofilizado y pulverizado (apartado 1 de la sección de Materiales y Métodos) y se mezclaron en un tubo de 2 mL con 1 mL de solución de extracción de DNA (25 mM Tris-pH8; 0,25 M sacarosa; 20 mM EDTA) y 100 µL de 10% SDS. La muestra se incubó a 65°C durante 10 minutos y después se añadió 1 mL de fenol-SEVAG (fenol/cloroformo/isoamil alcohol (49:49:2)) para una incubación a RT en un agitador de rotación durante 15 minutos y se centrifugaron a 16100 xg a RT durante 5 minutos. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo de 2 mL y se repitió el proceso de fenolización. El volumen obtenido se mezcló por inversión con 3 M acetato sódico (pH 6) (1/10, v/v) y 0,6 volúmenes de isopropanol (v/v) y seguidamente se incubó 15 minutos a RT para obtener el gDNA precipitado. La muestra se centrifugó a 16100 xg a RT durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó por inversión con 1 mL de etanol al 80% y se centrifugó de nuevo. El pellet resultante se secó ligeramente y se disolvió en 500 µL de agua miliQ y se trató con 1 µL/100 µL de RNAsa A (5 mg/mL, Roche) durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación el DNA se precipitó de nuevo añadiendo 3 M acetato sódico (pH 6) (1/10, v/v) e isopropanol (0,6 volúmenes) y la madeja obtenida se recogió para lavarla por inversión en 0,5 mL de etanol al 80%. El gDNA se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones descritas anteriormente y se retiró el etanol con la bomba de vacío. El extracto de gDNA se resuspendió en 0,2 mL de agua miliQ.

En el protocolo de extracción de DNA genómico a partir de conidiosporas, estas fueron recogidas directamente de una parte de la placa de Petri con un palillo estéril a tubos de 1,5 mL de tapón de rosca con 200 µL de tampón de lisis (Triton X-100 al 2% (v/v); SDS al 1% (p/v), 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) añadiendo también 100 mg de bolas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro. Tras aplicar 30 segundos de agitación usando un *vortex*, las muestras se incubaron a 70°C durante 30 minutos

agitándolas de nuevo en el *vortex* durante 30 segundos cada 10 minutos. Tras la incubación se añadieron 200  $\mu$ L de fenol-SEVAG y se aplicó agitación en *vortex* durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 16100 xg a RT durante 5 minutos y a partir de la fase superior resultante se transfirieron 20  $\mu$ L a un nuevo tubo. Para el protocolo de PCR se usaron 0,5-1  $\mu$ L del producto de extracción.

## 5. Extracción de RNA total

La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del protocolo “*TRI Reagent protocol*” (Sigma-Aldrich) adaptándolo a las necesidades de *A. nidulans*. El micelio se obtuvo como se indica en el apartado de condiciones de cultivo y ensayos de estrés ambiental (apartado 1 y 2 de la sección Materiales y Métodos). Todo el protocolo de extracción de RNA se llevó a cabo con guantes y usando material estéril o tratado con etanol. El micelio filtrado se congeló en hielo seco (-80°C) y se pulverizó en un mortero de cerámica usando nitrógeno líquido. De cada muestra se usaron aproximadamente entre 50 mg y 100 mg para su tratamiento con 1 mL de *TRI-Reagent* (Invitrogen) en tubos de 2 mL. La mezcla se incubó 5 minutos a RT y posteriormente se mezclaron con 0,2 mL de cloroformo. Tras una incubación a RT durante 5 minutos las muestras fueron centrifugadas a 13500 xg durante 15 minutos a 4°C. La fase superior se transfirió a un tubo de 2 mL nuevo y se repitió el tratamiento con *TRI Reagent* y cloroformo. Para el precipitado de RNA, el volumen obtenido se mezcló por inversión con 0,5 mL de isopropanol e incubando 10 minutos a RT y centrifugando el precipitado a 13500 xg 15 minutos a 4°C. Alternativamente, para el precipitado de RNA, también se incubó el sobrenadante en hielo 30 minutos con una solución de LiCl (concentración final de 3 M) y una centrifugación a 13500 xg a 4°C 30 minutos. El RNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó de nuevo a 5300 xg a 4°C 5 minutos. El pellet resultante de cada muestra se disolvió en 0,1 mL de agua miliQ y se incubó a 60°C durante 10 minutos. Una vez disuelto se procedió a su almacenaje a -80°C o a su tratamiento para la obtención de cDNA.

## 6. Protocolos básicos y avanzados de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR

Para la obtención de los fragmentos de DNA necesarios en la preparación de los casetes de transformación o en el genotipado de las cepas mutantes obtenidas por

transformación o cruce, se siguieron las indicaciones del fabricante (“*PrimeStar HS DNA Polymerase*”, Takara). Siguiendo el protocolo se preparó una “*mastermix*” en el que constan los siguientes compuestos para una sola reacción de PCR: 10  $\mu\text{L}$  5X *PrimeStar Buffer* ( $\text{Mg}^{2+}$  plus), 4  $\mu\text{L}$  solución dNTP y 3  $\mu\text{L}$  de cada solución de oligonucleótido en una concentración inicial de 5  $\mu\text{M}$ . En cada tubo para PCR se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución “*mastermix*” con 1  $\mu\text{L}$  del DNA genómico (concentración < 200 ng/ $\mu\text{L}$ ), o del plásmido que contenga el fragmento que se desea amplificar, y se añadieron 27,5  $\mu\text{L}$  de agua miliQ hasta un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Finalmente se añadieron 0,25  $\mu\text{L}$  de la polimerasa “*PrimeStar*” (2,5 U/ $\mu\text{L}$ ). Los pasos seguidos en el protocolo de PCR se indican en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Protocolo de PCR “Takara PrimeStar” estándar.

Paso	Condiciones	Ciclos
Preincubación	98°C 2 min	1
Desnaturalización	98°C 10 s	30-35 ciclos
Alineamiento	55°C 5 s	
Elongación	72°C 1min/kb	
Elongación final	72°C 7 min	1
Conservación	4°C	-

En el diseño de los diferentes casetes se recurrió bien al reemplazamiento génico o bien a la inserción de estos en una región específica. La técnica de reemplazamiento se realizó con el objetivo de obtener mutantes en los que el gen diana se sustituye por un marcador de selección que le permite complementar una auxotrofia en la cepa receptora en una transformación. Para ellos se diseñaron oligonucleótidos en la región promotora y terminadora del gen diana para obtener fragmentos de ~1,5 kb. Estos oligonucleótidos se indican en el listado de la tabla 4 como PP1-PP2 (región promotora, 5'UTR) o GSP3-GSP4 (región terminadora, 3'UTR). Por otro lado, se amplificó el fragmento del marcador de selección elegido usando plásmidos de la colección del laboratorio. Los oligonucleótidos diseñados se indican en la tabla 4 como SMP1 y GFP2 y contienen una parte de secuencia fija del marcador de selección y la secuencia complementaria de los oligonucleótidos PP2 y GSP3. El diseño de estos oligonucleótidos y el ajuste de las condiciones de PCR a cada caso se realizó usando el programa Vector NTI suite 8 (InforMax). Los fragmentos obtenidos se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% aplicando 90 V durante 30 minutos en solución tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Sambrook & Green, 2012). En cada pocillo se cargaron entre 3-5  $\mu\text{L}$  de producto de PCR, 1  $\mu\text{L}$  tampón de carga y 4-6  $\mu\text{L}$  de TAE. Para la visualización de los productos de PCR el gel pasó por una incubación de 15-20 minutos en Bromuro de etidio (BrEt) y el revelado se llevó a cabo en el sistema GelDoc2000. Los fragmentos se purificaron con

los materiales del kit “*Gel and PCR Clean-up*” (Nucleospin, Macherey-Nagel) y siguiendo el protocolo, bien directamente a partir del producto de PCR o bien recortando las bandas correspondientes a los fragmentos esperados tras una electroforesis en la que se cargó el volumen íntegro de cada reacción de PCR. Una vez que se obtuvieron y purificaron los tres fragmentos correctamente, se procedió a realizar una PCR de fusión usando el doble de fragmento del marcador de selección que de las regiones promotora y terminadora. Los oligonucleótidos empleados fueron PP1 (región promotora) y GSP4 (región terminadora). El producto de PCR resultante se verificó en mediante electroforesis y posteriormente se purificó para el procedimiento de transformación.

El etiquetado de proteínas para su visualización en microscopía de fluorescencia o por inmunodetección se realizó amplificando la región 3' terminal del gen diana empleando los oligonucleótidos GSP1 y GSP2, y su región terminadora (oligonucleótidos GSP3 y GSP4). Para la amplificación del fragmento del plásmido se recurrió a los oligonucleótidos GFP1 y GFP2, que incluyen, además de la secuencia que codifica para la etiqueta (*ha3x*, *myc3x* o *gfp*), el fragmento del marcador de selección. Los protocolos de PCR, electroforesis y purificación de fragmentos se llevaron a cabo de manera similar a la indicada previamente.

## 7. Protocolo de PCR cuantitativa, qPCR

En todos los procesos de extracción de RNA, la concentración, el nivel de pureza y degradación de RNA se analizaron en el Nanodrop 2000 (ThermoFischer). Todas las muestras presentaban un valor de absorbancia relativo  $A_{260/280}$  mayor a 1,85. Complementariamente, se recogieron 2  $\mu\text{g}$  de RNA para valorar cualitativamente la integridad de las muestras mediante una electroforesis de agarosa al 1,2%.

Previamente a la obtención de la primera hebra de cDNA se degradaron los restos de DNA siguiendo el protocolo “*Deoxyribonuclease I Amplification Grade*” (Invitrogen). Usando 2  $\mu\text{g}$  de las muestras de RNA tratado se procedió a la obtención de la primera hebra de cDNA siguiendo el protocolo “*Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR*” (Invitrogen). El RNA se incubó con 1  $\mu\text{L}$  de dNTPmix 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  de cebador oligo(dT)<sub>12-18</sub> y 3  $\mu\text{L}$  de agua miliQ a 65°C durante 5 minutos. Después la muestra se enfrió en hielo 5 minutos. Al volumen resultante se añadieron 9  $\mu\text{L}$  de solución “*2X Reaction mix*”, que consta de 2  $\mu\text{L}$  10x *RT Buffer*, 4  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  0,1 M DTT y 1  $\mu\text{L}$  RNAsa OUT (40 U/  $\mu\text{L}$ ) por cada reacción de síntesis de cDNA. Las muestras se incubaron a 42°C 2 minutos y posteriormente se añadió 1  $\mu\text{L}$  de la enzima “*Superscript*

// RT" (50 U/ $\mu$ L) para una primera incubación a 42°C de 50 minutos y una segunda incubación a 70°C durante 15 minutos antes de enfriarlas en hielo. Las muestras se trataron después con 1  $\mu$ L de RNAsa H (2 U/ $\mu$ L) a 37°C durante 20 minutos. Las concentraciones de cDNA resultante, así como su calidad, se midieron de nuevo usando un Nanodrop 2000.

Para la preparación de las reacciones de qPCR se preparó un stock de las muestras de cDNA a una concentración de 20 ng/ $\mu$ L, utilizando el volumen necesario para una concentración final en cada pocillo de la placa de qPCR de 5 ng/ $\mu$ L. Los oligonucleótidos diseñados para los análisis de qPCR amplificaban para fragmentos de aproximadamente 250 pb en regiones más próximas a la región 3'-terminal del gen diana y se mezclaron en una solución stock con una concentración final de 3  $\mu$ M. Para cada cepa o condición y gen a analizar, se preparó una solución "mastermix" mezclando 20  $\mu$ L de la solución stock de cDNA y 20  $\mu$ L de la solución stock de oligonucleótidos. En una placa de qPCR de 96 pocillos (Roche), en cada pocillo se mezclaron 10  $\mu$ L del "mastermix" con 10  $\mu$ L del fluoróforo SYBR-Green I (Roche), llegando a un volumen final de 20  $\mu$ L. La PCR cuantitativa se llevó a cabo en un termociclador Lightcycler 96 (Roche) proporcionado por el servicio de Genómica y proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIBMS-CSIC) siguiendo el protocolo indicado en la tabla 6. Los datos de expresión relativa fueron procesados en Excel a partir de aquellos proporcionados por la aplicación LightCycler96 versión 1.1.

**Tabla 6.** Protocolo adaptado de qPCR en LightCycler (Roche).

Paso	Condiciones	Ciclos
Preincubación	95°C 300 s	1 ciclo
Amplificación	95°C 10 s	40 ciclos
	65°C 30 s	
"Melting"	95°C 10 s	1 ciclo
	65°C 60 s	
	97°C 1 s	

## 8. Transformación de *Aspergillus nidulans*

El protocolo de transformación estandarizado en el laboratorio (Mellado, 2014) requiere de unas condiciones de cultivo y materiales específicas. El cultivo de la cepa receptora se preparó en un matraz de 1 L con 200 mL de medio mínimo (MMA) suplementado con las fuentes de carbono y nitrógeno habituales y el resto de los suplementos específicos de la cepa receptora. En el matraz se inocularon 10 mL de solución de conidioesporas en Tween 80 al 0,1%. El cultivo se incubó a 30°C con una agitación orbital de 250 rpm durante 15 horas y posteriormente se recogió usando el filtro Miracloth. En un tubo de

50 mL se mezclaron agitando vigorosamente 1 g de micelio húmedo y se enrasó hasta un volumen de 20 mL con solución tampón de protoplastos (1,2 M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 7,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,8 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). La muestra se incubó en hielo 5 minutos y después se mezcló por inversión con enzima Vinoflow FCE (Novozymes) (200 mg/g micelio), para degradar la pared celular y obtener los protoplastos. La mezcla se dejó reposar de nuevo en hielo 5 minutos tras los cuales el volumen fue transferido a un matraz de 100 mL para su incubación en un baño a 30°C en agitación suave durante 1-2 h. Una vez alcanzada la densidad de protoplastos necesarios, los 20 mL se repartieron equitativamente en dos tubos de 50 mL. En ambos tubos se añadieron 10 mL de solución colchón (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,6M Sorbitol) fresca, evitando mezclar las fases, y ambos tubos se centrifugaron a 4400 xg a 4°C durante 10 minutos. La fase intermedia generada donde se encuentran los protoplastos se recogió con una pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo nuevo donde se añadió el doble de volumen de solución ST (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 M Sorbitol) del volumen obtenido. La solución de protoplastos se mezcló por inversión con la solución ST y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El pellet obtenido fue resuspendido en 1 mL de solución ST y transferido a un tubo de 1,5 mL, el cual se centrifugó a 5000 xg a RT durante 3 minutos desechando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 1 mL de solución ST. Este proceso se repitió dos veces más. Tras el tercer paso de centrifugación, el pellet se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de solución STC (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 M Sorbitol, 0,12 M  $\text{CaCl}_2$ ) por cada transformación a realizar. Para el procedimiento de transformación se prepararon dos tubos de 50 mL, uno para la regeneración de protoplastos sin el fragmento a transformar (controles) y otro en el que se incluye el fragmento. En el tubo control sin fragmento (-DNA) se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de solución PEG (PEG6000 0,6% (p/v); 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,12 M  $\text{CaCl}_2$ ), 50  $\mu\text{L}$  de solución STC y 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión de protoplastos, mientras que en el tubo de transformación se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de solución PEG, 40-45  $\mu\text{L}$  de solución STC, 5-10  $\mu\text{L}$  la dilución del fragmento que se desee insertar en la cepa receptora y 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión de protoplastos. Ambos tubos se mezclaron suavemente y se incubaron 20 minutos en hielo. Tras este tiempo se añadió 1 mL de solución PEG en ambos tubos seguido de una incubación a RT durante 5 minutos. Finalmente se añadió el volumen necesario de solución STC hasta los 5 mL y un volumen hasta los 20 mL de MMR-TOP que se mezcló brevemente por inversión y se repartió entre cuatro placas de MMR suplementadas con las fuentes de carbono y nitrógeno habituales, y en cada caso con los suplementos necesarios para la condición de selección o la condición control. El volumen del tubo control sin la construcción se repartirá en dos placas de MMR selectivo (control negativo) y en dos placas de MMR

con todos los requerimientos de la cepa receptora (control positivo). Las placas se incubaron a 37°C al menos 72 horas.

Una vez crecidas las colonias susceptibles de ser transformantes, ya que complementan correctamente la auxotrofia seleccionada, se purificaron en una o varias placas de medio selectivo, pero usando MMA. Para la purificación se recogieron conidiosporas superficiales de la colonia con un palillo estéril y se extendieron en líneas en las placas de Petri en forma de rueda de carro. A partir de las colonias purificadas tras la incubación, las cepas transformantes se replicaron para la obtención de biomasa suficiente para la verificación de la transformación mediante técnicas de extracción de gDNA y PCR, inmunodetección, ensayos fenotípicos o microscopía.

## 9. Cruces de cepas y selección de progenie

Para la obtención de nuevas cepas mutantes se ha recurrido bien a la transformación, donde una construcción génica de interés se inserta en una cepa receptora (apartado 8), o bien al cruce sexual de dos cepas parentales. El protocolo de la inducción del cruce sexual en *A. nidulans* está estandarizado y se basa en el protocolo descrito en Pontecorvo (Pontecorvo et al., 1953) y se ha descrito en otros trabajos (Mellado, 2014).

En una placa de Petri con medio de cultivo (MMA o MCA con los requerimientos necesarios), y usando palillos estériles, se inocularon las dos cepas próximas entre sí. Tras una incubación a 37°C durante 48-72 h se recortaron las zonas de contacto entre las colonias de dichas cepas parentales, y se transfirieron a placas de Petri (5,5 cm de diámetro) que contenían aproximadamente 20 mL de MMA selectivo (ver apartado 1) que permita el desarrollo de progenie recombinante según el marcador molecular de selección elegido. Estas placas se incubaron boca arriba a 37°C durante 72 h y posteriormente se cerraron con cinta adhesiva y se incuban boca abajo durante 15-20 días a 37°C. La presión selectiva por el medio de cultivo usado y la restricción de disponibilidad de oxígeno favorece la inducción *in vitro* del ciclo sexual de *A. nidulans*. Transcurrido este tiempo, se recogieron los cleistotecios, las estructuras reproductivas resultantes del cruce y que contienen las ascas en las que se encuentran las ascosporas. Los cleistotecios de mayor tamaño y con una morfología más esférica son aquellos con más probabilidad de contener esporas de individuos recombinantes, por lo que cinco de los que cumplían dichos requisitos se limpiaron y disgregaron individualmente en un tubo de 1,5 mL con 1 mL de agua estéril. Estas soluciones de ascosporas se estriaron en una placa de MMA o MCA con los suplementos necesarios

y tras la incubación se escogió el cleistotecio que mostraba fenómenos de recombinación dado que se apreciaban fenotipos propios de la progenie. En 4 nuevas placas de Petri con MMA suplementado se inocularon ascosporas de una dilución 1:5 usando el asa de Drigalsky. A partir de las colonias crecidas a 37°C durante 48 h, se seleccionaron aleatoriamente 48 colonias para inocularlas repartidas en dos placas de Petri conteniendo MCA con todos los requerimientos iniciales ya que se inocularon también las cepas parentales. Una vez que estas colonias muestran conidiación en dichas placas (placas maestras), las colonias se replicaron en placas con diferentes medios de selección por marcadores moleculares o en condiciones de estrés ambiental. Las cepas susceptibles de ser recombinantes que porten el o los genes de interés se verificaron bien por genotipado o bien usando otras técnicas como el “*Western Blot*” o la microscopía.

## 10. Obtención de extractos totales de proteína y Western Blot

Al igual que en la extracción de gDNA, parte del micelio liofilizado y pulverizado se empleó para la extracción de proteína total (apartado 1 de la sección Materiales y Métodos). En este procedimiento se recogieron aproximadamente 6 mg y se mezclaron con 1 mL de solución tampón de lisis alcalina compuesta por 0,2 M NaOH y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%. Posteriormente se precipitaron las proteínas usando ácido tricloroacético (TCA) con una concentración final de 7,5% e incubando la muestra o muestras en hielo durante al menos 10 minutos. Las proteínas precipitadas se separaron del resto de componente celulares mediante la centrifugación a 18400 xg a 4°C durante 5 minutos y desechando el sobrenadante después. El pellet se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución 1 M Trizma y de 200  $\mu$ L de tampón de ruptura de Laemmli (SDS 0,2% (v/v); 6 M urea; 2-mercaptoetanol 5% (v/v); azul de bromofenol). Los extractos de proteína se calentaron a 90°C durante 2 minutos y posteriormente se centrifugaron a 16100 xg a RT durante 1-2 min antes de cargarlos en un gel de poliacrilamida. Una vez usados se pueden conservar a -20°C.

Normalmente los extractos de proteína total se separaron mediante electroforesis en genes de SDS y poliacrilamida del 10% (SDS-PAGE 10%) en cubetas miniprotean 3 (BioRad). En cada pocillo se cargaron 5  $\mu$ L del extracto de proteína total diluido con 5  $\mu$ L de tampón de ruptura. Los geles se realizaron por duplicado para realizar una tinción con azul de Coomassie en uno y realizar la electrotransferencia e inmunodetección o en el otro. La tinción con azul de Coomassie se realizó incubando el gel con la solución

“*Biosafe coomassie staining*” (BioRad) a RT en agitación durante 1 hora y realizando varios aclarados con agua destilada antes de secarlos. El otro gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  (BioRad) usando el programa estandarizado “*High MW*” en el sistema TransBlot turbo (BioRad).

Una vez completada la electrotransferencia, la membrana se lavó con solución tampón de sales de fosfato (PBS 1x) (Sambrook & Green, 2012) (Solución PBS 10x: 87,6 g/L NaCl; 28,4 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 5,5g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 6-8 perlas NaOH para ajustar el pH a 7,4) durante 10 min y posteriormente se incubó 1 hora a RT en agitación o durante la noche a 4°C con 5-10 mL de la solución de bloqueo (PBS 1x; leche 5% (p/v)). Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos a RT en agitación con 5-10 mL de PBS 1x y Tween 20 0,05% (PBS-TW). La incubación con el anticuerpo primario se preparó usando 5 mL una solución PBS-TW y leche 1% (p/v) con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso y a la concentración indicada en la Tabla 7. La membrana se incubó 1 hora a RT en agitación o durante la noche a 4°C. Los restos de anticuerpo primario no unido se lavaron PBS-TW (3 lavados de 10 minutos) como se ha descrito anteriormente, y se preparó la solución de incubación con el anticuerpo secundario correspondiente y la concentración indicada en la Tabla 7. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 hora a RT en agitación y posteriormente la membrana se lavó con PBS-TW (2 lavados de 10 minutos) y con solución PBS1x (1 lavado de 10 minutos). La reacción de inmunodetección se llevó con los reactivos “*Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent*” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y la detección de esta reacción se llevó a cabo en el “*ChemIDoc Imaging System*” (BioRad). Las imágenes obtenidas fueron procesadas usando el programa ImageLab v.6.0 (BioRad) para la cuantificación de la señal relativa de proteína y los datos obtenidos fueron procesados en Excel2016 y CorelDraw X7 para su representación.

**Tabla 7.** Listado de anticuerpos utilizados en este trabajo.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-HA	1:1000	Anti-Rat	1:4000
Anti-myc	1:10000	Anti-mouse	1:5000
Anti-GFP	1:5000		
Anti-tubulina	1:5000		
Anti-actina	1:5000		
Anti-PSTAIR	1:5000		

En la detección de formas proteicas de tamaño similar a las proteínas de control de carga (Tubulina, actina y PSTAIR), tras una primera inmunodetección de la o las proteínas de interés se realizó una limpieza de la membrana siguiendo las indicaciones

del protocolo “*Mild stripping*” (“*Stripping for reprobing*”, Abcam). Tras este procedimiento se realizó de nuevo el protocolo de Western Blot para la inmunodetección de las proteínas de control de carga.

## 11. Microscopía de epifluorescencia

Para los ensayos de microscopía de fluorescencia se prepararon cultivos de MMA-P suplementado con las fuentes de carbono y nitrógeno habituales y otros suplementos como se describe en los apartados 1 y 2. Los ensayos de alcalinización ambiental específicos para microscopía también se describen en el apartado 2.

Para la visualización de las proteínas etiquetadas con las diferentes proteínas fluorescentes se usó un microscopio de epifluorescencia Leica DMI-6000b acoplado a una cámara ORCA-ER (Hamamatsu Photonics). Las imágenes tomadas fueron procesadas usando el software Metamorph (v.6.1) y el software de acceso libre ImageJ (v.1.53e). En función de las diferentes proteínas u orgánulos estudiados la toma y el procesamiento de imágenes fue diferente. En la detección de PacC700-GFP se empleó una exposición de 100-200 ms en un solo plano focal. Para la detección de Vps23-GFP se usó una exposición de 300-400 ms y se tomaron 47 imágenes (apilamiento o “*stack*”) a lo largo del eje Z, a partir de las cuales se realizó la proyección sumatoria (“*Sum projection*”), para poder discriminar los puntos estáticos de aquellos dinámicos correspondientes a los endosomas. En el resto de las proteínas etiquetadas mostradas en este trabajo (PalA-GFP, PacX-GFP, EnaA-GFP, EnaB-GFP, AN2477-GFP y AN7165-Cherry-red), así como el estudio del fenotipo vacuolar empleando tinción CMAC se tomaron diferentes apilamientos de imágenes en el eje Z y posteriormente se realizó la máxima proyección (“*Max projection*”) y detectar así la señal en cada punto de mejor enfoque para cada zona. Los tiempos de exposición usados variaron entre los 40 y los 400 ms.

La visualización del proceso de mitosis y la localización de PacX-GFP se realizó en un único plano focal tomando una imagen cada 30 segundos durante 30 minutos (“*Timelapse*”).

## 12. Herramientas bioinformáticas

### 12.1. Análisis de datos de secuenciación masiva de RNA

Tras la secuenciación masiva de RNA llevada a cabo en Stabvida (Caparica, Portugal) se retiraron los adaptadores (“*Trimming*”), y las secuencias se alinearon con el genoma de referencia como se indica en Picazo y colaboradores (Picazo et al., 2020), al igual que el cálculo de los valores TPM. Para la obtención de la representación del análisis de componentes principales y la obtención de los análisis de expresión diferencial en las comparaciones realizadas, se usó el paquete de R (v.3.3.3) “DEseq” estableciendo como valores de expresión diferencial aquellos cuyo  $\log_2$  fuese igual o mayor a 2 ( $\log_2 \geq 2$ ), o igual o menor a -2 ( $\log_2 \leq -2$ ). La representación de los genes diferencialmente expresados en cada comparación se realizó usando mapas de calor o “*heatmaps*” utilizando el servidor “*Heatmapper*” (<http://www.heatmapper.ca/expression/>) y seleccionando el parámetro “*Average Linkage*” como método de agrupamiento (“*Clustering method*”), y el parámetro de “*Pearson*” como método de medida de distancia (“*Distance measurement method*”). En los análisis de enriquecimiento de los dominios Interpro se recurrió al servidor shinyGo (v.o.60) (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go60/>) y la representación de los principales dominios Interpro obtenidos se representaron mediante el software Graphpad Prism 8 (v.8.0.2). Los diagramas de Venn obtenidos usando Bioenn (<https://www.bioenn.nl/>). En el enlace que se muestra a continuación se pueden visualizar los resultados de los valores TPM, los datos de expresión diferencial y la descripción de los dominios Interpro y los códigos Interpro asociados a cada gen: (<https://saco.csic.es/index.php/s/nSSHkP3d4Yio48m>).

### 12.2. Análisis estadísticos de los perfiles de expresión génica por qPCR

En el estudio de los perfiles de expresión génica, los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Graphpad Prism 8 (v.8.0.2). En primer lugar, se comprobó si los datos obtenidos se ajustaban a una distribución normal y si sus desviaciones estándar eran homocedásticas, usando los tests de Saphiro-Wilk y Borwn-Forsythe, respectivamente. Posteriormente se realizó un análisis de ANOVA para cada cepa y condición de estrés abiótico, además de comparaciones múltiples

de cada tiempo analizado en condiciones de estrés con la muestra control empleando el test de Dunnett.

### 12.3. Análisis *in silico* de proteínas

La búsqueda de secuencias aminoacídicas homólogas (BLASTP) se realizó usando la base de datos FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/app/workspace/blast/new>), y los dominios de las secuencias se visualizaron en las bases de datos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la herramienta de predicción y visualización de proteínas Protter (<https://wlab.ethz.ch/protter/#>). El árbol filogenético representado se obtuvo en el servidor “Clustal Omega” (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

El modelo de dominio de unión a DNA de dedos de zinc de tipo C2H2 del factor de transcripción PacC se obtuvo desde el servidor web de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q00202>) y fue adaptado para su presentación usando el programa PyMOL™ (Version 2.5.4).



# Resultados



## Capítulo 1. Respuesta al estrés del sistema Slt

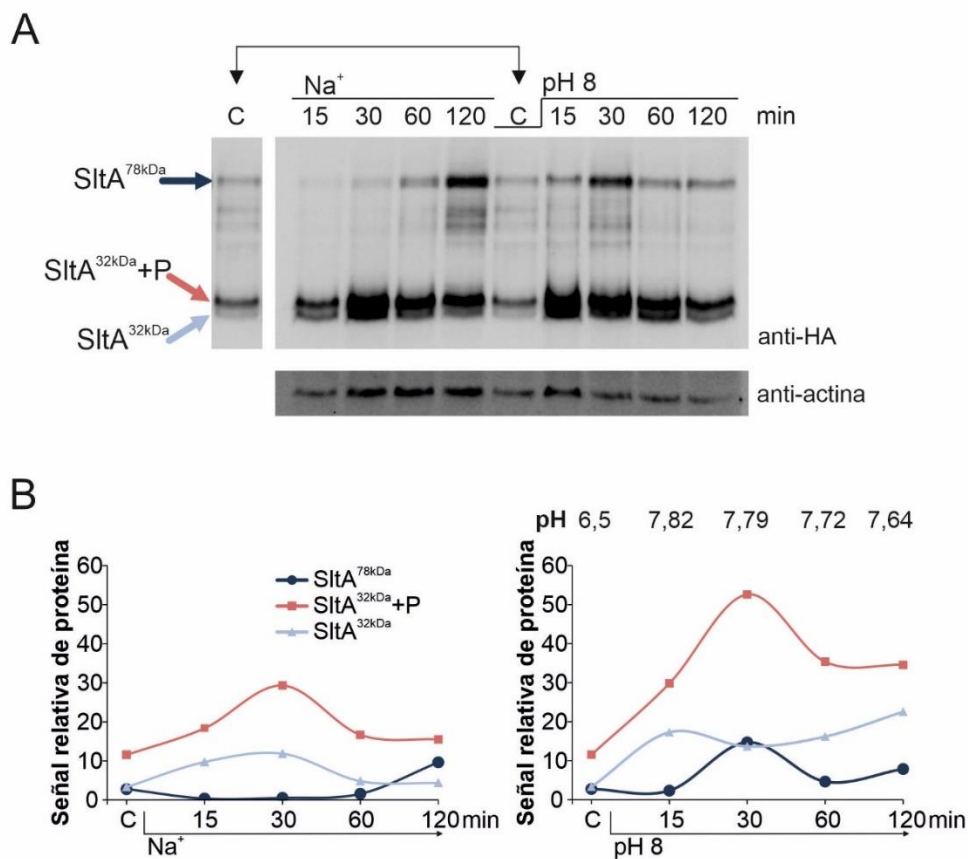
### 1.1. Efecto del estrés ambiental en la dinámica del procesamiento proteolítico de SltA

El procesamiento proteolítico de la forma primaria SltA<sup>78kDa</sup> a las formas de 32kDa fosforilada y sin fosforilar es aparentemente continuo e independiente de las condiciones ambientales (Mellado et al., 2016). Por ello es habitual observar en ensayos de inmunodetección que las tres formas de este factor transcripcional coexisten en la célula. En este capítulo estudiamos el proceso de regulación transcripcional del factor transcripcional *sltA*, su señalización y el patrón proteolítico en extractos de micelios sometidos a condiciones de estrés osmótico por alta concentración de catión de sodio y de estrés por alcalinidad ambiental.

Para este fin se ha utilizado la cepa MAD3652 que expresa una fusión de SltA a tres copias del epítipo hemaglutinina (HA3x) en el extremo carboxilo-terminal. En cada condición de estrés a ensayar se prepararon cinco matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de MMA (ver detalles en Materiales y Métodos, apartados 1 y 2) y se inocularon con conidiosporas. El micelio se creció en ausencia de estrés durante 16 h a 37°C con agitación orbital. Transcurrido este tiempo, el micelio de uno de los cultivos fue recogido y procesado como condición control sin estrés. A los restantes cuatro matraces se les añadió la condición de estrés. Por un lado, 1M Na<sup>+</sup> como su sal de cloruro (NaCl) y por el otro 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> que resulta en un pH extracelular de 8. Los cultivos se siguieron incubando a 37°C y a los intervalos de 15, 30, 60 y 120 minutos se recogió mediante filtración el micelio de cada una de las condiciones de estrés. Los micelios se liofilizaron para su posterior procesamiento.

Para el análisis de las formas SltA mediante ensayos de “Western Blot”, las muestras de micelio se procesaron para obtener extractos de proteína total utilizando el protocolo estandarizado en el laboratorio de “Extracción de proteína total por lisis alcalina” (ver apartado 10 de Materiales y Métodos). En la figura R.1.1.A se presenta un experimento tipo. Se observa la señal de cada una de las tres formas etiquetadas de SltA: SltA<sup>78kDa</sup>, SltA<sup>32kDa+P</sup> y SltA<sup>32kDa</sup>. El panel R.1.1.B muestra la cuantificación de la intensidad relativa de cada banda detectada con respecto a la correspondiente señal de la proteína de referencia  $\gamma$ -actina (Figura R.1.1.A, imagen inferior). La forma primaria SltA<sup>78kDa</sup> y las formas procesadas SltA<sup>32kDa+P</sup> y SltA<sup>32kDa</sup> se detectaron en todas las condiciones ensayadas, aunque tanto en condiciones de alta concentración de sodio como de alcalinidad se observaron variaciones de su señal a lo largo de los tiempos analizados.

En la condición control sin estrés ambiental (Control, C) se detectó una mayor señal de la forma procesada y fosforilada respecto a las otras dos formas, las cuales presentaban señales muy similares. Tras aumentar la concentración de cationes de sodio en el medio (Figuras R.1.1.A y B, izquierda), la forma primaria se detectó en menor medida en los primeros 30 minutos y recupera e incluso aumenta su señal tras 120 minutos de inducción. Por otro lado, la forma  $\text{SItA}^{32\text{kDa}+\text{P}}$  fue la forma predominante en todas las condiciones con un pico de señal a los 30 minutos tras la adición de sodio y un progresivo retorno a niveles iniciales tras 120 minutos de incubación. Por último, la forma procesada y desfosforilada  $\text{SItA}^{32\text{kDa}}$ , presentaba un perfil de señal similar a la forma fosforilada, pero en proporción menor a todos los tiempos ensayados.



**Figura R.1.1.** Señalización y procesamiento de SItA en condiciones de estrés por alta concentración de catión sodio ( $\text{Na}^+$ ) y pH alcalino (pH 8). **A)** Inmunodetección de las formas  $\text{SItA}^{78\text{kDa}}$ ,  $\text{SItA}^{32\text{kDa}+\text{P}}$  y  $\text{SItA}^{32\text{kDa}}$  fusionadas a tres copias del epítipo de hemaglutinina (anti-HA) (MAD3652) en extractos de proteína total de cultivos crecidos en medio mínimo (MMA) en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con  $\text{Na}^+$  (1 M NaCl) o pH 8 (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) durante 15, 30, 60 y 120 minutos. **B)** Cuantificación de señal de proteína relativa de formas SItA con respecto a la señal del control de carga de proteína,  $\gamma$ -actina (anti-actina).

En condiciones de alcalinidad (Figuras R.1.1.A y B, derecha), la forma procesada se mantuvo como la forma mayoritaria, al igual que lo observado en la condición de estrés salino. Sin embargo, la variación de señal de las otras formas presentó diferencias entre

ambas condiciones de estrés. En primer lugar, la forma primaria SlmA<sup>78kDa</sup> se pudo observar con claridad a lo largo de los tiempos analizados y además aumentó su señal hasta casi 7 veces tras 30 minutos a pH 8 con respecto a la cantidad observada en la condición control. En segundo lugar, los niveles de las formas procesadas aumentaron en mayor medida a pH 8 que en la condición de estrés por sodio. La forma fosforilada SlmA<sup>32kDa+P</sup> se mantuvo como la forma predominante y sus niveles aumentaron hasta una acumulación máxima a los 30 minutos de la alcalinización del medio, tras lo cual descendió, pero sin recuperar los niveles de proteína previos a la condición de estrés. La forma desfosforilada SlmA<sup>32kDa</sup> aumentó su señal a los 15 minutos y tras una leve fluctuación (Figura R.1.1.B, Gráfico derecha), dicha señal siguió subiendo tras 60 y 120 minutos en condiciones de alcalinidad ambiental.

Los resultados observados con estrés catiónico a los 15 y 30 minutos fueron semejantes a los obtenidos previamente por Mellado y colaboradores (Mellado et al., 2016), verificando así la reproducibilidad de este tipo de experimentos. Estos resultados sugieren que el patrón proteolítico de SlmA podría variar en función de la condición de estrés ambiental inducida.

## 1.2. Perfil de expresión de los genes *sltA* y *sltB* en condiciones de estrés abiótico

Los cambios en el patrón proteolítico de SlmA en las dos condiciones de estrés estudiadas podrían estar reflejando variaciones en los niveles de expresión del propio gen *sltA* o *sltB*. Para determinar los niveles de expresión de *sltA* y *sltB* en función del estrés salino y la alcalinización del pH ambiental, se procedió a un análisis mediante PCR cuantitativa.

El estudio de los niveles de expresión de ambos genes utilizando la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) pretende mejorar la calidad y reproducibilidad de los resultados previos obtenidos mediante “Northern Blot”, e incrementar el número de ensayos en condiciones de estrés por alta concentración de diferentes cationes o de estrés por alcalinidad extracelular.

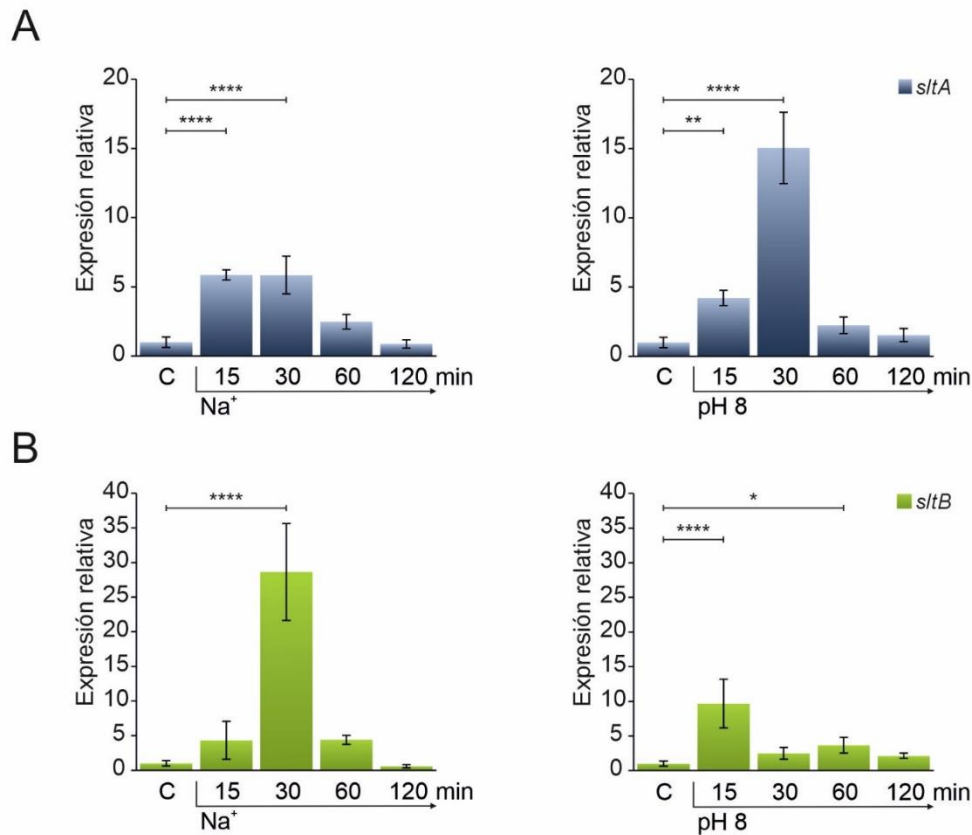
Así, se realizó un ensayo de estrés ambiental (ver Materiales y Métodos, apartado 2) en una cepa silvestre. Tras la incubación del micelio en condiciones sin y con estrés abiótico, cada muestra de micelio filtrado se congeló a -80°C para la extracción de RNA total usando el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos (ver apartado 5). Una vez verificada la calidad del RNA total obtenido, se procedió a generar la hebra

de DNA codificante (cDNA, ver apartado 6 de Materiales y Métodos) que se usó como molde en la PCR cuantitativa. Cada gen objetivo fue analizado mediante qPCR diseñando cebadores específicos para amplificar fragmentos (amplicones), próximos al codón stop, con un tamaño de entre 230-280 pb. En todos los análisis de expresión realizados por qPCR en este trabajo se ha utilizado como referencia el nivel de expresión del gen *benA* (*AN1182*) que codifica para  $\beta$ -tubulina lo que permitió obtener los valores de expresión relativos de cada gen objetivo. En la figura R.1.2., se muestran los perfiles de expresión de los genes *sltA* (Figura R.1.2.A) y *sltB* (Figura R.1.2.B) en presencia de 1 M NaCl ( $\text{Na}^+$ ) y de 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) en la cepa silvestre MAD3652. En condiciones de estrés salino la expresión de *sltA* aumentó ligeramente durante los primeros 30 minutos a partir de los cuales descendió hasta valores próximos a los observados inicialmente tras 120 minutos. El efecto de la alcalinidad generó una respuesta con una tendencia similar a lo largo de los tiempos analizados y tanto a los 15 minutos como a los 30 minutos las diferencias de expresión fueron significativas respecto a la condición control. Sin embargo, a pH 8 el aumento de expresión a los 15 minutos fue menor que el pico detectado a los 30 minutos, donde la expresión fue hasta 15 veces más alta con respecto a lo observado en ausencia de estrés. A lo largo del tiempo analizado los niveles de expresión descendieron aproximándose a los previos a la señal de alcalinización.

En el perfil de expresión del gen *sltB* (Figura R.1.2.B), también se detectaron cambios en la expresión en ambas condiciones de estrés. La adición de 1M catión sodio al medio provocó un incremento altamente significativo de los niveles de *sltB* tras 30 minutos respecto a lo observado en la condición control. Tras 60 minutos en estrés por alta concentración de catión sodio, la expresión disminuyó a niveles similares a los observados a los 15 minutos y este descenso continuó hasta los 120 minutos donde la expresión de *sltB* fue menor que en la condición control. La alcalinización del medio de cultivo causó un aumento significativo de los niveles de expresión de *sltB* tras 15 minutos del incremento de pH. A partir de los 30 minutos en alcalinidad, la expresión de *sltB* descendió, pero sin alcanzar los niveles de expresión observados en ausencia de estrés.

Estos resultados sugieren que los elementos que componen el sistema Slt presentan una respuesta diferente en función del estrés abiótico inducido *in vitro*, tanto a nivel de transcripción como de proteína SltA, cuyas formas proteicas mantienen un equilibrio en ausencia de estrés ambiental que se ve alterado de manera diferente en cada condición de estrés (Figura R.1.1). Además, esta respuesta era fácilmente detectable en los 30 primeros minutos de inducción de estrés en el medio extracelular (Figura R.1.2), mientras que transcurridos 60 minutos se alcanzaba una aparente estabilidad tanto a

pH alcalino como en 1M NaCl (Figura R.1.1.B y Figura R.1.2). Este tiempo experimental de 60 minutos nos permitiría comparar los efectos cada tipo de estrés abiótico en estudios del transcriptoma de *A. nidulans*.



**Figura R.1.2.** Perfil de expresión transcripcional de *sltA* y *sltB* en respuesta a estrés por alta concentración de catión sodio y pH alcalino ambiental. Análisis de extractos de cDNA de una cepa silvestre (MAD3652) mediante PCR cuantitativa (qPCR) de los genes *sltA* (A) y *sltB* (B) en condición sin estrés ambiental (C), y en condiciones de estrés por 1 M NaCl (Na<sup>+</sup>) y por alcalinización del medio de cultivo (pH 8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Los niveles de expresión relativa se obtuvieron usando los niveles de expresión del gen de referencia que codifica para la  $\beta$ -tubulina (*AN1182/benA*). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas experimentales para cada muestra. Los asteriscos representan el nivel de significación del valor-P: P  $\leq$  0,05 (\*); P  $\leq$  0,01 (\*\*); P  $\leq$  0,001 (\*\*\*) ; P  $\leq$  0,0001 (\*\*\*\*).



## Capítulo 2. Patrón de la expresión génica en respuesta a la alcalinización del medio y la salinidad; el papel regulador de SltA.

### 2.1. Estrategia y evaluación de los datos del análisis transcriptómico

Los factores transcripcionales englobados en la familia de proteínas que portan un dominio de unión a DNA formado por dedos de zinc “clásicos”, del tipo  $C_2H_2$ , llevan a cabo funciones reguladoras de alto rango y se han descrito en organismos eucariotas desde levaduras a humanos (Han et al., 2020; MacPherson et al., 2006). La presencia en SltA de tres dedos de zinc del tipo  $C_2H_2$  sugería que este factor transcripcional podría controlar los niveles de expresión de un amplio número de genes en *A. nidulans*. Los datos sobre el papel regulador de SltA obtenidos mediante “Northern blots” son reducidos y no permitían definir claramente si posee una actividad reguladora positiva o negativa. El análisis transcriptómico de dos cepas, una silvestre y un mutante *sltAΔ*, puede ayudar a identificar aquellos genes o agrupamientos de genes (“clusters”) que puedan estar bajo el control directo o indirecto de SltA y determinar así su rango de acción. Además, permitiría entender con mayor profundidad la respuesta a condiciones de estrés abiótico en *A. nidulans* y definir la existencia de patrones transcriptómicos específicos para cada tipo de estrés ambiental. La variabilidad de la distribución de las formas SltA descritas en el capítulo 1 apoya esta hipótesis de trabajo.

Para este análisis genómico hemos recurrido a la secuenciación masiva de RNA (RNAseq) usando dos cepas de *A. nidulans* protótrofas, la cepa silvestre MAD4096 y la mutante *sltAΔ* MAD4097 que han sido utilizadas anteriormente (Findon et al., 2010; Manoli & Espeso, 2019). Para ambas cepas se prepararon cuatro cultivos por cada condición: Control (MMA), y de estrés por alcalinidad (pH 8) o por 1M NaCl durante 60 minutos (ver apartados 1 y 2 de la sección Materiales y Métodos). La recolección y el tratamiento de las muestras para la extracción de RNA se detalla en los apartados 2 y 5 de Materiales y Métodos. Los extractos fueron enviados a un servicio externo de secuenciación masiva (Stabvida, Caparica, Portugal). En la figura R.2.1.A se muestra el diseño experimental y el flujo de trabajo donde a partir de los extractos de RNA se analizó la calidad del mismo (para todas las muestras el RIN fue >6,5) y posteriormente se generó la librería. El diseño utilizado para la secuenciación de RNA fue de tipo “pair-end” con fragmentos de 150 pb. En colaboración con el Dr. Aitor Garzia (Rockefeller University, NY, USA) se revisó la calidad de la secuencia (“FastQC”) y se retiraron los adaptadores (“Trimming”). Estas secuencias se alinearon frente al genoma de referencia de *Aspergillus nidulans* (versión FungiDB-36\_AnidulansFGSCA4). A partir del mapeo de

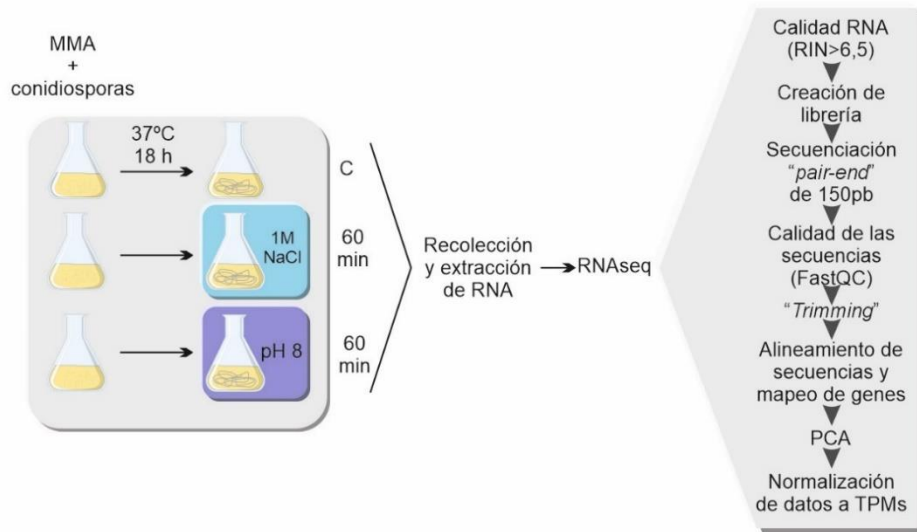
los genes se determinó el número de lecturas sobre cada gen (“*counts*”) y estos datos fueron normalizados a TPM (“*Transcript per million reads*” o transcrito por millón de lecturas) para análisis posteriores.

Los conjuntos de datos generados en las diferentes cepas y condiciones, así como sus réplicas, fueron evaluados usando un análisis de componentes principales (PCA, “*Principal component analysis*”) (Figura R.2.1.B). En este análisis se observó que el conjunto de datos totales absorbía el 83% de la varianza. Además, se detectaron agrupamientos de las réplicas evidenciando la reproducibilidad experimental. Los valores de correlación obtenidos entre las réplicas fueron de entre 0,94 y 0,97. Dado que estos valores son superiores a 0,9 consideramos que la calidad las muestras permitía continuar con el análisis de datos. Los valores del análisis del PCA mostraba que la variable de la cepa (Figura R.2.1.B, PC1) absorbía el 60% de la varianza, lo que sugería que el papel de SltA podría ser clave en cualquiera de las tres condiciones ambientales. En cuanto a la variable condición ambiental también se observaron diferencias en los niveles de expresión, siendo la alcalinización del medio extracelular la condición que mayor variación de la expresión causó al compararlo con la condición sin estrés (MMA), tanto en la cepa silvestre como nula *sltA*.

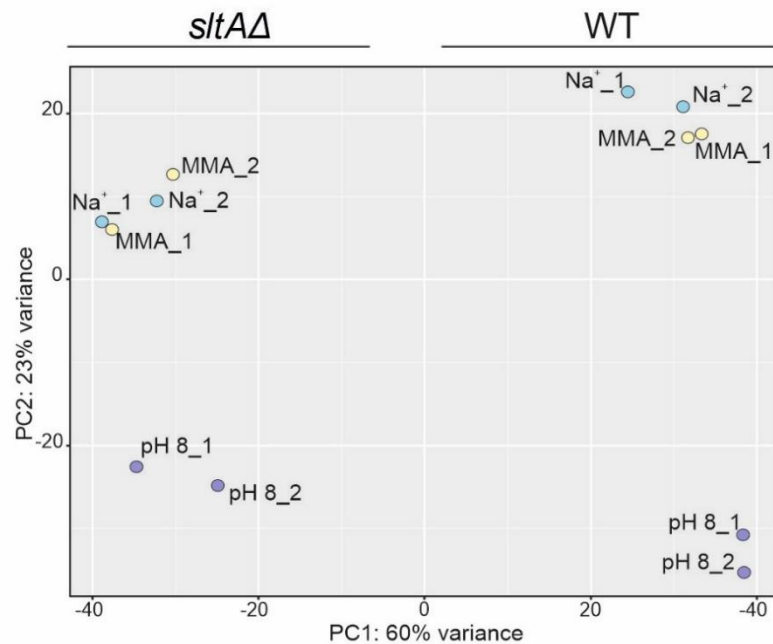
Para determinar tanto el efecto del estrés ambiental en *A. nidulans* como el papel del factor transcripcional SltA, se establecieron comparaciones entre cepas y condiciones para medir los cambios de expresión génica. Para ello se obtuvieron en primer lugar los valores promedio de TPM de cada muestra. Las comparaciones entre muestras se realizaron dos a dos mediante el logaritmo en base dos “*fold change*” ( $\log_2FC$ ) usando el paquete bioinformático “DEseq2” en R. Aquellos genes diferencialmente expresados (“*Differentially expressed genes*” o DEGs) en una comparación entre dos muestras con un valor de significación igual o mayor que 2 ( $\log_2FC \geq 2$ ) son aquellos en los que la expresión aumenta en una de las cepas o condición de estrés y en este trabajo se describirán, usando preferentemente la terminología inglesa, como “*upregulated genes*” o genes regulados al alza. Una disminución de la expresión de un gen en una de las cepas o condiciones de estrés será significativa si el valor  $\log_2FC$  es igual o menor a -2 ( $\log_2FC \leq -2$ ) y estos genes se definirán como “*downregulated genes*” o genes regulados a la baja.

Una vez determinados los genes diferencialmente expresados tanto positiva como negativamente en cada comparación, se describieron algunos de los “*clusters*” o grupos de genes detectados en cada caso. Los genes diferencialmente expresados (DEGs) en cada comparación se usaron en un análisis de enriquecimiento de dominios Interpro

A



B



**Figura R.2.1.** Secuenciación masiva de RNA (RNAseq). **A)** Esquema del flujo de trabajo desde la preparación de muestras de RNA en condiciones sin estrés (C, MMA) y en condiciones de estrés por el aumento de la concentración de cationes sodio (Na<sup>+</sup>) y del pH ambiental (pH 8), al procesamiento de datos experimentales para su análisis e interpretación. **B)** Análisis de componentes principales (PCA) de los patrones de transcripción de una cepa silvestre (WT) (MAD4096) y de una cepa *sltAΔ* (MAD4097) en ausencia de estrés ambiental (MMA, indicado en amarillo), y en condiciones de estrés ambiental por alta concentración de cationes de sodio (Na<sup>+</sup>, indicado en azul) o por alcalinidad ambiental (pH 8, indicado en violeta) y sus correspondientes réplicas indicadas con los números 1 y 2.

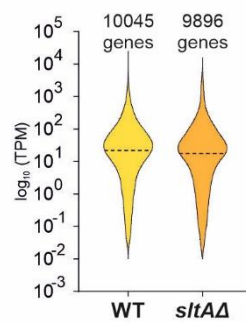
para detectar las familias proteicas predominantes en cada condición y cepa. Para este análisis se recurrió a la base de datos de *Emericella* (nombre del teleomorfo) *nidulans* de STRINGdb (v.10) a través de la herramienta bioinformática ShinyGO v.60 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go60/>). Este trabajo ha sido publicado y será citado en el texto (Picazo et al., 2020)

Todos los datos obtenidos de los ensayos de RNAseq así como el análisis de los mismos y la obtención de los valores TPM medios, los valores de expresión diferencial y los códigos y descripciones de los dominios Interpro de cada gen generan un documento excesivamente voluminoso para su impresión en papel, de modo que estos datos quedan reflejados y accesibles a través del siguiente enlace (<https://saco.csic.es/index.php/s/nSSHkP3d4Yio48m>) proporcionado también en el apartado 12.1 de la sección de Materiales y Métodos.

## 2.2. Papel transcripcional de SlfA en ausencia de estrés

El genoma de *A. nidulans* depositado en la versión 59 de la base de datos FungiDB contiene un total de 10.988 genes, incluyendo los genes codificados en el DNA mitocondrial. En este trabajo se utilizó la versión 36 del genoma (<https://fungidb.org/fungidb/app/downloads/release-36/AnidulansFGSCA4/>). El número total de genes usados en los análisis de expresión diferencial fue de 10550. En ausencia de estrés, 10045 y 9896 genes mostraron expresión (TPM>0) en las cepas silvestre y *sltAΔ*, respectivamente (Figura R.2.2.1). A pesar de observarse un menor número de genes en el fondo mutante *sltAΔ*, la distribución de niveles de expresión génica fue similar en ambas cepas con unos valores de expresión  $\log_{10}$  (TPM) de entre 10 y 100 en la mayoría de los genes.

El análisis de expresión diferencial comparando las “counts” de los genes expresados en la cepa silvestre frente al nulo *sltA* en ausencia de estrés dio lugar a la detección de 1108 DEGs en el fondo nulo *sltA*. La expresión de 347 genes aumentó en el mutante *sltAΔ* respecto a la cepa silvestre, mientras que 761 genes presentaron una disminución significativa de la expresión en este mutante. La desregulación total observada en el mutante *sltAΔ* representaba el 10% del transcriptoma, lo que sugería un papel regulador importante de SlfA independientemente de la condición ambiental.



**Figura R.2.2.1.** Gráficos de violín que muestran la distribución de los genes que se expresan (TPM>0) en ausencia de estrés en los fondos genéticos silvestre (WT) (MAD4096) y *sltAΔ* (MAD4097). Los niveles de expresión de estos genes se ilustran según su valor log<sub>10</sub> (TPM). Las líneas discontinuas indican el valor de la mediana.

En la figura R.2.2.2.A se representa la variación de la expresión génica tomando como datos las “counts” de cada gen significativamente desregulado al comparar las cepas silvestre y *sltAΔ* en ausencia de estrés ambiental (indicado en las figuras como MMA, puntas de flecha). Esta representación se define comúnmente como “heatmap” o mapa de calor y clasifica a los genes en “clusters” (<http://www.heatmapper.ca/expression/>). Al generar el “heatmap”, la herramienta bioinformática calcula el valor “Row Z-score”, que indica la significación de la variación de estos datos. Los “upregulated genes” se representan en verde mientras que los “downregulated genes” en el mutante se ilustran en morado.

Usando el “heatmap” obtenido se seleccionaron solo algunos de los múltiples “clusters” de genes para analizar los patrones de expresión. Los paneles B y C muestran aquellos genes cuya expresión se eleva en ausencia de función *SlmA*. El panel B muestra los genes diferencialmente “upregulated” en el fondo nulo *sltA* y que se encuentran con un nivel de expresión menor en todas las condiciones estudiadas en la cepa silvestre. En cambio, en el panel C se representan los niveles de expresión de algunos de los genes “upregulated” en todas las condiciones en la cepa *sltAΔ* y que solo aumentaban significativamente su expresión a pH alcalino en el fondo silvestre (WT).

Los “clusters” D-F se corresponden con genes cuya expresión ha descendido significativamente en ausencia de *sltA*. El panel D representa los “downregulated genes” en ausencia de *sltA* en todas las condiciones estudiadas en comparación con la cepa silvestre. El gráfico del “cluster” E muestra aquellos genes cuya expresión disminuye en ausencia de *SlmA* o en condiciones de estrés en el silvestre (WT). Los genes agrupados en el “cluster” F son aquellos “downregulated” tanto a pH 8 en la cepa silvestre como en cualquier condición del mutante *sltAΔ*, mientras que el panel G muestra aquellos genes

“*upregulated*” solo a pH 8 en el silvestre, pero que se mantenían “*downregulated*” en todas las condiciones analizadas en el fondo nulo *sltA*.

En el análisis de expresión diferencial se encontró a *sltB* dentro del “*cluster*” D siendo un “*dowregulated gene*” al comparar ambas cepas en todas las condiciones (Figura R.2.2.2.H). El gen *AN6132/sltB* codifica la proteasa procesativa de SltA y su expresión es totalmente dependiente de la función SltA (Mellado et al., 2015). Tomando los niveles de expresión de *sltB* como referencia, observamos que los genes del “*cluster*” D *AN6940*, *AN7165*, *AN6618* y *AN7792*, que codifican para diferentes tipos de proteínas como transportadores, lisofosfolipasas o proteínas con actividad GTPasa (GAP), podrían ser extremadamente dependientes de SltA dado que presentaban un patrón de expresión similar al de *sltB*.

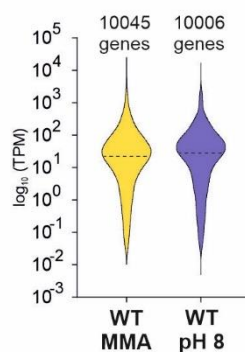
A continuación, se clasificaron las actividades de los genes diferencialmente expresados. Mediante un análisis de enriquecimiento de dominios Interpro de los genes DEGs en la cepa *sltAΔ* frente a la cepa silvestre crecidas en la condición control, obtuvimos preferentemente nueve tipos de dominios en las proteínas de los genes diferencialmente “*upregulated*” en el mutante nulo *sltA* y otros nueve tipos de dominios en aquellas codificadas por “*downregulated genes*”, además de un dominio común en ambos casos que se corresponde con el citocromo P450 (Figura R.2.2.2.I). De entre los dominios enriquecidos en el análisis destacaron un alto número de genes que codifican para proteínas ribosomales, transportadores de tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*), así como otros factores de transcripción tanto de tipo Zn2Cys6, específicos de hongos de la clase Ascomiceta, como de dedos de zinc clásicos de tipo C2H2 que tienen una distribución filogenética mucho más amplia.

Los resultados de esta comparación sugieren que la función de SltA tiene un efecto notable y dual. Siendo en su mayoría positivo ya que un mayor número de genes, 761 genes, disminuyen su expresión en ausencia de este factor transcripcional en condiciones ambientales estándar en comparación con los 347 que son expresados al alza. Una gran parte de los genes diferencialmente expresados codifican para un rango de proteínas que incluyen proteínas ribosomales, diferentes tipos de transportadores y factores de transcripción, otorgando a SltA un papel regulador más allá de la respuesta a eventos de estrés ambiental.



### 2.3. Efecto transcripcional de la alcalinización del medio extracelular

El resultado del análisis de componentes principales (PCA) reveló que la condición de alcalinidad generaba una respuesta transcripcional en ambas cepas claramente diferente con respecto a las condiciones de cultivo sin estrés y las suplementadas con altos niveles de sodio (ver Figura R.2.1.B). Al comparar los datos transcriptómicos de las condiciones control (MMA) y de pH 8 en la cepa silvestre (WT) se detectó la expresión de 10045 genes en ausencia de estrés y de 10006 genes a pH alcalino de los 10550 genes analizados (Figura R.2.3.1). En el análisis de expresión diferencial se obtuvieron un total de 1242 DEGs en respuesta a la alcalinidad extracelular de los cuales 380 estaban regulados al alza y 862 regulados a la baja. Estos resultados sugieren que la respuesta a la alcalinidad ambiental da lugar preferentemente a una bajada en la expresión génica.



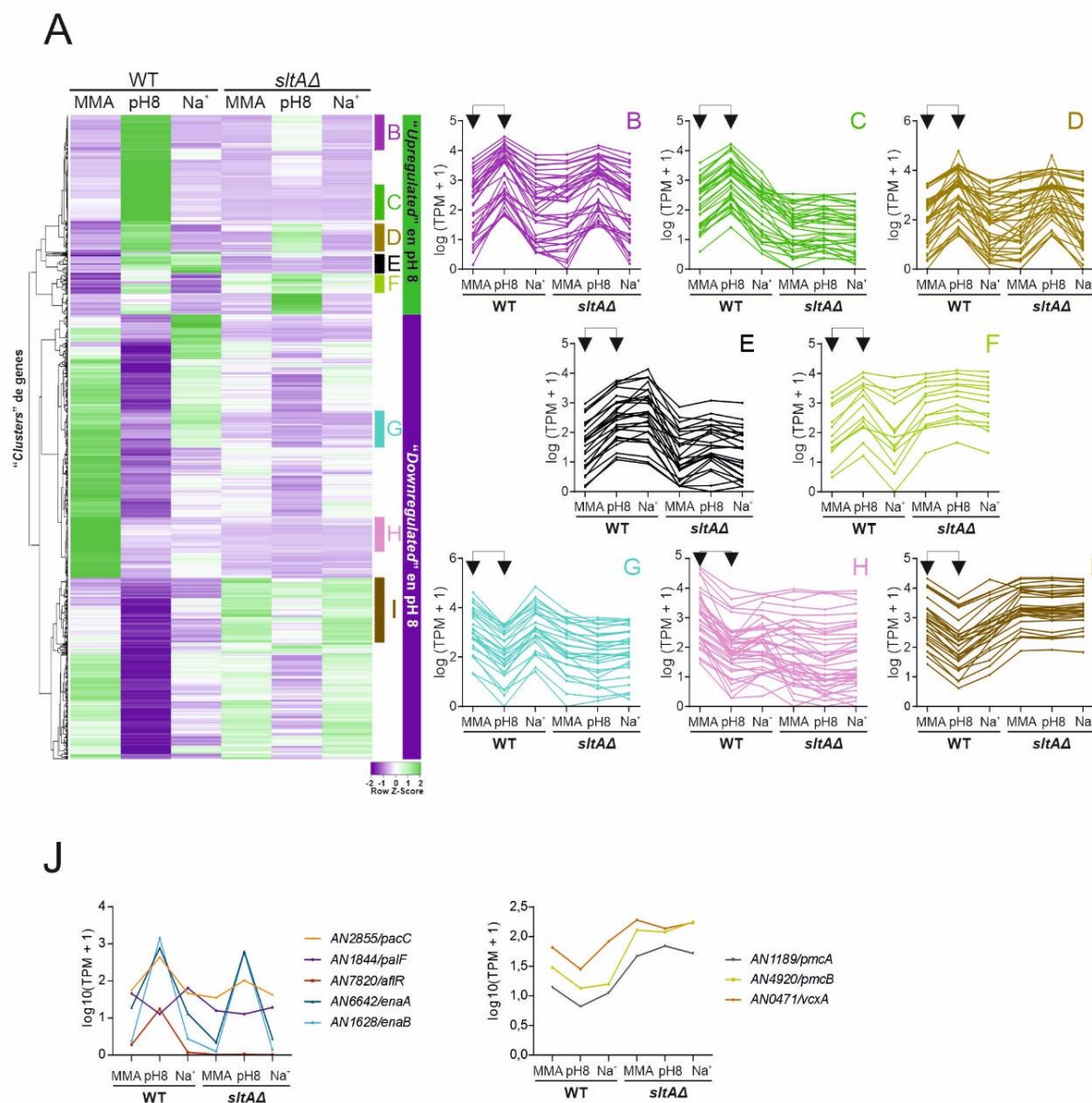
**Figura R.2.3.1.** Gráficos de violín que muestran la distribución de los genes que se expresan (TPM>0) en ausencia de estrés (MMA) y en estrés por alcalinidad ambiental (pH 8) en el fondo genético silvestre (WT) (MAD4096). Los niveles de expresión de estos genes se ilustran según su valor  $\log_{10}$  (TPM). Las líneas discontinuas indican el valor de la mediana.

A partir del “*heatmap*” obtenido en esta comparación (Figura R.2.3.2.A) se seleccionaron algunos “*clusters*” representativos para su análisis (Figura R.2.3.2.B-I). Los primeros cinco grupos de genes son aquellos “*upregulated*” a pH alcalino (pH8) en comparación con la condición control (MMA) en la cepa silvestre (Figura R.2.3.2. B-F, indicados con puntas de flecha) ilustrando el rango de genes que eran inducidos por la alcalinización del medio. Sin embargo, pudieron ser subclasificados teniendo en cuenta el resto de muestras experimentales. El panel B muestra algunos de los genes donde la respuesta transcripcional en la cepa WT se observó a pH 8 pero no en la condición de estrés por 1 M NaCl, sugiriendo que estos genes están expresados al alza por un efecto específico del estrés por alcalinización del medio. En el mismo panel, los resultados de la cepa *sltAΔ* mostraron un aumento no significativo a pH alcalino, lo que los convierte en genes parcialmente dependientes de SlfA durante la respuesta a la alcalinización extracelular.

El “*cluster*” C (Figura R.2.3.2.C) muestra aquellos genes cuya expresión aumentó a pH 8 en la cepa silvestre pero no en el fondo mutante *sltAΔ*, lo que los convierte en genes muy dependientes de la actividad SltA. En algunos casos se detectó que los niveles de expresión también se encontraban alterados en el resto de condiciones analizadas en la cepa mutante. Por el contrario, el “*cluster*” D muestra aparentemente una respuesta similar en ambas cepas en todas las condiciones, por lo que la expresión de estos genes en la respuesta a alcalinidad sería independiente de la función SltA. El “*cluster*” E muestra aquellos genes “*upregulated*” en la cepa silvestre en ambas condiciones de estrés ambiental, lo que sugiere que parte de la respuesta génica a los estreses abióticos es común. En algunos casos parte de esta respuesta se pierde en ausencia de SltA en las mismas condiciones de estrés (Figura R.2.3.2.E). El último “*cluster*” de “*upregulated genes*” (Figura R.2.3.2.F), muestra aquellos genes dependientes de la condición de pH ambiental y que se encuentran también “*upregulated*” en todas las condiciones observadas en la cepa mutante *sltAΔ*.

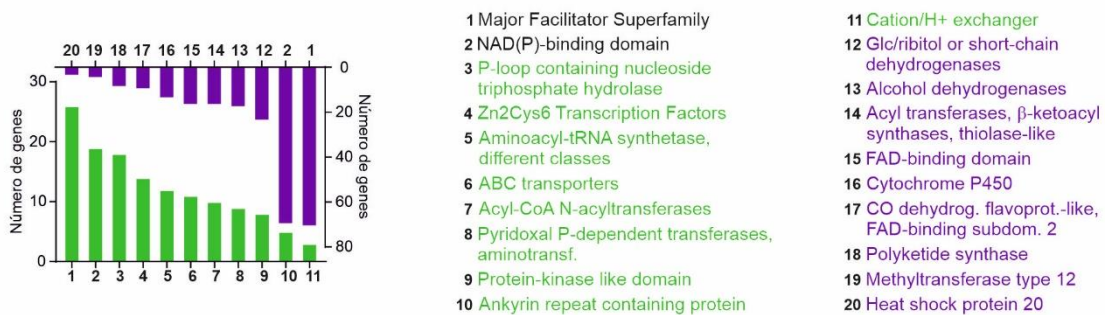
En cuanto a los “*downregulated genes*” en respuesta al pH alcalino, se han seleccionado tres “*clusters*” de genes. El “*cluster*” G representa los “*downregulated genes*” solo a pH 8 en el silvestre y en todas las condiciones estudiadas en el fondo mutante *sltAΔ*. Aquellos genes que presentaban una disminución de los niveles de expresión en ambas condiciones de estrés se encuentran en el “*cluster*” H y la ausencia de SltA mantuvo esta disminución de los niveles de expresión en todas las condiciones ambientales. Por último, el “*cluster*” I representa los niveles de expresión de algunos de los genes “*downregulated*” a pH 8, y que por el contrario se encuentran “*upregulated*” en el fondo nulo *sltA* en las tres condiciones ambientales estudiadas.

Existen algunos genes cuya expresión está regulada por la señal de alcalinidad (Markina-Iñarrairaegui et al., 2020; Peñalva et al., 2014) y a lo largo de este análisis se han usado como control del procedimiento experimental y de los resultados (Figura R.2.3.2.J). Así, hemos detectado entre los genes diferencialmente “*upregulated*” a pH alcalino a los factores transcripcionales *AN2855/pacC* y *AN7820/afIR* que se clasificarían dentro de los “*clusters*” B y C, respectivamente. Por el contrario, la expresión de los genes que codifican para los posibles transportadores de sodio, las ATPasas *AN6642/enaA* y *AN1628/enaB*, sería independiente de la función SltA (“*cluster*” D). Por otro lado, un ejemplo de gen cuya expresión disminuye a pH 8 es *AN1844/palF* (Bussink et al., 2015) y que se clasificaría en el “*cluster*” G al perder los niveles normales



**Figura R.2.3.2.** Genes diferencialmente expresados a pH 8 en la cepa silvestre (WT pH 8 vs WT MMA). **A)** “Heatmap” de genes cuyos niveles de expresión aumentan (“upregulated genes”, indicados en verde) o una disminuyen (“downregulated genes”, indicados en morado) tras la inducción de estrés por alcalinidad ambiental (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) durante 60 minutos. **B-I)** Análisis de “clusters” de genes . **B)** Genes “upregulated” a pH 8 y menor aumento de los niveles de expresión en el fondo *sltAΔ* a pH 8. **C)** Genes “upregulated” en WT a pH 8 y “downregulated” en todas las condiciones en el mutante *sltAΔ*. **D)** Genes “upregulated” a pH 8 tanto en la cepa silvestre como en el mutante *sltAΔ*. **E)** Genes “upregulated” en condiciones de estrés en la cepa WT y “downregulated” en todas las condiciones en la cepa *sltAΔ*. **F)** Genes “upregulated” a pH 8 en la cepa silvestre y “upregulated” en todas las condiciones en el fondo nulo *sltA*. **G)** Genes “downregulated” a pH 8 en la cepa silvestre y “downregulated” en todas las condiciones en el fondo nulo *sltA*. **H)** Genes “downregulated” en ambas condiciones de estrés en la cepa WT y “downregulated” en todas las condiciones en el fondo nulo *sltA*. **I)** Genes “downregulated” a pH 8 en la cepa silvestre y “upregulated” en todas las condiciones en el fondo nulo *sltA*. **J)** Genes con perfil de expresión dependientes del pH ambiental y/o dependientes de la función SltA.

de expresión en la condición control en ausencia de SltA. En el grupo de “*downregulated genes*” a pH 8 se han descrito previamente algunos genes sujetos a la función de SltA como son *AN1189/pmcA*, *AN4920/pmcB* y *AN0471/ vcxA* (Findon et al., 2010; Spielvogel et al., 2008), donde la delección de *sltA* dio lugar a un aumento de los niveles de expresión en las tres condiciones estudiadas (Figura R.2.3.2.J). Este patrón transcripcional se ha definido en el “*cluster*” I.



**Figura R.2.3.3.** Listado de los principales dominios Interpro detectados entre los genes diferencialmente expresados (DEGs) a pH 8 en la cepa silvestre (WT). En verde se identifican los dominios codificados por genes “*upregulated*”; en morado se corresponden con los genes “*downregulated*” y en negro son dominios que se encuentran tanto entre genes “*upregulated*” como “*downregulated*”.

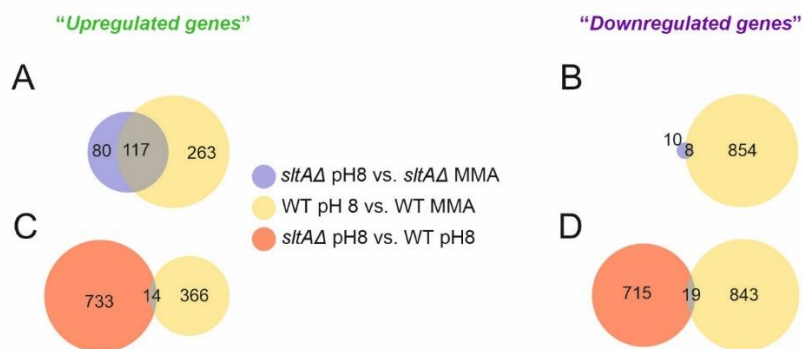
Posteriormente en el análisis de enriquecimiento de los dominios Interpro para las proteínas codificadas por los genes desregulados se detectaron que tanto los “*upregulated*”, como los “*downregulated genes*” a pH 8, son genes que codifican en su mayoría para proteínas transportadoras de la familia MFS y proteínas con dominios de unión a NAD(P) (Figura R.2.3.3). Además, otros transportadores de tipo ABC y transportadores de cationes/H<sup>+</sup> incrementaban su expresión a pH alcalino. Los principales dominios que se han enriquecido en la muestra de proteínas procedentes de los “*downregulated genes*” a pH 8 son aquellos relacionados con procesos de metabolismo primario y secundario.

## 2.4. Papel regulador de SltA a pH alcalino

El factor transcripcional SltA es esencial en la respuesta a estrés por pH ambiental alcalino puesto que los alelos de pérdida de función total o parcial de *sltA* impiden el crecimiento de *A. nidulans* en esta condición de estrés (O’neil et al., 2002; Spielvogel et al., 2008). Dado que el análisis transcriptómico comparando las cepas silvestre y nula *sltA* en ausencia de estrés (sección 2.2.) reveló cambios significativos de expresión génica en ausencia de SltA, en esta sección analizamos el efecto combinado de la

delección de *sItA* con el cambio de pH extracelular. El objetivo fue tratar de delimitar la función reguladora de SItA en la respuesta a pH 8.

En primer lugar, se compararon los genes diferencialmente expresados en la cepa silvestre cultivada en medio alcalinizado (Figura R.2.4.1, círculos amarillos), con los DEGs obtenidos a pH 8 en el fondo nulo *sItA* (Figura R.2.4.1, círculos violetas). En la figura R.2.4.1 se muestran diagramas de Venn que ilustran estas comparativas. En el diagrama del panel A se comparan los DEGs cuya expresión se eleva en cada cepa cuando se alcaliniza el pH ambiental, y en el panel B la situación opuesta. Se observa que el número de DEGs difiere notablemente en cada comparación entre ambas cepas. Siendo menor siempre en la cepa nula *sItA*, interpretamos que un número amplio de genes pierden la expresión diferencial observada en el silvestre a pH 8 en ausencia de SItA. Se observa además que un cierto número de estos DEGs mantiene su tendencia (intersecciones), lo que sugiere que corresponderían con genes que se expresan diferencialmente a pH alcalino independientemente de la función SItA.

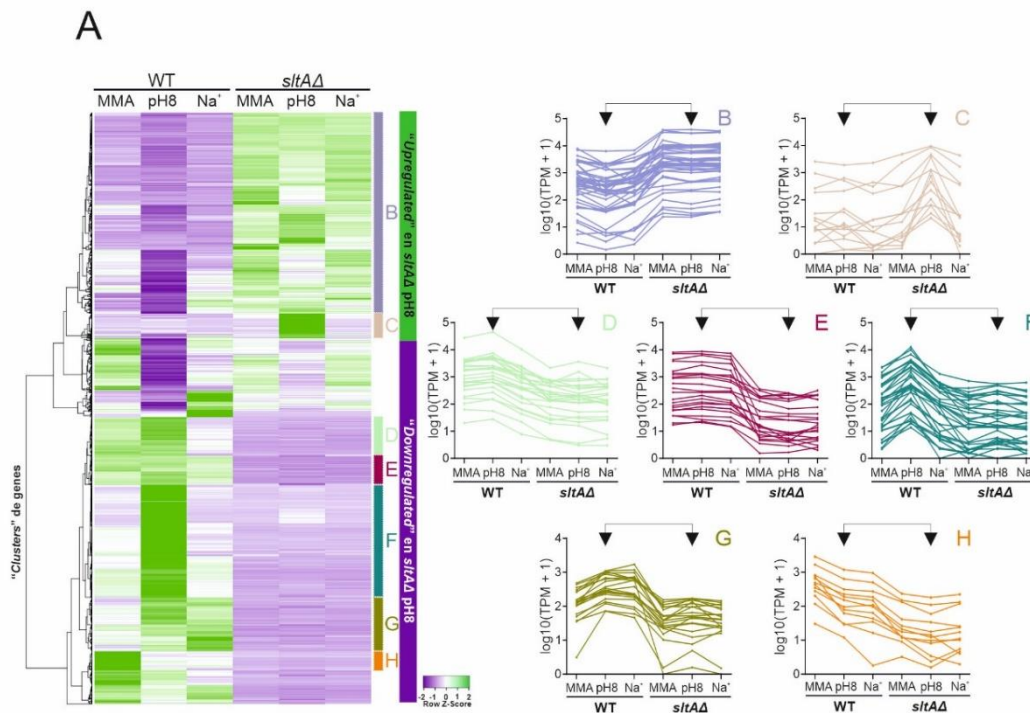


**Figura R.2.4.1.** Representación mediante diagramas de Venn del número de DEG comunes y no comunes en cada comparativa. **A)** Comparativa de genes “*upregulated*” a pH 8 en el fondo genético mutante *sItAΔ* (indicado en violeta) frente a los genes “*upregulated*” a pH 8 en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo). **B)** Comparativa de genes “*downregulated*” a pH 8 en el fondo genético mutante *sItAΔ* (indicado en violeta) frente a los genes “*downregulated*” a pH 8 en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo). **C)** Comparativa de genes “*upregulated*” a pH 8 en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo) frente a los genes “*upregulated*” en el fondo mutante *sItAΔ* a pH 8 respecto a los genes “*upregulated*” en la cepa silvestre a pH 8 (indicado en naranja). **D)** Comparativa de genes “*downregulated*” a pH 8 en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo) frente a los genes “*downregulated*” en el fondo mutante *sItAΔ* a pH 8 respecto a los genes “*downregulated*” en la cepa silvestre a pH 8 (indicado en naranja).

Los paneles C y D muestran una comparativa que trata de descubrir aquellos DEGs que presentan niveles excepcionalmente elevados o reducidos en el fondo nulo *sItA* a pH alcalino y, de éstos identificar cuantos genes serían susceptibles de un efecto aditivo de la pérdida de función de SItA y de la alcalinización del pH del medio, tanto al alza como a la baja en sus niveles de expresión. Así buscamos los DEGs en una comparativa entre

las cepas silvestre y nula *sltA* tratadas con pH alcalino (Figura R.2.4.1, círculos naranjas).

Encontramos 747 DEGs regulados al alza y 734 DEGs regulados a la baja en la cepa *sltAΔ*. De todos estos DEGs encontramos 14 que estarían más expresados en la cepa nula que en la silvestre a pH alcalino de lo que correspondería al incremento causado por la alcalinización del medio extracelular (panel C) y 19 que estarían menos expresados de lo que correspondería a la caída en su expresión por el pH8 (panel D). Se hace evidente que la ausencia de función SltA causa un cambio amplio en el patrón transcripcional tanto en condiciones de ausencia de estrés (ver sección 2.2) como en condiciones de cultivo alcalinas. La similitud en el número de genes desregulados en el fondo *sltAΔ* a pH 8 en comparación con el silvestre en la misma condición muestra nuevamente que SltA posee funciones regulatorias tanto positivas como negativas.



**Figura R.2.4.2.** Genes diferencialmente expresados en la cepa mutante *sltAΔ* a pH 8 respecto a la cepa silvestre en la misma condición de estrés (*sltAΔ* pH 8 vs WT pH 8). **A)** "Heatmap" de genes cuyos niveles de expresión aumentan ("upregulated genes", indicados en verde) o una disminuyen ("downregulated genes", indicados en morado) en la cepa *sltAΔ* a pH 8. **B)** Análisis de "clusters" de genes. **B-H)** Genes "upregulated" en el fondo *sltAΔ* en todas las condiciones. **C)** Genes "upregulated" solo a pH 8 en el mutante *sltAΔ*. **D)** Genes "downregulated" en todas las condiciones en la cepa *sltAΔ*. **E)** Genes no diferencialmente expresados en el silvestre pero "downregulated" en todas las condiciones en el fondo nulo *sltA*. **F)** Genes "upregulated" a pH 8 en la cepa silvestre y "downregulated" en todas las condiciones en el fondo nulo *sltA*. **G)** Genes "upregulated" en la cepa silvestre en ambas condiciones de estrés y "downregulated" en todas las condiciones en el mutante *sltAΔ*. **H)** Genes "downregulated" en la cepa silvestre en condiciones de estrés y "downregulated" en todas las condiciones en la cepa *sltAΔ*.

El “*heatmap*” de la figura R.2.4.2.A ilustra los DEGs al comparar las cepas WT y *sltAΔ* a pH 8, y a partir de los cuales se han descrito varios “*clusters*” de genes. El “*cluster*” B agrupa aquellos genes que mantuvieron una expresión basal en la cepa silvestre en cualquiera de las condiciones estudiadas, y los cuales, en ausencia de SltA, elevaron su expresión independientemente de la condición ambiental. El “*cluster*” C está formado por un pequeño número de genes los cuales presentaban una baja variación de la expresión en la cepa silvestre y en el mutante su expresión aumentaba significativamente solo en la condición de alcalinidad. Entre los “*downregulated genes*” encontramos una mayor variedad de patrones transcripcionales. Los “*clusters*” D y E muestran aquellos genes cuyos niveles de expresión disminuyeron en todas las condiciones estudiadas en la cepa *sltAΔ* respecto a los niveles observados en la cepa silvestre. Los “*clusters*” F y G muestran los genes que se expresaban dependientemente de la condición ambiental y que perdían esta regulación parcial o totalmente en ausencia de SltA. Por último, el “*cluster*” H muestra una caída de los niveles de expresión en el fondo nulo *sltA* de genes levemente “*downregulated*” en el silvestre en las condiciones de estrés.

El análisis de enriquecimiento de los dominios Interpro de los DEGs resultantes de esta comparación (Figura R.2.4.3) se corresponden con transportadores (MFS), proteínas con dominios de unión a NAD(P), hidrolasas y deshidrogenasas mayoritariamente, tanto en “*upregulated genes*” como en “*downregulated genes*”. Entre los dominios enriquecidos en genes “*upregulated*” encontramos genes que codifican proteínas con función metabólica, y entre aquellos “*downregulated*” detectamos factores de transcripción tipo Zn2Cys6 y C2H2 entre otros.



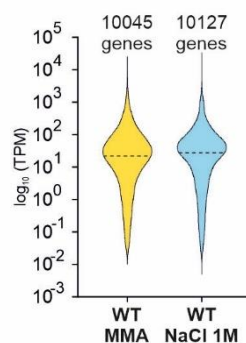
**Figura R.2.4.3.** Listado de los principales dominios Interpro detectados entre los genes diferencialmente expresados (DEGs) a pH 8 en la cepa *sltAΔ* con respecto a los niveles de expresión de la cepa silvestre a pH 8. En verde se identifican los dominios codificados por genes “*upregulated*”; en morado se corresponden con los genes “*downregulated*” y en negro son dominios que se encuentran tanto entre genes “*upregulated*” como “*downregulated*”.

El conjunto de análisis realizados muestra que la alcalinización del pH ambiental genera una respuesta transcripcional tanto positiva como negativa. Esta respuesta se ve

notablemente alterada en ausencia de función *SltA*. Los datos siguen apoyando la dualidad de *SltA* como posible regulador positivo y negativo. La identificación de dominios Interpro enriquecidos correspondientes a factores de transcripción sugiere que parte de esta alteración del patrón transcripcional puede ser por una función reguladora de *SltA* sobre otros factores transcripcionales como es el regulador de la respuesta al pH ambiental PacC.

## 2.5. Efecto transcripcional de una elevada concentración de sodio en el medio extracelular

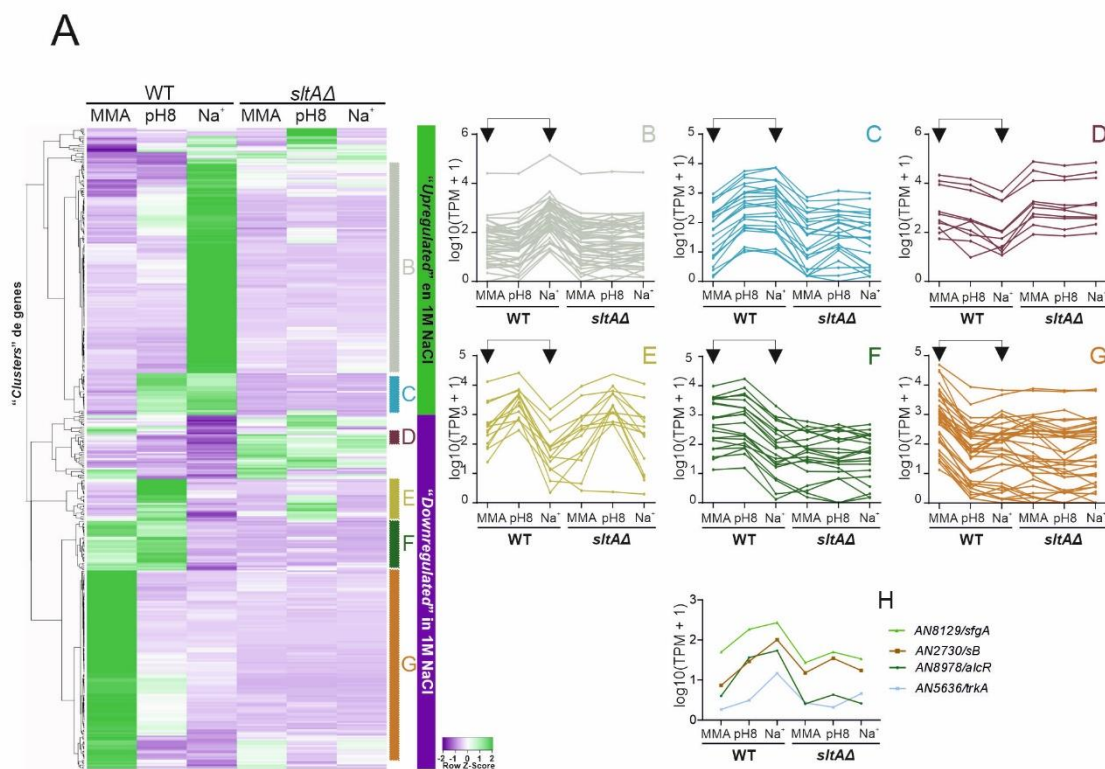
De forma similar al estudio del efecto transcriptómico en la respuesta a alcalinidad ambiental en *A. nidulans*, se realizaron los mismos tipos de análisis para comprender la respuesta transcripcional al aumento de concentración de catión sodio en el medio extracelular. De los 10550 genes analizados, 10045 genes presentaron expresión en medio mínimo (MMA) y 10127 genes se expresaban tras 60 minutos de inducción de estrés por 1 M NaCl (Figura R.2.5.1). La mayoría de los genes en los que se detectó expresión lo hacen con un valor de TPM similar en ambas cepas, aunque se observó un aumento de genes que se expresan a niveles muy bajos en la condición de estrés. En el análisis de expresión diferencial se identificaron 183 “*upregulated genes*” y 217 “*downregulated genes*” que se muestran en el “*heatmap*” de la figura R.2.5.2.A.



**Figura R.2.5.1.** Gráficos de violín que muestran la distribución de los genes que se expresan (TPM>0) en ausencia de estrés (MMA) y en estrés por alta concentración de catión sodio (1 M NaCl) en el fondo genético silvestre (WT) (MAD4096). Los niveles de expresión de estos genes se ilustran según su valor log<sub>10</sub> (TPM). Las líneas discontinuas indican el valor de la mediana.

A partir del “*heatmap*” se definieron seis “*clusters*” de patrones de expresión. Los “*clusters*” B y C están formados por genes “*upregulated*” en la condición 1 M NaCl (B) o en ambas condiciones de estrés en la cepa silvestre (C) y sin embargo no responden a este estrés en un fondo nulo *sltA*. Los cuatro “*clusters*” restantes los conforman genes

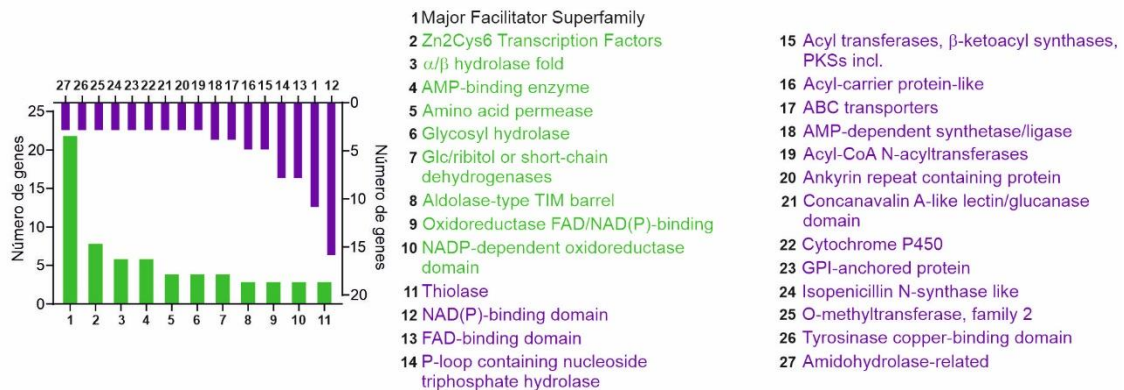
cuya expresión disminuye en exceso de sodio. El “cluster” D muestra los genes “downregulated” en el silvestre a 1 M NaCl que en ausencia de *sItA* elevan sus niveles de expresión independientemente de la condición ambiental. Los genes del “cluster” E se corresponden con aquellos genes “upregulated” a pH alcalino y “downregulated” en la condición de estrés salino, y cuya expresión es además independiente o parcialmente dependiente de *SItA*. Los “clusters” F y G muestran los “downregulated genes” en una o ambas condiciones de estrés en la cepa silvestre y que se encuentran desregulados en todas las condiciones estudiadas en el mutante *sItAΔ*.



**Figura R.2.5.2.** Genes diferencialmente expresados en la cepa silvestre sometida a estrés por alta concentración de catión sodio (WT Na<sup>+</sup> vs WT MMA). **A)** “Heatmap” de genes cuyos niveles de expresión aumentan (“upregulated genes”, indicados en verde) o disminuyen (“downregulated genes”, indicados en morado) en la condición de estrés por 1 M NaCl. **B-H)** Análisis de “clusters” de genes. **B)** Genes “upregulated” solo en la condición de estrés por catión sodio en la cepa WT. **C)** Genes “upregulated” en la cepa silvestre en ambas condiciones de estrés y no diferencialmente expresados en el fondo mutante *sItAΔ*. **D)** Genes “downregulated” en la condición Na<sup>+</sup> y “upregulated” en todas las condiciones en la cepa *sItAΔ*. **E)** Genes “upregulated” a pH 8 y “downregulated” en Na<sup>+</sup> en ambas cepas. **F)** Genes “downregulated” en Na<sup>+</sup> en la cepa silvestre y “downregulated” en todas las condiciones en el fondo nulo *sItA*. **G)** Genes “downregulated” en la cepa silvestre en ambas condiciones de estrés y “downregulated” en todas las condiciones en la cepa *sItAΔ*. **H)** Genes “upregulated” en la cepa silvestre en la condición de estrés por 1 M NaCl y “downregulated” en el fondo nulo *sItA*.

Un ejemplo de DEG en exceso de sodio es el gen codificante de la permeasa de sulfato, AN2730/*sB* (Figura R.2.5.2.H). Los niveles de expresión de este gen se elevaron en

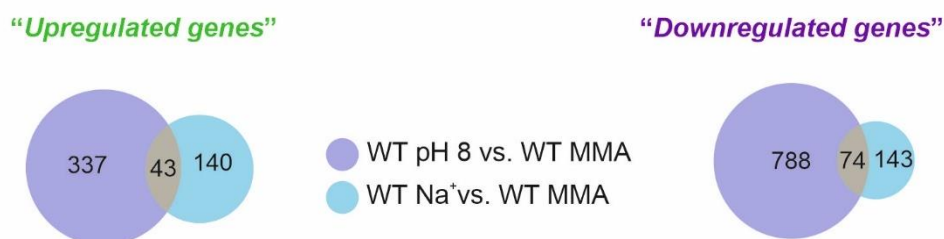
ambas condiciones de estrés, pero diferencialmente ( $\log_2FC \geq 2$ ) solo en la condición de 1M NaCl en la cepa silvestre. La delección de *sItA* causó un aumento de la expresión de este gen en medio mínimo (MMA) y la condición de exceso de sodio no causó variaciones del nivel de expresión como ocurría en la cepa silvestre. Otros genes que presentaron un patrón similar son los genes *AN8129/sfgA* y *AN8978/alcR* que codifican para factores de transcripción de tipo Zn2Cys6 y que participan en la regulación del desarrollo asexual y en el regulón del etanol, respectivamente. Estos genes se encontrarían en los “clusters” B y C de la figura R.2.5.2. Por otro lado, el gen *AN5636/trkA*, que codifica para un transportador de potasio, se identificó como “*upregulated gene*” en la condición de sodio en la cepa silvestre, mientras que en el fondo nulo *sItA*, aunque aparentemente se observa una ligera elevación de los niveles de expresión en respuesta al estrés por sodio, esta respuesta no es suficiente para clasificarse como DEG en otras comparaciones.



**Figura R.2.5.3.** Listado de los principales dominios Interpro detectados entre los genes diferencialmente expresados (DEGs) en 1 M NaCl en la cepa silvestre (WT). En verde se identifican los dominios codificados por genes “*upregulated*”; en morado se corresponden con los genes “*downregulated*” y en negro son dominios que se encuentran tanto entre genes “*upregulated*” como “*downregulated*”.

En el análisis de enriquecimiento de dominios Interpro en los DEGs obtenidos en esta condición de estrés salino en la cepa silvestre (Figura R.2.5.3), detectamos, al igual que en comparaciones previas, dominios correspondientes a la familia de proteínas transportadoras de tipo MFS. Entre los “*upregulated genes*” en altos niveles de  $Na^+$  encontramos nuevamente factores de transcripción Zn2Cys6 y proteínas que participan en el metabolismo general de la célula. Los dominios identificados en la mayoría de los genes “*downregulated*” en el medio con exceso de sodio se correspondían con dominios de unión a NAD(P) además de las proteínas transportadoras y proteínas que pertenecen a rutas del metabolismo secundario.

Al comparar los datos de los DEGs en respuesta a la alcalinidad y al sodio en la cepa silvestre (Diagramas Venn, figura R.2.5.4), observamos que no solo existe una



**Figura R.2.5.4.** Representación mediante diagramas de Venn comparando los DEGs comunes y específicos de las condiciones de estrés ambiental de alcalinización (representación en violeta) y estrés por alta concentración de catión sodio (representación en azul) en la cepa silvestre (WT). Los genes comunes se muestran en gris.

diferencia en el número de genes que se expresan diferencialmente, sino que además solo se identificaron 43 “*upregulated genes*” y 74 “*downregulated genes*” en ambas condiciones de estrés. De modo que aparentemente el tipo de estrés ambiental inducido da lugar a una respuesta transcripcional específica, siendo la condición de alcalinidad la que presenta mayor número de genes diferencialmente expresados respecto a la condición sin estrés ambiental. Un ejemplo de esta respuesta común la encontramos entre los 43 genes regulados al alza, *AN9168*, un gen que codifica para un transportador MFS de tipo simporte glicerol/protón ortólogo de Stl1p en *S. cerevisiae*.

## 2.6. Papel regulador de SltA en presencia de altos niveles de sodio extracelular

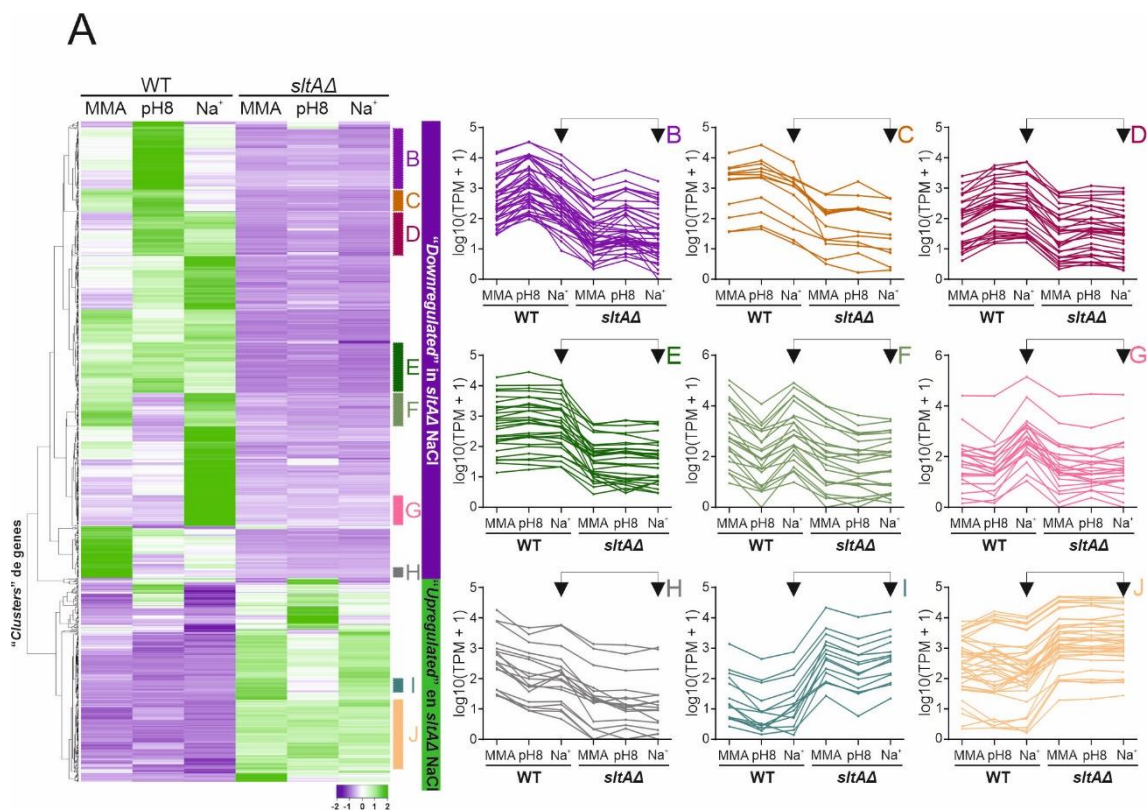
Al analizar los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a salinidad y en relación con la función de SltA encontramos resultados muy diferentes según el análisis comparativo entre cepas y condiciones de cultivo. En la figura R.2.6.1 se muestran los “*upregulated genes*” y “*downregulated genes*” con dos tipos de comparaciones. En primer lugar, al comparar el efecto transcripcional del cambio de condición en una cepa nula *sltA* (Figura R.2.6.1, paneles A y B) con el efecto de la salinidad en la cepa silvestre, observamos que solo detectamos un gen “*upregulated*” y 5 genes “*downregulated*” entre ambas cepas. El número total de DEGs en la cepa *sltAΔ* es de 14. Un número de genes notablemente menor que el obtenido en otras comparaciones abriendo la posibilidad de que SltA ya estaba causando diferencias notables en estos genes inducibles o represibles por sodio en condiciones sin estrés. Las comparaciones mostradas en la figura R.2.6.1 (paneles C y D) parecen apoyar esta hipótesis de trabajo. En estos análisis se comparó, como se había hecho antes con el efecto del pH alcalino (ver

sección 2.4), el efecto de la ausencia de SltA sobre los ya observados en la cepa silvestre. En este análisis se observó que ninguno de los “*upregulated genes*” era común, y en la cepa *sltAΔ* se detectó un total de 339 genes que mostraron unos niveles mayores de expresión respecto a los observados en la cepa silvestre en condiciones de alta concentración de sodio. Entre los “*downregulated genes*” encontramos un total de 23 genes “*downregulated*” que forman parte de la respuesta transcripcional habitual en la cepa silvestre y que sin embargo su expresión también se encontraba diferencialmente “*downregulated*” en la condición de estrés en el nulo *sltA* al compararlo con la cepa silvestre en esta misma condición. Este grupo de genes serían dependientes tanto de la señal causada por el alto nivel de sodio extracelular como de la función SltA. El análisis de expresión diferencial en la condición de estrés salino entre cepas detectó 731 “*downregulated genes*”, un número mayor de DEGs que el observado en el estudio del efecto del sodio en la cepa *sltAΔ* (comparación *sltAΔ* MMA vs. *sltAΔ* Na<sup>+</sup>, indicado en azul), por lo que gran parte de los genes desregulados son dependientes de SltA en condiciones de ausencia de estrés (apartado 2.2 de la sección de Resultados), y las condiciones de estrés promueven una alteración general en el patrón transcriptómico que incluye la represión y desrepresión inadecuada de genes.



**Figura R.2.6.1.** Representación mediante diagramas de Venn del número de DEG comunes y no comunes en cada comparativa. **A)** Comparativa de genes “*upregulated*” a en 1 M Na<sup>+</sup> en el fondo genético mutante *sltAΔ* (indicado en azul) frente a los genes “*upregulated*” en 1 M Na<sup>+</sup> en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo). **B)** Comparativa de genes “*downregulated*” en 1 M Na<sup>+</sup> en el fondo genético mutante *sltAΔ* (indicado en azul) frente a los genes “*downregulated*” en 1 M Na<sup>+</sup> en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo). **C)** Comparativa de genes “*upregulated*” en 1 M Na<sup>+</sup> en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo) frente a los genes “*upregulated*” en el fondo mutante *sltAΔ* en 1 M Na<sup>+</sup> respecto a los genes “*upregulated*” en la cepa silvestre a 1 M Na<sup>+</sup> (indicado en rosa). **D)** Comparativa de genes “*downregulated*” en 1 M Na<sup>+</sup> en el fondo genético silvestre (indicado en amarillo) frente a los genes “*downregulated*” en el fondo mutante *sltAΔ* en 1 M Na<sup>+</sup> respecto a los genes “*downregulated*” en la cepa silvestre en 1 M Na<sup>+</sup> (indicado en rosa).

El “*heatmap*” de la figura R.2.6.2.A muestra los DEGs en la cepa *sltAΔ* en el medio salino comparado con la cepa silvestre en la misma condición de estrés, y a partir del cual se identificaron varios “*clusters*”. Los “*clusters*” B-H se corresponden con “*downregulated genes*” en el mutante en la condición de estrés por sodio, y en algunos de estos “*clusters*” se detectaron perfiles que muestran un descenso de los niveles de expresión en la cepa mutante incluso en ausencia de estrés. Este mismo resultado se observó en los dos “*clusters*” identificados de los genes “*upregulated*” (“*clusters*” I y J) donde la desregulación ya se detecta en el fondo nulo *sltA* en ausencia de estrés, y la inducción de estrés salino no logra modificar estos niveles de expresión.



**Figura R.2.6.2.** Genes diferencialmente expresados en la cepa silvestre sometida a estrés por alta concentración de catión sodio en el fondo nulo *sltA* (*sltAΔ* Na<sup>+</sup> vs WT Na<sup>+</sup>). **A)** “*Heatmap*” de genes cuyos niveles de expresión aumentan (“*upregulated genes*”, indicados en verde) o una disminuyen (“*downregulated genes*”, indicados en morado). **B-J)** Análisis de “*clusters*” de genes. **B)** Genes “*downregulated*” en la condición de estrés por catión sodio en la cepa WT y en todas las condiciones en *sltAΔ*. **C)** Genes no diferencialmente expresados en el WT y “*downregulated*” en el mutante *sltAΔ*. **D)** Genes “*upregulated*” en ambas condiciones de estrés en la cepa WT y “*downregulated*” en todas las condiciones en la cepa *sltAΔ*. **E)** Genes “*downregulated*” en el fondo nulo *sltA* respecto al WT. **F)** Genes “*downregulated*” solo en pH 8 en la cepa silvestre y “*downregulated*” en todas las condiciones en el fondo nulo *sltA*. **G)** Genes “*upregulated*” solo en Na<sup>+</sup> en la cepa silvestre y “*downregulated*” en todas las condiciones en la cepa *sltAΔ*. **H)** Genes “*downregulated*” en la cepa silvestre en ambas condiciones de estrés y “*downregulated*” en el fondo nulo *sltA*. **I)** Genes “*downregulated*” en ambas condiciones de estrés en la cepa WT y “*upregulated*” en el fondo nulo *sltA*. **J)** Genes no diferencialmente expresados en respuesta a estrés en la cepa WT y “*upregulated*” en todas las condiciones en el mutante *sltAΔ*.

Los dominios Interpro enriquecidos mayoritarios tanto en genes “*upregulated*” como “*downregulated*” se corresponden con dominios de la superfamilia  $\alpha/\beta$  hidrolasas y dominios de citocromo P450 (Figura R.2.6.3). Entre los genes “*upregulated*” el resto de los dominios Interpro enriquecidos se identifican con proteínas que participan en diferentes rutas metabólicas, mientras que entre los genes “*downregulated*” encontramos, como en otras comparaciones entre condiciones y cepas, tanto a proteínas transportadoras de tipo MFS como factores transcripcionales de tipo Zn2Cys6 y C2H2.



**Figura R.2.6.3.** Listado de los principales dominios Interpro detectados entre los genes diferencialmente expresados (DEGs) en 1 M NaCl en la cepa *sltAΔ*. En verde se identifican los dominios codificados por genes “*upregulated*”; en morado se corresponden con los genes “*downregulated*” y en negro son dominios que se encuentran tanto entre genes “*upregulated*” como “*downregulated*”.



## Capítulo 3. El sistema Pal/PacC como diana del factor transcripcional SltA

### 3.1 Regulación de la expresión de *pacC* utilizando la técnica de qPCR

El factor transcripcional PacC es uno de los tres principales factores transcripcionales que media la regulación génica en respuesta a estrés por alcalinidad ambiental. Este factor se ha estudiado en diferentes organismos fúngicos desde hongos filamentosos a levaduras, en las cuales se identifica como Rim101.

Al igual que SltA, el factor transcripcional PacC presenta tres formas proteicas: la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> y dos formas procesadas proteolíticamente de 53kDa y 27kDa. Sin embargo, a diferencia de SltA, las formas procesadas de PacC solo se generan en ambientes de alcalinidad con una acumulación notable de su forma activa PacC<sup>27kDa</sup>. El primer corte proteolítico de PacC<sup>72kDa</sup> es dependiente de pH y es resultado de la señalización por la ruta Pal siendo el último efector la proteasa PalB, mientras que el segundo corte proteolítico es llevado a cabo en el proteosoma independientemente del pH ambiental (Peñalva et al., 2014).

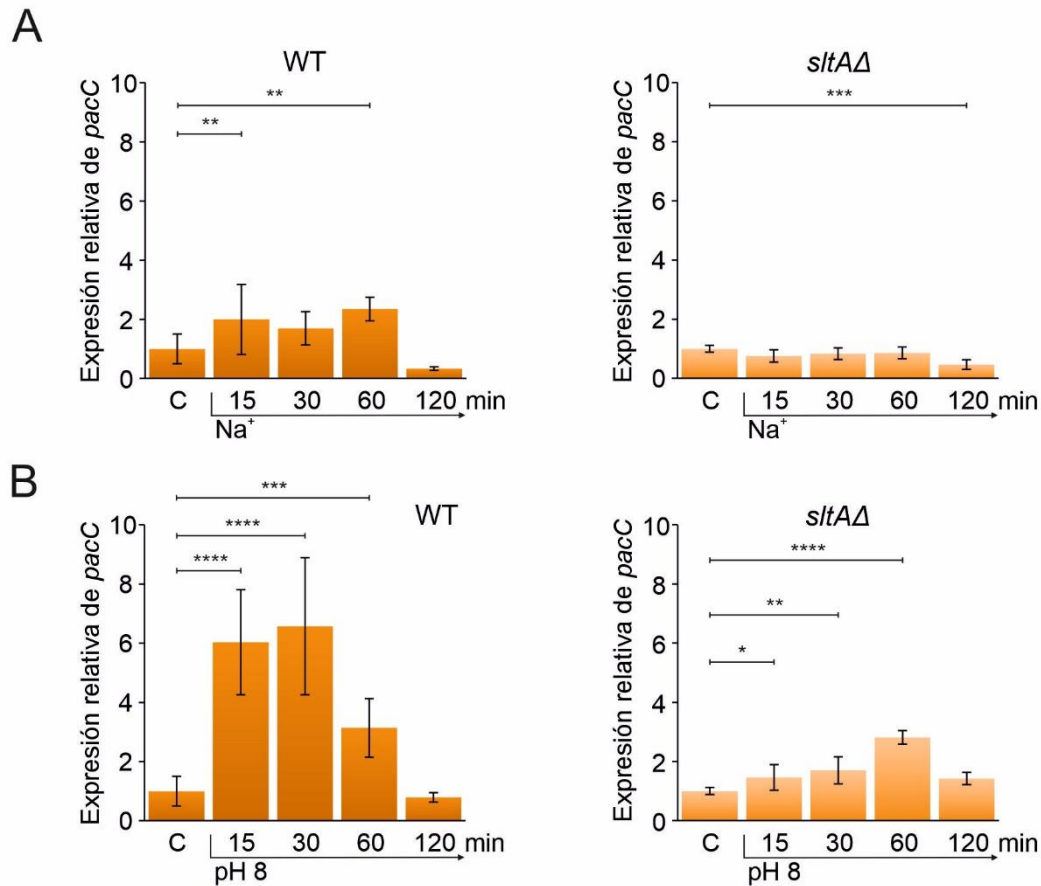
Los resultados obtenidos en el análisis de secuenciación masiva de RNA mostraron que, entre los factores transcripcionales con dedos de zinc clásicos (es decir de tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) descritos, solo el gen que codifica para PacC mostraba una alteración en sus niveles de expresión en un fondo nulo *sltA* a pH 8 (sección 2.4). Se observó un aumento significativo de los niveles de expresión de *pacC* tras 60 minutos en alcalinidad en la cepa silvestre con valores de TPM que cambiaban de 55,38 a 433,79 (enlace al Anexo RNAseq en sección 2.1). Sin embargo, en el mutante nulo *sltA* la elevación de dichos valores de TPM fue notablemente menor, de 34,02 a 102,61. Analizando los valores de TPMs de los demás genes del sistema PacC/Pal encontramos que el gen *palF*, que codifica para una proteína similar a las arrestinas implicada en la señalización de PacC (Herranz et al., 2005), presentaba alteraciones en la regulación de la expresión en respuesta a la alcalinización ambiental en ausencia de SltA. Los valores TPM en la cepa silvestre pasaron de 44,94 a 11,92 tras la inducción de estrés mientras que en el mutante *sltAΔ* estos valores descendieron a 14,78 en ausencia de estrés con un descenso a 11,73 a pH 8.

La primera sección de este capítulo se enfoca en determinar el efecto de la ausencia de SltA sobre el nivel de expresión de *pacC* en condiciones de alta concentración de catión sodio y de pH alcalino ambiental a tiempos adicionales a los ensayos en el análisis de RNAseq. Para el estudio del perfil transcripcional del gen *pacC* se recurrió a los

ensayos de estrés ambiental en las condiciones estandarizadas de estrés por sal y por alcalinidad (ver Materiales y Métodos, apartados 1 y 2 y capítulos de Resultados 1 y 2) tanto en una cepa silvestre como en ausencia del factor transcripcional SltA. Nuevamente para estos análisis se recurrió por primera vez, y de forma sistemática, a determinar los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa en medio mínimo obteniendo RNA total de la cepa silvestre (MAD3652) y de la cepa nula *sltA* MAD3816. Los inductores de la condición de estrés ambiental fueron 1 M NaCl para la condición de estrés por elevada concentración de cation sodio, y 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para inducir la condición de alcalinidad ambiental. El micelio se recogió de los cultivos a los 15, 30, 60 y 120 minutos como se detalla en Materiales y Métodos (apartados 1 y 2). A partir de las muestras de RNA total se obtuvieron las hebras de DNA codificante (cDNA) usadas como molde en la PCR cuantitativa. Los cebadores diseñados, próximos al codón stop de *pacC*, amplificaban un fragmento de 250 pb. Los niveles de expresión relativos se obtuvieron usando el nivel de expresión del gen *benA* como referencia y los valores además se normalizaron con respecto al nivel de *pacC* en la condición control (C) sin estrés de cada cepa.

La adición de 1M NaCl al medio de cultivo causó una ligera elevación de la expresión de *pacC* con valores incrementados significativamente a los 15 y 60 minutos, duplicando en este último el nivel de expresión con respecto a la condición control (Figura R.3.1.A, izquierda). Tras 120 minutos en el medio salino, la expresión de *pacC* cayó por debajo de los niveles iniciales. La adición de 1M sodio no generó apenas variaciones de expresión en el gen *pacC* en la cepa mutante *sltAΔ* (Figura R.3.1.A, derecha), y únicamente se observó una caída significativa de la expresión tras 120 minutos de cultivo.

El aumento de los valores de pH ambiental en el medio de cultivo generó en la cepa silvestre una respuesta transcripcional de *pacC* significativamente elevada (Figura R.3.1.B, izquierda). La expresión se incrementó aproximadamente 6 veces en los primeros 15 minutos a pH 8, y el pico de expresión se alcanzó a los 30 minutos. Tras 120 minutos los niveles de *pacC* se reestablecieron al nivel observado en la condición control. En ausencia de SltA (*sltAΔ*), la inducción de alcalinidad en el medio no generó una respuesta tan fuerte como la observada en la cepa silvestre (Figura R.3.1.B, derecha). En este caso, el aumento de la expresión fue mínimo durante los primeros 30 minutos con diferencias poco significativas, y el punto máximo de expresión quedó desplazado a los 60 minutos, donde la expresión de *pacC* se triplicó con respecto a la condición control.



**Figura R.3.1.** Perfiles de expresión de *pacC* medidos mediante qPCR. Niveles de expresión relativa del gen *pacC* con respecto a los niveles de expresión del gen de referencia  $\beta$ -tubulina (*AN1182/benA*). **A)** Análisis de extractos de cDNA de una cepa silvestre (MAD3652) y de una cepa *sltAΔ* (MAD3816) en la condición sin estrés ambiental (C), y en condiciones de estrés por 1 M NaCl ( $\text{Na}^+$ ) y **B)** por alcalinización del medio de cultivo (pH 8, 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), durante 15, 30, 60 y 120 minutos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas experimentales para cada muestra. Los asteriscos representan el nivel de significación del valor-P:  $P \leq 0,05$  (\*);  $P \leq 0,01$  (\*\*);  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) ;  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*).

La expresión de *pacC* es efectivamente dependiente de pH como ya se había observado en trabajos previos (Bussink et al., 2015), así como en el ensayo de RNAseq (Capítulo 2.3 de Resultados). Usando el procedimiento de análisis transcriptómico de qPCR hemos podido verificar además que la ausencia de SltA generó una alteración del perfil transcriptómico de *pacC* no solo a los 60 minutos de la inducción del estrés abiótico como se había observado en el análisis de RNAseq, sino también a lo largo de todo el tiempo experimental estudiado. Dados estos resultados de expresión del gen que codifica para el factor transcripcional PacC, hemos considerado necesario estudiar si la alteración de los niveles de expresión es suficientemente determinante como para influir en los niveles de las formas proteica de PacC.

### 3.2. Desacoplamiento entre transcripción y traducción de PacC

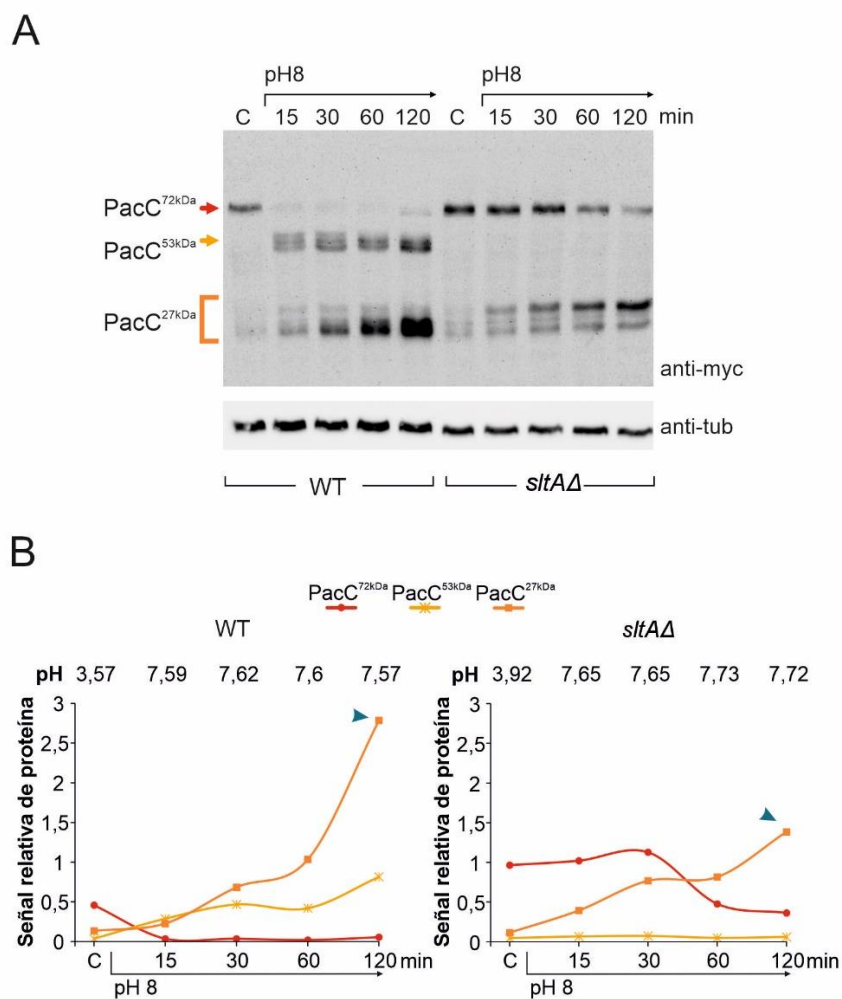
Una vez verificadas las alteraciones en los perfiles transcriptómicos del gen *pacC* en condiciones de alcalinidad en una cepa carente de función *SltA*, se procedió a determinar si el cambio en el patrón transcripcional de *pacC* también afectaba a los niveles de las diferentes formas de PacC, desde las formas primarias a aquellas formas modificadas post-traduccionalmente a pH 8.

Para evaluar los niveles de proteína PacC tanto en condiciones de pH ácido (condición control), como de sus formas procesadas a pH alcalino, se generaron por cruce una cepa silvestre (MAD7627) y otra nula *sltA* (MAD7630) que portaban el alelo *pacC900*. El alelo *pacC900* codifica para una fusión entre PacC y tres copias del epítipo MYC. El epítipo se localiza en el extremo amino terminal de PacC para que se puedan inmunodetectar. Esta construcción se llevó a cabo en trabajos anteriores del grupo de investigación y se considera que el alelo *pacC900* manifiesta un fenotipo silvestre (Hervás-Aguilar et al., 2007).

La inducción de pH 8 y los tiempos experimentales elegidos se mantienen como en los ensayos de expresión y de inmunodetección descritos en los capítulos 1 (apartados 1.1 y 1.2) y 3 (apartado 3.1). A partir de las muestras de micelio filtrado y liofilizado se llevó a cabo la extracción de proteína total y las muestras de ambas cepas, silvestre y *sltA*Δ, se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos específicos contra el epítipo MYC (Materiales y Métodos, apartado 10). Detectamos la señal de las diferentes formas de PacC900 en la condición control y/o a pH 8 en ambas cepas (Figura R.3.2.A) durante 15, 30, 60 y 120 minutos. La figura R.3.2.B muestra la señal relativa de cada forma de PacC, respecto a los niveles de tubulina (anti-tubulina), en cada tiempo experimental ensayado.

Los niveles de expresión de *pacC* se elevan al aumentar el pH extracelular (Bussink et al., 2015; Tilburn et al., 1995) En cuanto a las formas detectadas de PacC, en ausencia de estrés por alcalinidad ambiental se acumula principalmente la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> (Figura R.3.2.A). Al alcalinizar el medio, se observó tanto en la imagen de la inmunodetección como en la medición de señal relativa de proteína (Figura R.3.2.B, izquierda) que los niveles de PacC<sup>72kDa</sup> cayeron en favor del aumento de la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup>, que se genera de manera pH-dependiente (Díez et al., 2002), y de la acumulación de la forma activa PacC<sup>27kDa</sup> obtenida por el procesamiento de la forma intermedia en el proteosoma independientemente de pH (Hervás-Aguilar et al., 2007). Se detectaron varias formas de PacC<sup>53kDa</sup> con diferente movilidad

electroforética y que han de corresponderse con formas fosforiladas previamente descritas (Hervás-Aguilar et al., 2007). A lo largo de los 120 minutos de exposición al estímulo de alcalinidad, los niveles de esta forma intermedia aumentaron progresivamente. La forma activa, PacC<sup>27kDa</sup>, presentaba también varias formas descritas en Hervás-Aguilar y colaboradores (Hervás-Aguilar et al., 2007), debido a modificaciones post-traduccionales y por la inespecificidad del sitio de procesamiento de PacC<sup>53kDa</sup> en el proteosoma. Pese a la variedad de estas formas de PacC<sup>27kDa</sup>, aquellas de mayor movilidad electroforética se acumularon de manera preferente a lo largo de los tiempos analizados. Tras 120 minutos en condiciones de alcalinidad la forma PacC<sup>27kDa</sup> fue la forma mayormente acumulada.



**Figura R.3.2.** Señalización y procesamiento de PacC a pH alcalino (pH 8). **A)** Inmunodetección de las formas PacC<sup>72kDa</sup>, PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> en extractos de proteína total de cultivos crecidos en medio mínimo (MMA) en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8) durante 15, 30, 60 y 120 minutos en una cepa silvestre (WT, MAD7627) y en una cepa *sitAΔ* (MAD7630). **B)** Cuantificación de señal de proteína relativa de las formas PacC con respecto a la señal del control de carga de proteína,  $\alpha$ -tubulina (anti-tub). Las flechas azules indican la acumulación total de la forma PacC<sup>27kDa</sup> tras 120 minutos de inducción de estrés por alcalinidad ambiental.

En ausencia de SltA (Figura R.3.2.A, derecha) la forma primaria de PacC<sup>72kDa</sup> apareció también como la forma predominante en el medio de cultivo sin estrés (pH ácido), duplicando además su señal respecto a la cantidad observada en la cepa silvestre (Figura R.3.2.B). A pH 8, PacC<sup>72kDa</sup> mantuvo una señal relativamente alta durante todo el tiempo experimental con una bajada de sus niveles tras 60 minutos sin alcanzar los bajos niveles de detección observados en la cepa silvestre. La acumulación de la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> observada en la cepa silvestre no se detectó en la cepa mutante *sltAΔ* a lo largo del ensayo de alcalinidad. La señal relativa de proteína es prácticamente cero y mayores tiempos de exposición de la membrana no mejoraron la detección de esta forma. Este resultado podría indicar un proceso de señalización ineficiente en la ruta Pal que afectaría al corte proteolítico de PacC<sup>72kDa</sup>. Pese a la acumulación de la forma primaria y los bajos niveles de forma intermedia de PacC, sí se observó una acumulación de señal de la forma totalmente procesada PacC<sup>27kDa</sup>, aunque con diferencias de movilidad respecto a las observadas en los extractos proteicos de la cepa silvestre. En primer lugar, en la cepa mutante, las formas de PacC<sup>27kDa</sup> con menor movilidad electroforética se acumularon de manera predominante frente a las formas de menor tamaño que se acumulaban en la cepa silvestre (Figura R.3.2.A). En segundo lugar, la señal relativa de PacC<sup>27kDa</sup> aumentó a un ritmo similar al observado en la cepa silvestre durante los primeros 30 minutos a pH 8 (Figura R.3.2.B) sin embargo, el ritmo de acumulación de PacC<sup>27kDa</sup> disminuyó en el mutante *sltAΔ* durante los 60 y 120 minutos del ensayo de alcalinidad, detectándose en este último tiempo experimental la mitad de señal PacC<sup>27kDa</sup> en la cepa mutante respecto al silvestre (Figura R.3.2. B, flechas azules).

Aunque los niveles de proteína PacC total son menores en la cepa mutante *sltAΔ*, la diferencia no ha sido tan notable como se esperaba dados los resultados del ensayo de transcripción (apartado 3.1 de Resultados). Sin embargo, sí que hemos detectado alteraciones en el patrón de procesamiento de PacC tanto en el primer corte proteolítico dependiente de la ruta Pal como en el segundo paso procesativo dependiente del proteosoma. La acumulación de la forma PacC<sup>27kDa</sup> de menor movilidad electroforética en lugar de las formas de menor tamaño puede estar afectando a la correcta función reguladora de la forma activa de 27kDa y por tanto influir en la eficacia de respuesta al estrés por alcalinidad ambiental.

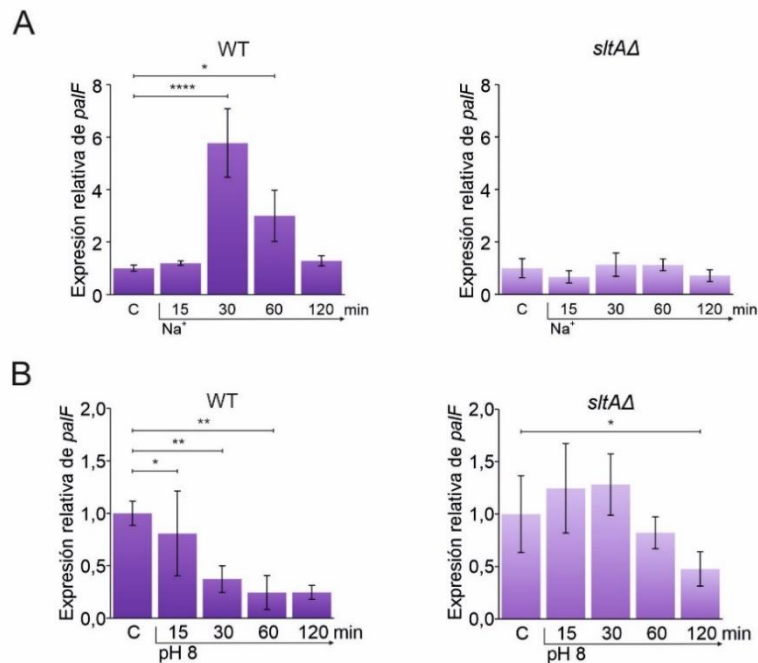
### 3.3. PalF: Regulación de su nivel de expresión y modificaciones post-traduccionales

En la activación del factor transcripcional PacC participan las proteínas PalA, B, C, F, H e I, que en conjunto se conocen como la ruta de señalización Pal, así como algunos elementos que forman parte de los complejos ESCRT. De los genes que codifican para las proteínas Pal, el gen *palF* es el único cuya expresión es dependiente de pH (Bussink et al., 2015). En condiciones de alcalinidad, al contrario de lo que ocurría con el gen *pacC*, la expresión de *palF* disminuye. Además, las modificaciones post-traduccionales a pH alcalino son esenciales en la señalización de la ruta ya que garantiza el proceso de reclutamiento de los elementos de los complejos ESCRT que a su vez reclutan a PalC, PalA y PalB permitiendo así la señalización y procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> a PacC<sup>53kDa</sup>. En el estudio transcriptómico descrito a lo largo del capítulo 2, *pacC* y *palF* son los únicos genes diferencialmente expresados en la cepa silvestre en condiciones de estrés por pH alcalino de todos los que conforman el sistema Pal/PacC (Capítulo 2.3 de Resultados y enlace del Anexo disponible en el Capítulo 2.1 de Resultados). Dicha expresión diferencial en ambos genes a pH alcalino se perdía en la cepa *sltAΔ*. Los cambios observados en los niveles de expresión de *pacC* y en su procesamiento proteolítico causados por la ausencia de SltA a pH 8 planteaban tanto un efecto negativo en el funcionamiento de la ruta Pal, como que posibles alteraciones en los niveles de expresión y de proteína PalF pudieran estar afectando al perfil proteolítico de PacC.

Para el estudio del perfil transcriptómico de *palF* se recurrió al procedimiento de PCR cuantitativa manteniendo las mismas condiciones experimentales y protocolos que para el estudio de los perfiles génicos de *sltA*, *sltB* y *pacC* en condiciones de estrés por alta concentración de catión sodio (1M NaCl) y por alcalinización del medio de cultivo (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Ver apartados 2, 5, 6 y 7 en la sección de Materiales y Métodos y capítulos 1 y 3 de Resultados). Las cepas usadas para el perfil transcriptómico fueron una cepa silvestre (MAD3652) y una cepa *sltAΔ* (MAD3816). Los cebadores diseñados para el análisis mediante qPCR generaban fragmentos de 266 pb de la región codificante en localización 3'-terminal. Para el análisis de los niveles de proteína de PalF se obtuvieron mediante cruce cepas silvestre (MAD7627) y *sltAΔ* (MAD7630) que expresaban una quimera funcional de PalF fusionada a 3 copias del epítipo HA (hemaglutinina) permitiendo así su inmunodetección. Esta construcción PalF-HA se denomina PalF500 (Herranz et al., 2005).

En el estudio del perfil de expresión de *palF* en la cepa silvestre bajo la inducción de estrés salino, la expresión apenas varió durante los 15 primeros minutos de inducción,

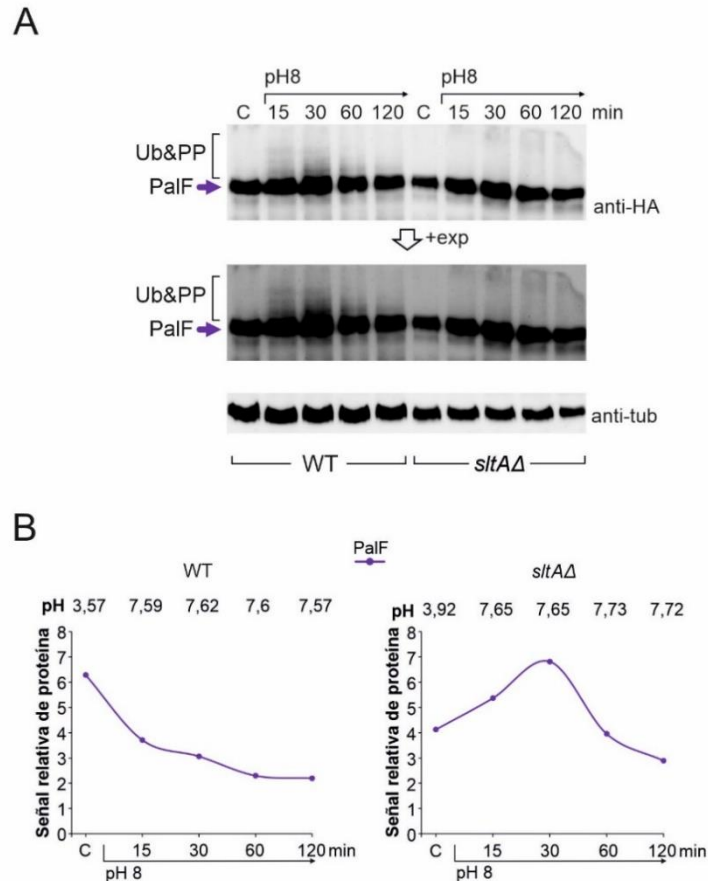
sin embargo, a los 30 minutos se obtuvo una fuerte respuesta con un aumento muy significativo de la expresión (Figura R.3.3.1.A, izquierda). A partir de este punto de expresión máximo los niveles de *palF* descendieron hasta aproximarse al observado en la condición control. Dado que *palF* es un gen que se expresa en condiciones ácidas es posible que este aumento de expresión se deba a la acidificación del medio externo llevada a cabo por el propio hongo durante la incubación del micelio, y en este caso la condición de estrés por adición de 1M NaCl no alteró el pH del medio de cultivo manteniendo la condición de acidez que propicia la expresión de *palF*. Esta misma condición de salinidad no generó una respuesta transcriptómica en ausencia de SltA (Figura R.3.3.1.A, derecha) y la expresión de *palF* permanece casi invariable a lo largo de los 120 minutos estudiados.



**Figura R.3.3.1.** Estudio del efecto de *sltAΔ* en la regulación de PalF. **A-B)** Perfiles de expresión relativa de *palF* obtenidos por qPCR a partir de extractos de cDNA de una cepa silvestre (MAD3652) y de una cepa *sltAΔ* (MAD3816) en la condición sin estrés ambiental (C), y **A)** en condiciones de estrés por 1 M NaCl (Na<sup>+</sup>), y **B)** por alcalinización del medio de cultivo (pH 8, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) durante 15, 30, 60 y 120 minutos de inducción de las condiciones de estrés. Los niveles de expresión relativa del gen *palF* se obtuvieron usando como referencia los niveles de expresión del gen de referencia  $\beta$ -tubulina (*AN1182/benA*). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas experimentales para cada muestra. Los asteriscos representan el nivel de significación del valor-P: P $\leq$ 0,05(\*); P $\leq$ 0,01(\*\*); P $\leq$ 0,001(\*\*\*) ; P $\leq$ 0,0001(\*\*\*\*).

El análisis de expresión de *palF* en la cepa silvestre al incrementar el pH del medio de cultivo (Figura R.3.3.1.B, izquierda) fue disminuyendo entre los 15 y 60 minutos analizados, a partir de los cuales el nivel de expresión de *palF* quedó estabilizado. En

cambio, la expresión de *palF* en la cepa mutante *sltAΔ* a pH 8 mostraba algunas alteraciones que se observaron tanto a los 15 como a los 30 minutos con un ligero aumento de expresión no estadísticamente significativo (Figura R.3.3.1.B, derecha), y el descenso de los niveles de *palF* tanto a los 60 minutos como a los 120 minutos de alcalinidad no alcanzaron los bajos niveles detectados en la cepa silvestre en los mismos tiempos estudiados.



**Figura R.3.3.2.** Estudio del efecto de *sltAΔ* en la regulación de PalF. **A)** Inmunodetección de la forma primaria PalF fusionado a tres copias de HA (anti-HA) en extractos de proteína total de ensayos de estrés por pH 8 en las cepas silvestre (WT, MAD7627) y *sltAΔ* (MAD7630). Aumento de la exposición (+exp) para la detección de las formas PalF modificadas post-traduccionales (Ub&PP) (**A**, panel central). **B)** Cuantificación de señal de proteína relativa de PalF con respecto a la señal del control de carga de proteína,  $\alpha$ -tubulina (anti-tub).

A partir de los resultados transcriptómicos se decidió analizar los niveles de proteína PalF y de sus formas modificadas post-traduccionales a pH alcalino. En la figura R.3.3.2.A se muestra la detección de la forma primaria de PalF, así como las formas modificadas por procesos de ubiquitinación y fosforilación (indicadas como Ub&PP) de menor movilidad electroforética. Para mejorar la detección de estas formas modificadas se incrementó el tiempo de exposición de la membrana (Figura R.3.3.2.A, imagen media, “+exp”). Como en la inmunodetección de PacC900, se ha medido la señal relativa de proteína PalF500 en cada cepa en condiciones sin estrés y de estrés por alcalinidad

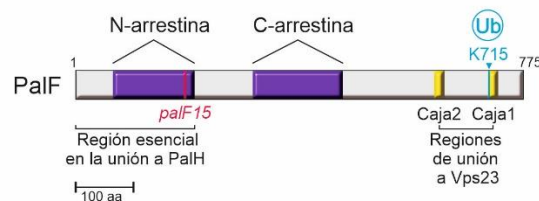
ambiental usando la  $\alpha$ -tubulina como control de carga. En la cepa silvestre se detectó únicamente la forma primaria PalF a pH ácido y la alcalinización del medio provocó la aparición de las formas modificadas durante los primeros 30 minutos de estrés por pH 8 (Figura R.3.3.2.A, izquierda). Los tiempos analizados de 60 y 120 minutos mostraron una disminución progresiva de la señal de estas formas modificadas. En la figura R.3.3.2.B (izquierda) se observó que la señal de PalF fue máxima en ausencia de estrés y, al igual que sucedía en el perfil de expresión de *palF*, los niveles de proteína disminuyeron durante 60 minutos a pH 8 y posteriormente se estabilizaron. En ausencia de SlfA se detectó la forma primaria de PalF tanto en la condición control como a pH 8 en todos los tiempos estudiados (Figura R.3.3.2.A). Sin embargo, no se detectaron las formas de menor movilidad electroforética correspondientes a las formas modificadas de PalF en ninguno de los puntos estudiados a pH 8, y el aumento del tiempo de exposición en la inmunodetección no mejoró la detección de estas formas. Al evaluar la señal relativa de proteína PalF (Figura R.3.3.2.B, derecha) se observó un perfil de señal similar al obtenido en el análisis de expresión, y en este caso los niveles de proteína PalF aumentaron en condiciones de alcalinidad durante los primeros 30 minutos analizados y posteriormente descendieron, aunque en menor medida que lo observado previamente en la cepa silvestre tras 60 y 120 minutos a pH 8.

La ausencia de SlfA modificó tanto los niveles de transcrito como de proteína PalF, en especial a las formas modificadas post-traduccionalmente en condiciones de alcalinidad. Dado que se ha demostrado que las formas modificadas de PalF están implicadas en el reclutamiento de Vps23 (Herrador et al., 2010; Hervás-Aguilar, Galindo, et al., 2010), es posible que la alteración de los niveles de estas formas modificadas pueda estar disminuyendo la eficiencia del proceso de señalización de PacC<sup>72kDa</sup> ya que el reclutamiento de proteínas Pal y elementos de los complejos ESCRT aguas abajo de PalF podría ser inadecuado.

### 3.4. Señalización de la ruta Pal a pH alcalino: localización subcelular de Vps23

La proteína PalF es esencial en el correcto funcionamiento de la ruta Pal en la señalización y procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> ya que es un nexo entre las proteínas de membrana PalH y PalI con el resto de los elementos que participan en la ruta de señalización (Herranz et al., 2005). PalF contiene dos dominios arrestina: el dominio C-arrestina y N-arrestina. El dominio N-arrestina de PalF forma parte de la región de unión a PalH en condiciones de alcalinidad (Herranz et al., 2005) (Figura R.3.4.1) que permite

la señalización de PalF que da lugar a las formas modificadas por ubiquitinación y fosforilación. Un sitio altamente probable de ubiquitinación es la lisina en el aminoácido 715 (K715) como sucede en su homólogo Rim8 en *S. cerevisiae* en el aminoácido K521, 12 posiciones previas al motivo SxP. En *A. nidulans* estos motivos SxP se han descrito en dos regiones (Figura R.3.4.1, Cajas 1 y 2) que son reconocidas por Vps23 cuando PalF se encuentra modificado post-traduccionalmente (Herrador et al., 2010). La proteína Vps23 forma parte del complejo ESCRT-I y se localiza principalmente dispersa en el citoplasma en condiciones de pH ácido mientras que la alcalinización del medio extracelular da lugar a acumulaciones de Vps23 en puntos concretos a lo largo de la membrana como resultado de su unión a la proteína PalF (Galindo et al., 2012). Esta interacción permite el reclutamiento del resto de elementos de los complejos ESCRT-II y ESCRT-III entre los que se encuentra Vps32 que recluta al resto de elementos Pal.

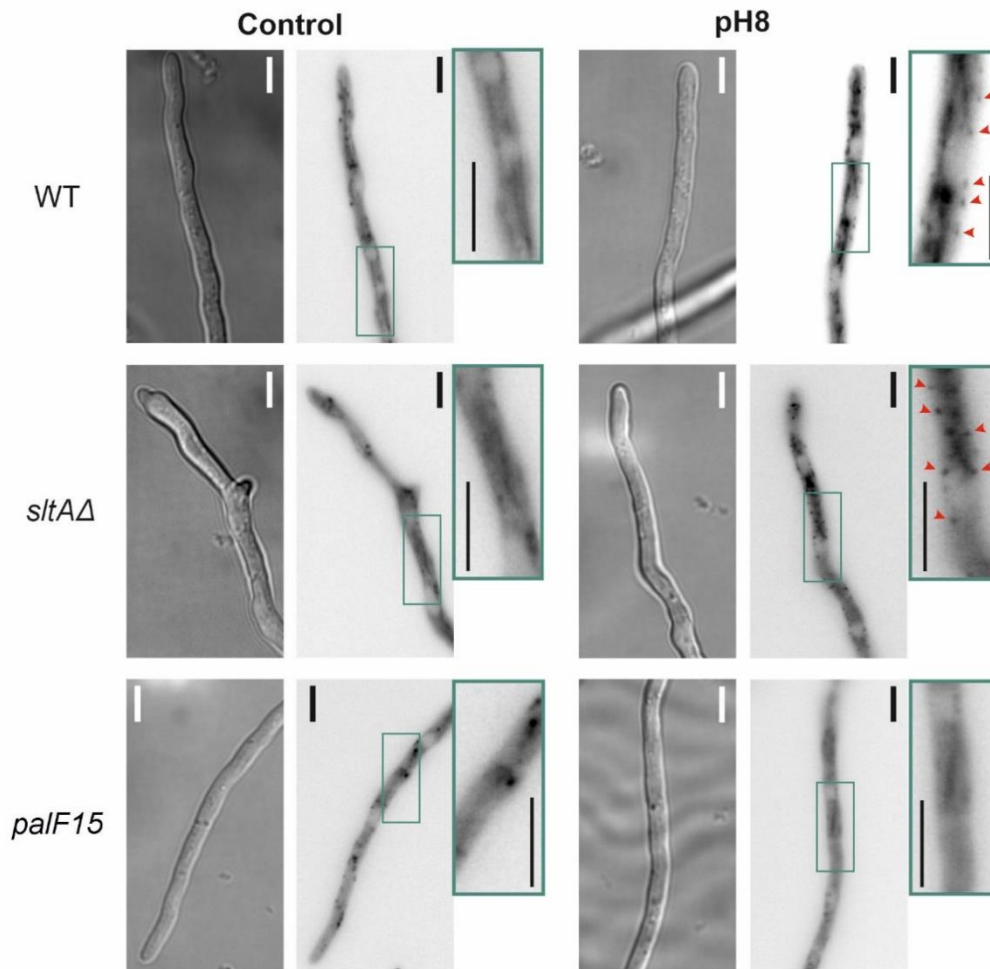


**Figura R.3.4.1.** Dominios funcionales de PalF. Representación de los dominios arrestina de PalF (morado), las regiones de unión a Vps23 (cajas amarillas) y el probable sitio de ubiquitinación de PalF (indicado en azul).

En ausencia de *SlmA*, como hemos observado en los resultados descritos en este capítulo, tanto el patrón de modificaciones post-traduccionales de PacC como de PalF se han visto alterados en condiciones de alcalinidad. Puesto que la forma ubiquitinada de PalF a pH alcalino no se ha detectado en el mutante *sltAΔ*, siendo esencial en el reclutamiento de Vps23, generamos mediante transformación una cepa silvestre y una cepa *sltAΔ* (MAD7669 y MAD7670) con una fusión de Vps23 a GFP (Vps23-GFP) para estudiar la localización de Vps23 en condiciones de alcalinidad usando microscopía de fluorescencia. En el estudio de localización de Vps23 se incluyó la cepa mutante MAD3369 la cual presenta un truncamiento temprano en PalF (*palF15*) (Figura R.3.4.1) que evita la correcta localización de Vps23 a pH 8.

En la cepa silvestre (WT) se observó Vps23-GFP distribuido por el citoplasma de la hifa con algunas acumulaciones que pueden corresponderse con otras funciones del tráfico intracelular en las que están implicados los componentes de los complejos ESCRT como el propio Vps23 (Figura R.3.4.2, WT, Control). La alcalinización del medio de cultivo

generó un aumento de la fluorescencia general en el citoplasma además de la aparición de puntos estáticos en la membrana plasmática.



**Figura R.3.4.2.** Localización subcelular de Vps23 a pH alcalino (pH 8). Detección de Vps23-GFP mediante microscopía de fluorescencia en una cepa silvestre (WT, MAD7669), y en los mutantes *sltAΔ* (MAD7670) y *palF15* (mutación indicada en rosa) (MAD3369), en condiciones de pH ácido (pH <5) y tratadas con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8). Las puntas de flecha rojas indican algunos de los puntos localizados de Vps23 a pH 8. En la detección de Vps23-GFP se usó una exposición de 300-400 ms y se tomaron 47 imágenes en el eje Z que se apilaron aplicando en una proyección sumatoria ("Sum projection"). Las barras representan 5 μm.

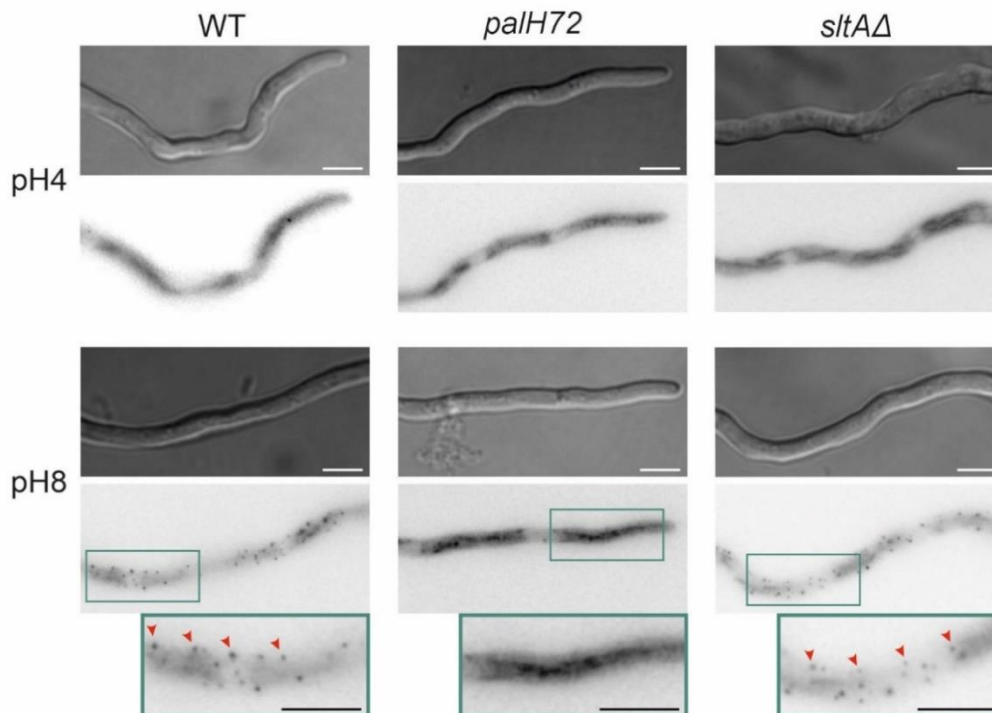
En ausencia de SltA (*sltAΔ*) la morfología de las hifas se encontraba alterada y, el crecimiento de éstas fue irregular. A pH ácido Vps23-GFP se localizaba en el citoplasma al igual que lo observado en la cepa silvestre y el aumento del pH en el medio de cultivo dio lugar al cambio de localización de Vps23 a puntos concretos de la membrana plasmática, que se detectaron con mayor claridad que en la cepa silvestre (Figura R.3.4.2, *sltAΔ*). De modo que el bajo nivel de formas modificadas de PalF en ausencia de SltA (Figura R.3.3) aparentemente es suficiente para la correcta localización de Vps23.

Por último, la cepa *palF15* que resulta en una proteína PalF truncada y no funcional muestra la esperada localización citoplasmática de Vps23 en ausencia de estrés, mientras que a pH 8 no se detectaron las acumulaciones de Vps23 observadas en la cepa silvestre o en la cepa mutante *sltAΔ*.

Estos resultados reflejan que pese a la alteración del patrón de modificaciones post-traduccionales de PacC y PalF en condiciones de alcalinidad, la baja proporción de formas modificadas de PalF con respecto a la proporción de la forma primaria es suficiente para la correcta localización de la proteína Vps23 del complejo ESCRT-I a zonas concretas de la membrana en un fondo nulo *sltA* a pH 8. Es posible que las alteraciones en el sistema Pal estén aguas abajo de Vps23, sin embargo, elementos esenciales como la proteína del complejo ESCRT-III, Vps32, que recluta a PalC no puede etiquetarse para su detección ya que pierde su funcionalidad (Hervás-Aguilar et al., 2010b). Es posible que, aunque la localización de Vps23 sea correcta en ausencia de *SlTA* a pH 8, las alteraciones en el patrón de procesamiento de PacC se deban a una ineficiencia del proceso de la ruta Pal por los bajos niveles de PalF ubiquitinado. El aumento de los niveles de *pacC* o *palF* podría solventar estas alteraciones en la cepa nula *sltA* si diese lugar a mayores niveles de proteína.

### 3.5. Efecto de la delección de *sltA* en la localización celular de PalA

En los últimos pasos de la ruta de señalización de PacC, tras el reclutamiento de algunos elementos de los complejos ESCRT (e.g. Vps23 y Vps32), PalC y posteriormente PalA se localizan también en puntos concretos de la membrana a valores de pH ambiental alcalinos (Galindo et al., 2007). La proteína PalA es incorporada a estos sitios de forma dependiente de PalC (Galindo et al., 2012) y su función consiste en interactuar con la forma primaria  $\text{PacC}^{72\text{kDa}}$  a través de su unión a las dos regiones que contienen los motivos YPx[L/I] (Vincent et al., 2003). Puesto que el reclutamiento de Vps23 aparentemente es correcto en un fondo nulo *sltA*, y dado que el etiquetado de Vps32 para su detección provoca una pérdida de función en esta proteína esencial, hemos procedido al estudio de la fusión PalA-GFP como elemento final del complejo señalizador de PacC para determinar si se mantiene su localización subcelular prevista a pH alcalino incluso en ausencia de función *SlTA*. En la figura R.3.5 se muestra la localización celular de PalA-GFP en ausencia de estrés y a pH 8 en una cepa silvestre, y en los mutantes *sltAΔ* y *palH72*. En el fondo mutante *palH72* no hay señalización ni



**Figura R.3.5.** Localización subcelular de PalA a pH alcalino (pH 8). Detección de PalA-GFP mediante microscopía de fluorescencia en una cepa silvestre (WT, MAD2234), y en los mutantes *sltAΔ* (MAD8032) y *palH72* (MAD2221), en condiciones de pH ácido (pH <5) y tratadas con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8). Las puntas de flecha rojas indican algunos de los puntos localizados de PalA a pH 8. Representación de una máxima proyección ("Max projection") de un apilamiento de 13 imágenes en el eje Z, aplicando una exposición de 400 ms. Las barras representan 5 μm.

procesamiento de PacC a pH alcalino (Galindo et al., 2012). En ausencia de estrés, la localización de PalA fue citoplasmática en las tres cepas estudiadas. Al alcalinizar el medio en la cepa silvestre se observó la acumulación de señal fluorescente en múltiples puntos a lo largo de la membrana plasmática, mientras que en la cepa *palH72* la localización de PalA no presentaba variación respecto a la observada en la condición sin estrés. En el mutante *sltAΔ* se detectó a PalA-GFP a lo largo de la membrana plasmática de manera similar a la localización observada en la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos con las formas etiquetadas de Vps23 y PalA nos indican claramente que el reclutamiento de los complejos ESCRT, así como de PalA (y por extensión PalC), se realizan correctamente en un fondo nulo *sltA*, a pesar de los bajos niveles de las formas modificadas postraduccionalmente de PalF y que han sido postuladas como necesarias para la funcionalidad de la ruta Pal.

## Capítulo 4. Estableciendo la relación entre SltA y el regulador negativo PacX

La señalización de la proteína PacC<sup>72kDa</sup> a través de la ruta Pal tiene lugar en condiciones de alcalinidad ambiental y sus modificaciones post-traduccionales dan lugar a la forma activa PacC<sup>27kDa</sup> con una función dual, positiva y negativa, sobre un número indeterminado de genes. Inicialmente se le atribuyó a PacC<sup>27kDa</sup> una función positiva sobre la propia expresión de *pacC* en condiciones de alcalinidad (Tilburn et al., 1995). Sin embargo, Bussink y colaboradores (Bussink et al., 2015) mostraron que en realidad este incremento de los niveles de expresión del gen *pacC* se debía a un fenómeno de desrepresión causado por la degradación de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup>. En este mismo trabajo se identificó un nuevo elemento en el sistema Pal/PacC que actúa como regulador negativo de la expresión de *pacC*. PacX es una proteína que contiene un dominio de unión a DNA de tipo Zn2C6 (“zinc binuclear cluster”) por lo que ha sido clasificado como factor transcripcional. Un aspecto interesante es que los posibles homólogos de PacX se encuentran únicamente codificados en genomas de hongos Leotiomycetes frente a la más amplia distribución filogenética de PacC y sus homólogos en levaduras, RIM101. Las mutaciones en el gen *pacX* que dan lugar a truncamientos tempranos generan proteínas con una pérdida total de función similar a una delección. La mutación *pacX20* es un ejemplo, dado que causa un truncamiento en el aminoácido 44. La ausencia de función PacX da lugar, por un lado, a un fenotipo similar a una cepa silvestre y es capaz de responder a condiciones de estrés ambiental, y por otra causa elevados niveles de transcrito *pacC* así como de proteína (Bussink et al., 2015).

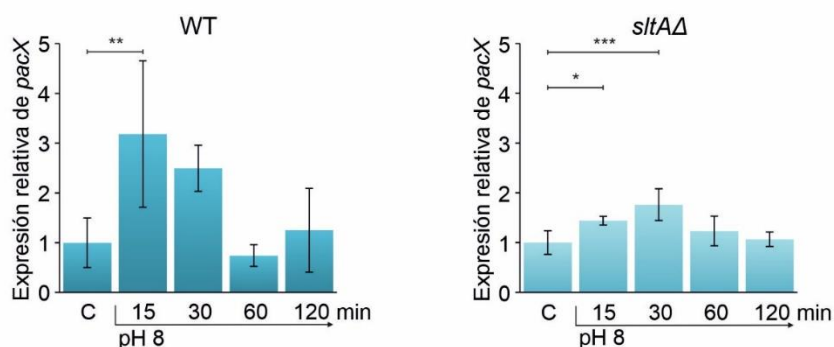
Mediante el uso de la técnica de PCR cuantitativa hemos estudiado el perfil de expresión de *pacX* en más detalle y así, determinar si los niveles de expresión de *pacX* están regulados por el pH ambiental. Por otro lado, planteamos combinar la mutación de pérdida de función de PacX (*pacX20*) con la delección de *sltA* para determinar si el funcionamiento del sistema *pal/pacC* queda corregido tanto a nivel transcripcional como traduccional en condiciones de pH alcalino. Por último, se ha ampliado el estudio sobre la localización subcelular de PacX incluyendo el efecto del pH alcalino a diferentes tiempos de inducción tanto en una cepa silvestre como en un mutante *sltAΔ*.

#### 4.1. Estudio de los niveles de expresión de *pacX* en condiciones de estrés y su dependencia de SltA.

El análisis del perfil de expresión de *pacX* se llevó a cabo realizando el ensayo de estrés por alcalinidad en cultivos de una cepa silvestre (MAD3652) y una mutante *sltAΔ* (MAD3816) para la obtención de las muestras de RNA y posteriormente de cDNA como se ha detallado en capítulos anteriores y en Materiales y Métodos (apartados 2,5 y 7). Los cebadores diseñados para la qPCR amplifican un fragmento de *pacX* de 250 pb.

En los datos de RNAseq la variación de los niveles de expresión de *pacX* fueron no significativos en las comparaciones realizadas (ver código de gen *AN0766* en enlace del Anexo disponible en la sección 2.1 del Capítulo Resultados). En el perfil transcriptómico de la cepa silvestre (Figura R.4.1, izquierda) se observó que, efectivamente, los niveles de expresión tras 60 minutos en condiciones de alcalinidad fueron similares a los observados en ausencia de estrés (control, C), como mostraban los resultados del RNAseq. No obstante, se detectó un pico de expresión a los 15 minutos de inducción de pH 8 a partir del cual los niveles de *pacX* fueron descendiendo hasta aproximarse al nivel de expresión previo a la condición de estrés. Al ser un cambio de expresión temprano, estos cambios no se han detectado en el RNAseq.

En ausencia de SltA (Figura R.4.1, derecha) los niveles de expresión de *pacX* aumentaron en menor medida que en la cepa silvestre tras 15 y 30 minutos a pH 8. El punto de máxima expresión quedó desplazado a los 30 minutos de la condición de alcalinidad a partir de los cuales los niveles de expresión retornaron a los observados en el control.

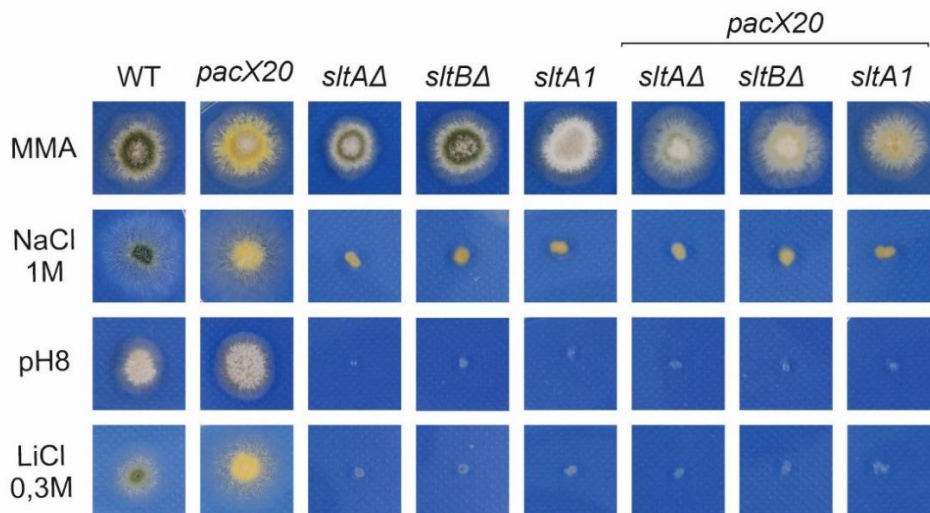


**Figura R.4.1.** Expresión transcripcional de *pacX*. Niveles de expresión relativa del gen *pacX* con respecto a los niveles de expresión del gen de referencia  $\beta$ -tubulina (*AN1182/benA*). Análisis de extractos de cDNA de una cepa silvestre (MAD3652) y de una cepa *sltAΔ* (MAD3816) en la condición sin estrés ambiental (C) y tratadas con 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) durante 15, 30, 60 y 120 minutos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas experimentales para cada muestra. Los asteriscos representan el nivel de significación del valor-P:  $P \leq 0,05$  (\*);  $P \leq 0,01$  (\*\*);  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) ;  $P \leq 0,0001$  (\*\*\*\*).

Aunque aparentemente se ha observado una variación en los niveles de expresión relativos a la condición sin estrés que podría entenderse como una regulación de expresión dependiente de pH, los valores de expresión relativos respecto al gen de referencia *benA* son muy bajos, por lo que no tenemos evidencia suficiente para determinar si estas pequeñas variaciones durante los 30 minutos iniciales de estrés representan una expresión dependiente de la señal de alcalinidad.

#### 4.2. Relación genética entre *sltA* y *pacX*. Estudio fenotípico de las cepas doble mutantes *slt*<sup>-</sup> *pacX20*

La mutación *pacX20* provoca un truncamiento temprano (PacX1-44) generando, por lo tanto, una proteína no funcional y un fenotipo similar a un *pacXΔ*, suprimiendo ciertos fenotipos de falta de función leve de PacC (Bussink et al., 2015). Usamos este mutante *pacX20* (MAD1652) como cepa parental en varios cruces con cepas que portan mutaciones en los genes que conforman el sistema Slt: *sltAΔ* (MAD3816), *sltBΔ* (MAD3693) y *sltA1* (MAD1132). De entre la progenie se identificaron aquellas cepas recombinantes portadoras de las mutaciones *pacX20* y la mutación correspondiente en el sistema *Slt* para estudiar tanto posibles cambios en el fenotipo como los niveles de expresión y los patrones de procesamiento de PacC y PalF.



**Figura R.4.2.** Análisis fenotípico de mutantes *slt* y *pacX20*. Conidiosporas de las diferentes cepas mutantes inoculadas en placas de MMA incluyendo diferentes compuestos indicados en el lado izquierdo del panel. Las imágenes fueron tomadas tras una incubación a 37°C durante 48 h. Cepas usadas: silvestre (WT, MAD6669), *pacX20* (MAD1652), *sltAΔ* (MAD3816), *sltBΔ* (MAD3693), *sltA1* (MAD1132), y dobles mutantes *pacX20* y cada una de las mutaciones *slt* respectivamente (MAD7621, MAD7623 y MAD7622).

En la figura R.4.2 se muestran los efectos del estrés por alta concentración de cationes sodio (1 M NaCl) y litio (0,3 M LiCl) y por alcalinización del pH ambiental (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) sobre el crecimiento colonial de una cepa silvestre (MAD6669), los mutantes simples *pacX20*, *sltAΔ*, *sltBΔ*, *sltA1* y de los dobles mutantes *pacX20 slt*. Tanto la cepa silvestre como el mutante *pacX20* fueron capaces de crecer en todas las condiciones estudiadas y en la mayoría de estas condiciones también se observó capacidad de conidiación. La cepa portadora del alelo *pacX20* mostró un fenotipo más próximo a la cepa silvestre frente al esperado fenotipo de alta sensibilidad de los mutantes simples *sltAΔ*, *sltBΔ* y *sltA1* al estrés causado por elevadas concentraciones de los cationes sodio (1 M NaCl) y litio (0,3 M LiCl) y al pH ambiental alcalino (pH 8).

Los dobles mutantes presentaron un crecimiento colonial en ausencia de estrés similar a las cepas parentales y silvestre, aunque se observó una menor capacidad de conidiación o un desarrollo más lento en el tiempo de incubación habitual. Sin embargo, en condiciones de estrés se observó un efecto epistático de las mutaciones *slt* sobre la mutación *pacX20* ya que todos los dobles mutantes mostraron una alta sensibilidad a todas las condiciones de estrés ambiental analizadas (Figura R.4.2).

#### 4.3. Efecto de *pacX20* sobre los niveles de expresión de *sltA*, *pacC* y *palF*

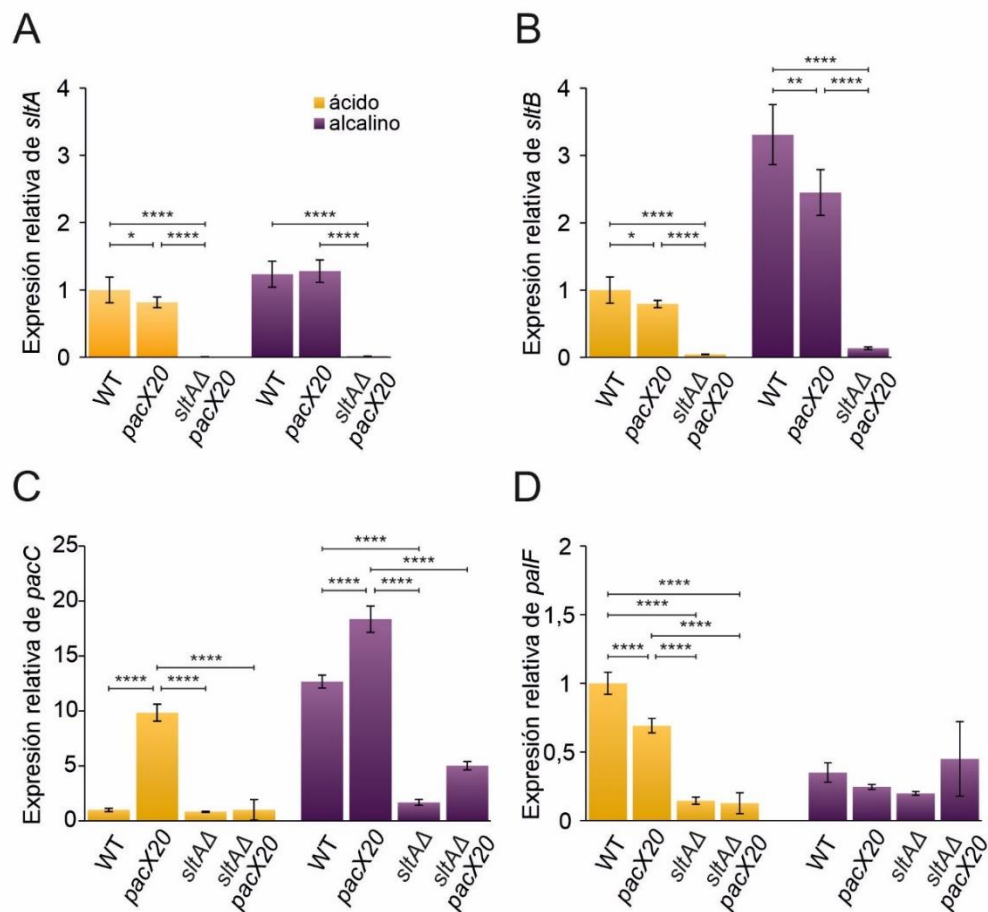
Hasta el momento se ha analizado el efecto de la mutación *pacX20* sobre los niveles del transcrito de *pacC* usando solamente la técnica de “Northern blot” (Bussink et al., 2015). En esta sección hemos cuantificado mediante qPCR el efecto de la mutación *pacX20* sobre los niveles de expresión de los genes *palF*, *pacC*, *sltA* y *sltB*, y por otro lado el efecto combinatorio de las mutaciones *pacX20* y *sltAΔ*. En el análisis transcriptómico se analizaron los niveles de expresión de los genes anteriores en condiciones estándar y tras 60 minutos de inducción de pH alcalino, siguiendo el protocolo experimental detallado en Materiales y Métodos (apartados 1 y 2).

La expresión de *sltA* en la cepa mutante *pacX20* (MAD7624) se mantuvo con unos niveles similares a los observados en la cepa silvestre (WT) tanto en condiciones de pH ácido como tras 60 minutos en medio de cultivo alcalino (Figura R.4.3.A).

En el estudio de los niveles de expresión del gen *sltB* (Figura R.4.3.B) se detectó una variación mínima de la expresión de este gen en ausencia de estrés al comparar las cepas silvestre y *pacX20*, y al incrementar el pH ambiental se observó un descenso leve, pero significativo, de los niveles de expresión entre estas cepas. Al ser la expresión de

*sltB* dependiente de la actividad de SltA, en el doble mutante *pacX20 sltAΔ* (MAD7621) apenas se detectó transcrito *sltB* en ambas condiciones de pH.

En las figuras R.4.3.C y D se muestran los niveles de expresión de *pacC* y *palF* respectivamente, incluyendo además el mutante simple *sltAΔ*. En condiciones de acidez ambiental, los niveles de expresión de *pacC* fueron bajos en todas las cepas a excepción del mutante simple *pacX20* (Figura R.4.3.C) en el que se observó un nivel de expresión 10 veces superior al observado en el silvestre (WT). A pH alcalino los niveles de expresión de *pacC* aumentaron notablemente en las cepas silvestre y *pacX20*, mientras que en el mutante simple *sltAΔ* estos niveles apenas se elevaron en respuesta al pH y, en la cepa doble mutante (*sltAΔ pacX20*) el nivel de expresión relativa de *pacC* es significativamente menor que en el mutante simple *pacX20*.



**Figura R.4.3.** Efectos de la alcalinización ambiental y las mutaciones *pacX20* y *sltAΔ*. Niveles de expresión relativa de los genes **A)** *sltA*, **B)** *sltB*, **C)** *pacC* y **D)** *palF* con respecto a los niveles de expresión del gen de referencia  $\beta$ -tubulina (*AN1182/benA*). Cepas cultivadas en MMA (pH ácido, indicado en amarillo) y tratadas después con 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH alcalino, indicado en morado) durante 60 minutos. Cepas usadas referenciadas en figura 4.2. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas experimentales para cada muestra. Los asteriscos indican el nivel de significación del valor-P: P ≤ 0,05(\*); P ≤ 0,01(\*\*); P ≤ 0,001 (\*\*\*) ; P ≤ 0,0001 (\*\*\*\*).

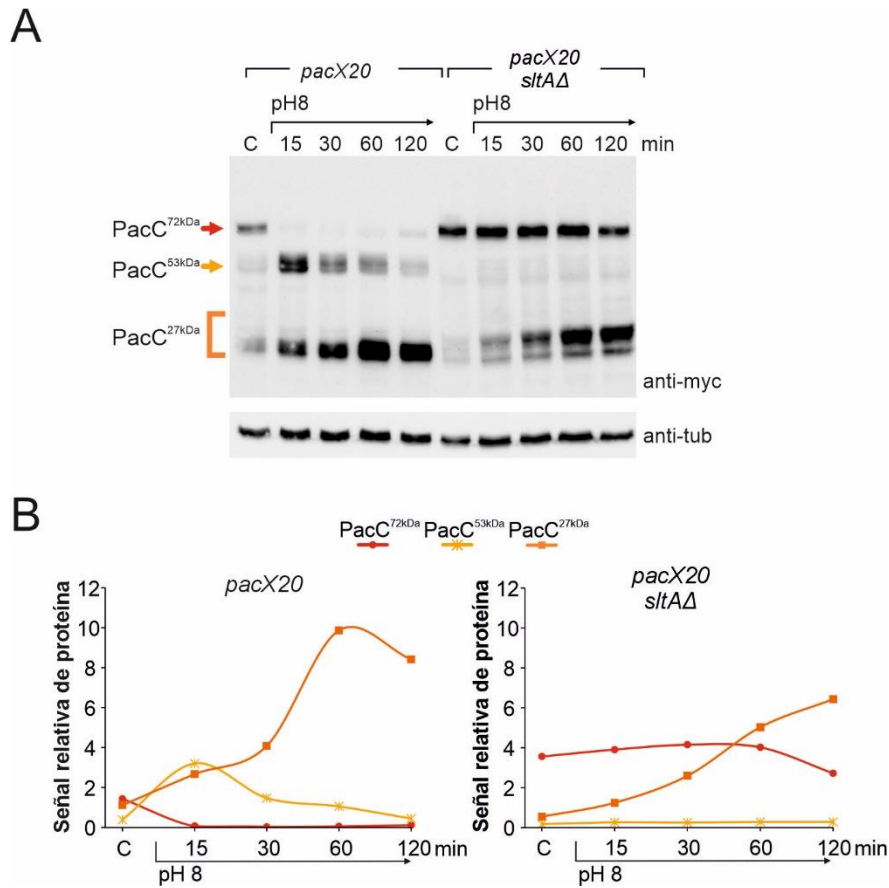
El gen *palF*, que incrementa su expresión en condiciones de pH ambiental ácido (Bussink et al., 2015), mostró el máximo nivel de expresión en la condición sin estrés en la cepa silvestre (Figura R.4.3.D) seguido del mutante simple *pacX20*. El efecto de la mutación *sltAΔ* fue altamente significativo ya que los niveles de expresión de *palF* fueron mínimos a pH ácido en las dos cepas analizadas que portan la delección del gen *sltA*. En condiciones de alcalinidad, tanto en la cepa silvestre como en el mutante simple *pacX20* presentaban un descenso de la expresión, en consonancia con la regulación de la expresión de *palF* dependiente del nivel de acidificación del pH ambiental, mientras que en el mutante simple *sltAΔ* estos niveles se mantuvieron invariables con respecto a lo observado en ausencia de estrés. La combinación de los alelos mutantes *pacX20* y *sltAΔ* propició una desregulación aún mayor observándose un aumento de la expresión de *palF* a pH 8.

Por tanto, a nivel transcripcional, la ausencia de función PacX obtenida mediante la mutación *pacX20* eleva los niveles de expresión de *pacC* en ambas condiciones de pH estudiadas y afecta en menor medida a los niveles de expresión de *palF*, *sltA* y *sltB*. Sin embargo, el efecto de esta mutación en PacX no es capaz de recuperar los perfiles de expresión de los genes *pacC* y *palF* en ausencia de función SltA, y este efecto puede ser extensivo a nivel de traducción.

#### 4.4. Niveles de proteína PacC y PalF en mutantes *pacX20*

Los niveles de expresión de *pacC* en un mutante *pacX20 sltAΔ* se mantienen bajos a pH alcalino, aunque hemos observado un leve aumento del nivel de expresión de *pacC* con respecto al mutante simple *sltAΔ*, que podría ser suficiente para recuperar el correcto patrón de procesamiento de la proteína PacC. Para ello se prepararon dos cepas: una cepa mutante *pacX20* (MAD7628) y un doble mutante *pacX20 sltAΔ* (MAD7629) que portan además los alelos *pacC900* y *palF500* permitiendo así la inmunodetección de las diferentes formas proteicas de PacC y PalF. Se prepararon ensayos de alcalinidad para ambas cepas con el fin de obtener extractos de proteína total (ver Materiales y Métodos y Capítulo 3 de Resultados), a partir de los cuales analizar por inmunodetección los niveles de PacC y PalF.

La figura R.4.4.A muestra los patrones de procesamiento de PacC a pH alcalino en el fondo *pacX20* simple y doble mutante *sltAΔ*. Las formas de PacC observadas en la cepa *pacX20* coinciden con las descritas en la cepa silvestre (Bussink et al., 2015) (Figura R.3.2.A). En el caso del doble mutante *pacX20 sltAΔ*, el patrón coincide con el



**Figura R.4.4.1.** Efecto de la mutación *pacX20* en la señalización y procesamiento de PacC. **A)** Inmunodetección de las formas PacC<sup>72kDa</sup>, PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> en extractos de proteína total de cultivos crecidos en medio mínimo (MMA) en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8) durante 15, 30, 60 y 120 minutos en una cepa *pacX20* (MAD7628) y en una cepa *pacX20 sltAΔ* (MAD7629). **B)** Cuantificación de señal de proteína relativa de las formas PacC con respecto a la señal del control de carga de proteína,  $\alpha$ -tubulina (anti-tub).

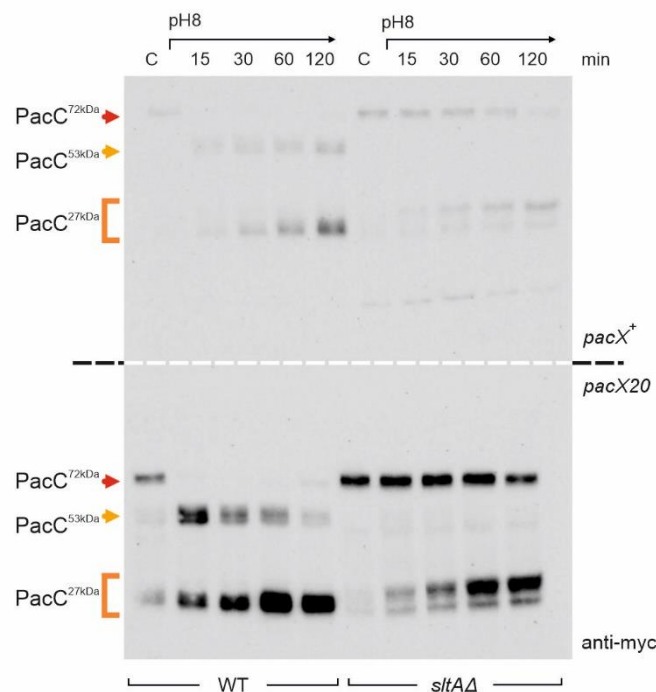
observado en el mutante simple *sltAΔ* (comparar figura R.4.4.1.A y R.3.2.A, ver también figura R.4.4.2). La elevación en los niveles de PacC observados en el fondo *pacX20* se observaron también en el fondo doble mutante *pacX20 sltAΔ* (Figura R.4.4.2).

Al medir la señal relativa de proteína (Figura R.4.4.1.B, izquierda) se detectó este aumento en los niveles de las formas PacC en comparación con la cantidad de señal relativa de proteína detectada en la cepa silvestre (Figura R.3.2.A). En la cepa *pacX20*, PacC<sup>72kDa</sup> presentaba una mayor señal relativa en ausencia de estrés, la cual descendió a pH 8 en favor de la acumulación de las formas procesadas PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup>. La forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> se acumuló principalmente tras 15 minutos de inducción de alcalinidad extracelular, a partir de los cuales su señal fue descendiendo a medida que se acumulaba la forma totalmente procesada de 27kDa. La forma totalmente procesada PacC<sup>27kDa</sup> presentó un perfil de acumulación creciente durante 60 minutos a pH 8 observándose una pequeña disminución de la señal a los 120 minutos (Figura R.4.4.1.B,

izquierda). Al igual que en la cepa silvestre (Figura R.3.2), las principales formas acumuladas de PacC<sup>27kDa</sup> fueron aquellas con mayor movilidad electroforética.

El aumento de los niveles de proteína PacC en la cepa doble mutante *pacX20 sltAΔ* no causó la recuperación del patrón proteolítico en respuesta a la señal de alcalinidad (Figura R.4.4.1.A, derecha). Al igual que en el mutante simple *sltAΔ* (Figura R.3.2.A), se detectó una acumulación de la forma primaria a lo largo de todo el ensayo de alcalinidad. También se detectó la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> levemente, pero la señal relativa de proteína no refleja un aumento o variación notable entre las diferentes condiciones y tiempos analizados (Figura R.4.4.1. B, derecha). Por último, la señal de la forma procesada PacC<sup>27kDa</sup> también se incrementó progresivamente tras la inducción de pH alcalino, sin embargo, los niveles totales de PacC<sup>27kDa</sup> acumulado tras 120 minutos no alcanzaron el nivel observado en el mutante simple *pacX20* (Figura R.4.4.1.B, derecha), además, al igual que en la cepa *sltAΔ*, la forma PacC<sup>27kDa</sup> de menor movilidad electroforética presentó una mayor acumulación en este doble mutante.

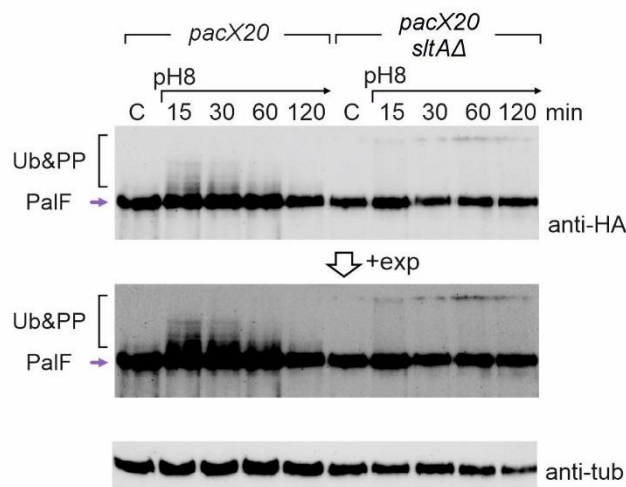
Así, aunque la ausencia de función PacX ha generado un aumento de los niveles de expresión y de proteína PacC, este efecto no compensa las alteraciones observadas en el patrón proteolítico de PacC en un fondo nulo *sltA*.



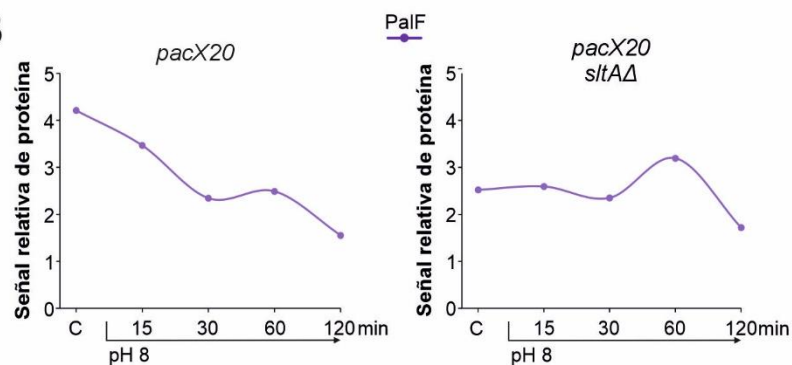
**Figura R.4.4.2.** Efecto de la mutación *pacX20* en la señalización y procesamiento de PacC. Inmunodetección simultánea de formas PacC en las cepas WT, *sltAΔ* (Figura R.3.2), *pacX20* y *pacX20 sltAΔ* en extractos de proteína total de cultivos crecidos en medio mínimo (MMA) en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8) durante 15, 30, 60 y 120 minutos.

Las cepas *pacX20* usadas en la inmunodetección de PacC (*pacC900*) portan también el alelo *palF500*, por lo que se realizó un nuevo “Western blot” para detectar a PalF y sus formas modificadas en las mismas muestras. La cepa mutante *pacX20* presentaba menor señal relativa de forma primaria PalF con respecto a la señal detectada en la cepa silvestre (Figura R.3.3.2) aunque, al igual que en la cepa silvestre, la alcalinización del medio dio lugar a una disminución de la señal de proteína en la cepa *pacX20* y se detectaron las formas modificadas durante los primeros 60 minutos a pH 8 sin necesidad de aumentar el tiempo de exposición de la inmunodetección (Figura R.4.4.3.A y B, izquierda).

A



B



**Figura R.4.4.3.** Efecto de la mutación *pacX20* en la señalización y procesamiento de PalF a pH alcalino. **A)** Inmunodetección de la forma primaria PalF-HA en extractos de proteína total de cultivos crecidos en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) durante 15, 30, 60 y 120 minutos en una cepa *pacX20* (MAD7628) y en una cepa *pacX20 sltAΔ* (MAD7629). **B)** Cuantificación de señal de proteína relativa de las formas PalF con respecto a la señal del control de carga de proteína,  $\alpha$ -tubulina (anti-tub).

La ausencia de SltA y de función PacX (Figura R.4.4.3.A y B, derecha) también resultó en una disminución de los niveles de PalF, como se ha observado en el mutante simple *pacX20* y, en condiciones de alcalinidad, esta señal de proteína apenas varió

exceptuando un leve aumento de señal relativa a los 60 minutos de inducción de alcalinidad. Las formas modificadas post-traduccionales de PalF detectadas en las cepas silvestre (Figura R.3.3.2.A y B) y *pacX20* (Figura R.4.4.3.A y B, izquierda), no fueron detectadas en la cepa doble mutante *pacX20 sltAΔ* en ningún tiempo ensayado y, el aumento del tiempo de exposición de la membrana durante la inmunodetección no mejoró la detección de estas formas, como ocurría en el mutante simple *sltAΔ* (Figura R.3.3.2.A y B, derecha).

De modo que el aumento de los niveles de expresión de *pacC* por la ausencia de función de su regulador negativo PacX no es suficiente para recuperar los patrones de modificación post-traduccional de PacC y PalF en cepas que carezcan del factor transcripcional SltA. Estos resultados sugieren que la función de SltA influye en la ruta de señalización Pal a uno o varios niveles afectando al correcto procesamiento de uno de los principales factores transcripcionales que regulan la respuesta al pH ambiental.

#### 4.5. Niveles de proteína PacX y su localización celular en ausencia de función SltA

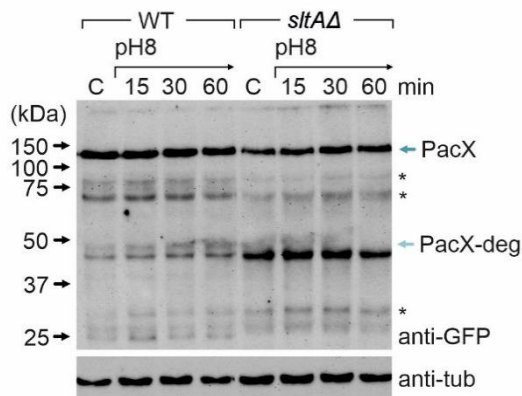
Como ya se ha mencionado a lo largo de este capítulo de resultados y en la introducción, PacX es una proteína que posee un dominio de unión a DNA de dedos de zinc de tipo Zn<sub>2</sub>C<sub>6</sub> y hasta el momento la única función descrita de esta proteína es la de regulador negativo de *pacC* en hongos Leotiomycetes. En trabajos previos las mutaciones en *pacX* se han usado como herramienta para el estudio del sistema Pal/PacC y aún se desconoce si PacX posee otras funciones reguladoras y, si esta proteína reguladora está sometida a alguna modificación post-traduccional para su activación. Además, se ha descrito que su localización es nuclear en una cepa silvestre en ausencia de estrés y en condiciones de alcalinidad tras 60 minutos (Bussink et al., 2015), pero no existen estudios previos en otros mutantes o a otros tiempos experimentales. De acuerdo con el efecto de la ausencia de *sltA* en el perfil transcriptómico de *pacX*, se procedió al análisis de los niveles y localización subcelular de la proteína PacX-GFP tanto en una cepa silvestre como *sltAΔ* en condiciones de alcalinidad.

A partir de una cepa *sltAΔ* (MAD3919) y una cepa *pacX::gfp* (MAD1929) hemos obtenido por cruce progenie doble mutante para el estudio de PacX-GFP en análisis de inmunodetección y de microscopía de fluorescencia. La cepa MAD1929 expresa, además de la construcción PacX-GFP, la histona 1 (HhoA) fusionada en el extremo

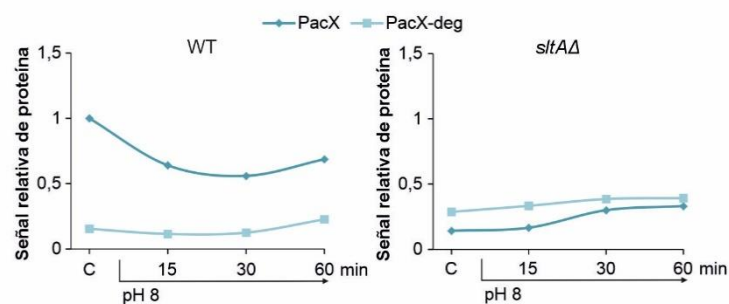
C-terminal con la proteína roja fluorescente monomérica (*hhoA::mrfp*). Este etiquetado permite la visualización de los núcleos en los ensayos de microscopía.

Como en capítulos previos, se realizaron ensayos de alcalinidad usando una cepa silvestre (*pacX::gfp*) y un mutante *sltAΔ* (*pacX::gfp*) para obtener extractos de proteína total tras 15, 30 y 60 minutos de incubación a pH 8 y estudiar por inmunodetección el nivel de proteína PacX-GFP. El peso molecular teórico de PacX silvestre es de aproximadamente 73 kDa y la fusión con GFP resulta en un tamaño teórico aproximado de 100kDa. En la figura R.4.5.1.A se muestra la señal detectada de la quimera PacX-GFP mediante ensayo de inmunodetección. De acuerdo con lo esperado, se detectó una señal elevada con una movilidad electroforética próxima al marcador molecular de 100 kDa. Adicionalmente se detectaron una serie de bandas secundarias de menor intensidad indicadas con asteriscos en la figura R.4.5.1.A y entre las cuales destaca una forma de aproximadamente 45 kDa que puede corresponderse con una forma degradada de la proteína (PacX-deg).

A



B



**Figura R.4.5.1.** Señalización, procesamiento y localización celular de PacX a pH alcalino (pH 8). **A)** Inmunodetección de la forma primaria de PacX-GFP (100 kDa) y de la principal forma degradada (PacX-deg) en extractos de proteína total de cultivos crecidos en medio mínimo (MMA) en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) durante 15, 30, 60 y 120 minutos en una cepa silvestre (WT, MAD1929) y en una cepa *sltAΔ* (MAD7625). **B)** Cuantificación de señal de proteína relativa de las dos principales formas PacX con respecto a la señal del control de carga de proteína,  $\alpha$ -tubulina (anti-tub).

En ambas cepas se ha medido la señal relativa de la forma primaria de 100kDa (indicada como PacX) y la forma PacX de 45kDa (PacX-deg) (Figura R.4.5.B). En la cepa silvestre (WT) la señal de PacX fue mayor en ausencia de estrés, mientras que la condición de estrés por alcalinidad dio lugar a un descenso de la señal durante 30 minutos a partir de los cuales se observó una leve recuperación del nivel de proteína (Figura R.4.5.B, izquierda). El perfil de la forma PacX-deg partía de unos niveles menores que la forma primaria de ~100kDa y, solo se observó una pequeña acumulación de señal transcurridos 60 minutos a pH 8.

En ausencia de SlfA, aunque se detectaron ambas formas de PacX tanto en ausencia de estrés como a pH 8 (Figura R.4.5.1.A, derecha), los niveles de PacX cayeron por debajo del nivel de señal de PacX-deg. Al alcalinizar el medio de cultivo, los niveles de PacX aumentaron levemente tras 30 minutos, pero sin llegar a superar el nivel de la forma degradada, la cual se mantuvo estable a lo largo de todo el tiempo analizado (Figura R.4.5.1.B).

La ausencia del factor transcripcional SlfA genera alteraciones a nivel de proteína en PacX al igual que lo observado en los niveles y formas modificadas de las proteínas PacC y PalF y en los niveles de expresión de los genes correspondientes. Dados estos resultados se evaluó mediante microscopía de fluorescencia la posible existencia de cambios en la localización celular de PacX en una cepa mutante *sltAΔ*.

Usando una cepa silvestre (MAD7626) y una cepa *sltAΔ* (MAD7625) que portan las construcciones *pacX::gfp* y *hhoA::mrfp*, hemos estudiado la localización de PacX, tanto en condiciones de pH ácido como de pH alcalino a los 15 y 120 minutos. Para ello se preparó un cultivo específico para microscopía como se detalla en Materiales y Métodos (apartados 1 y 11) y una vez crecido el micelio, el medio de cultivo se sustituyó por un medio alcalinizado a pH 8 añadiendo 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Las imágenes que se muestran en la figura R.4.5.2.A muestran las hifas mediante óptica de Nomarsky (DIC) y la combinación de las imágenes que detectan los núcleos mediante el etiquetado de la histona 1 con mRFP, canal rojo, y de PacX-GFP, canal verde.

En ausencia de estrés, se observó en ambas cepas a PacX-GFP junto al núcleo y en ocasiones próximo al nucleolo como ya se había descrito previamente en Bussink y colaboradores (Bussink et al., 2015). En la cepa silvestre se observó además que existen algunos núcleos de pequeño tamaño y muy próximos que aparentemente han salido recientemente de una mitosis, donde no se detecta la misma intensidad de fluorescencia de PacX-GFP. Esta variación de intensidad de señal se observó también en el mutante *sltAΔ* y tras el aumento del pH extracelular no se detectaron cambios en



plano en el eje Z se tomaron imágenes de los núcleos (HhoA-mRFP) y de PacX-GFP cada 30 segundos a lo largo de 30 minutos para captar la fase mitótica de los núcleos en una hifa. En la figura R.4.5.2.B se muestra la señal de dos núcleos celulares, con una señal desigual de PacX-GFP, siendo en uno de ellos prácticamente indetectable en los tiempos iniciales. En el núcleo de la región izquierda de las imágenes, se observó como la señal de PacX se desplazó junto a uno de los núcleos hijos durante la anafase. Una vez separados los dos núcleos hijos, PacX se localizaba fluctuando entre ambos núcleos, aparentemente en el citoplasma y finalmente se unió al núcleo hijo de la izquierda en los tiempos finales, mientras que el otro núcleo hijo resultante generó *de novo* proteína PacX-GFP a lo largo del tiempo de análisis.

Por otro lado, el núcleo que apenas contenía señal PacX-GFP situado en la región derecha de las imágenes en los tiempos iniciales del análisis, presentó una baja señal durante la anafase mitótica. Tras la separación de los núcleos hijos la señal fue detectada solo en uno de estos núcleos a lo largo del tiempo estudiado.

## Capítulo 5. Rescate del correcto procesamiento de PacC

### 5.1. Estudio del efecto de formas mutantes SltA (*sltBΔ* SltA<sup>78kDa</sup>, *sltA1*, *sltA60*)

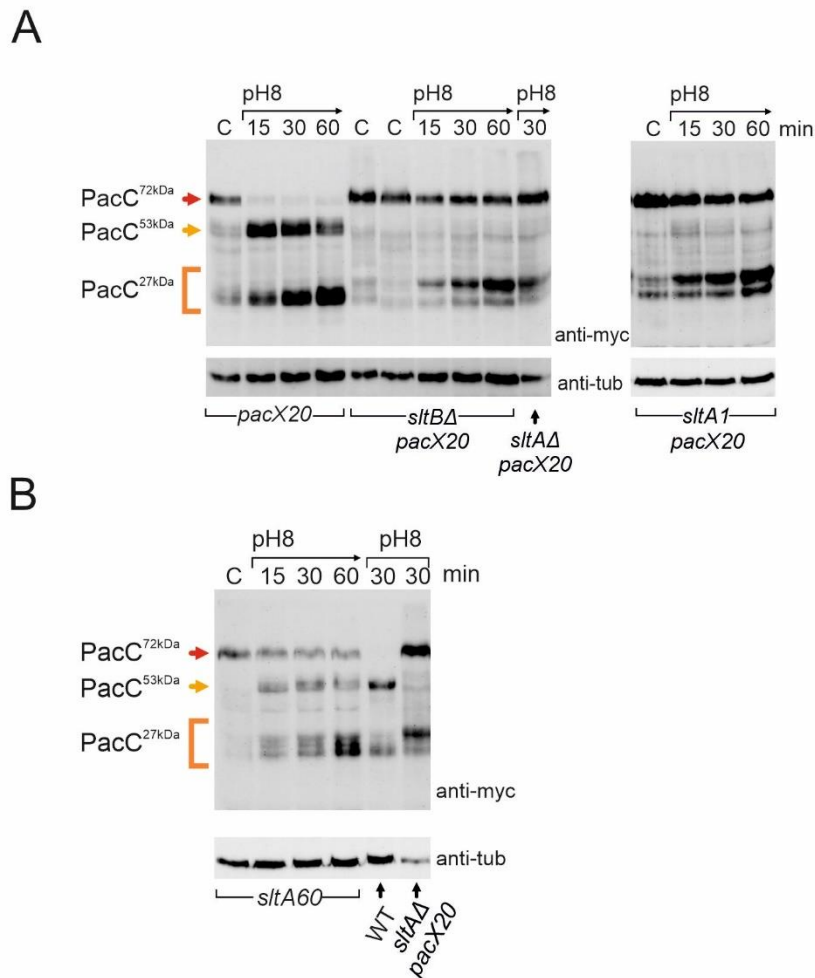
A lo largo de las secciones anteriores, se han descrito alteraciones en las modificaciones post-traduccionales de algunas proteínas como PalF y PacC a pH alcalino en un fondo mutante nulo *sltA*, además de un efecto en los niveles de expresión génica en ambos casos (ver Resultados, capítulo 3). En este capítulo hemos tratado de recuperar tanto el patrón proteolítico de PacC como la tolerancia a la alcalinidad ambiental combinando mutaciones hipofuncionales *slt*, alternativas a la delección de *sltA*, con las formas etiquetadas para PalF y PacC.

Para este trabajo se eligieron tres mutaciones representativas que dan lugar a diferentes formas hipofuncionales de SltA. La comparación entre el efecto de la mutación que causa el fenotipo de pérdida de función más leve, *sltA60* que resulta en el truncamiento de la proteína en el aminoácido 607 (Calcagno-Pizarelli et al., 2011), y la proteína mutante *sltA1*, que está truncada en el aminoácido 502, nos indicará el papel de la región C-terminal de SltA en la regulación del sistema PacC/Pal (O'neil et al., 2002; Spielvogel et al., 2008). Por otro lado, la pérdida de función del gen *sltB*, que codifica para la proteasa de SltA, impide el procesamiento proteolítico de la forma primaria de SltA, SltA<sup>78kDa</sup> y por lo tanto en este fondo mutante se encuentra ausente la forma funcional SltA<sup>32kDa</sup> (Mellado et al., 2016).

Mediante cruces de una cepa *pacX20 pacC900* (MAD1652) como parental común con las cepas MAD3693 (*sltBΔ*) y MAD1132 (*sltA1*), se seleccionaron descendientes que portaban la doble mutación, además del alelo *pacC900*. La cepa (MAD3419), *sltA60 pacC900*, ya se había generado previamente (Calcagno-Pizarelli et al., 2011).

Las cepas seleccionadas se sometieron a un ensayo de alcalinidad en los que se analizaron los niveles y procesamiento proteolítico de PacC900 a los 15, 30 y 60 minutos de inducción del estrés ambiental. La figura R.5.1.A muestra que el patrón de procesamiento de PacC en la cepa doble mutante *sltBΔ pacX20* (MAD7623) mantuvo la acumulación de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> a lo largo de todo el tiempo experimental como se había observado en ausencia de SltA (*sltAΔ pacX20* (MAD7629) y capítulos 3 y 4). Se usó como cepa control un mutante simple *pacX20* (MAD7628) para obtener niveles similares de detección de proteína PacC. En estas condiciones, la detección de la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> no mejoró respecto a lo observado en el fondo nulo *sltA* y también se mantuvo la acumulación de formas PacC<sup>27kDa</sup> de menor movilidad

electroforética. La similitud del patrón de proteólisis de PacC en las cepas *sltBΔ* y *sltAΔ* sugiere que la forma procesada SlfA<sup>32kDa</sup> es necesaria para la detección de las formas esperadas de PacC a pH 8. También en el fondo mutante *pacX20*, la pérdida total de función SlfA causada por la mutación *sltA1* (MAD7671) produjo el mismo efecto en los niveles de las diferentes formas de PacC a pH alcalino que los mutantes nulos *sltBΔ* y *sltAΔ*, (comparar los niveles y formas producidas entre las inmunodetecciones mostradas en los paneles izquierdo y derecho de la figura R.5.1.A).



**Figura R.5.1.** Señalización y procesamiento de PacC a pH alcalino (pH 8) en fondos mutantes *slt*. **A)** Inmunodetección de las formas PacC<sup>72kDa</sup>, PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> en extractos de proteína total de cultivos crecidos en medio mínimo (MMA) en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8) durante diferentes tiempos en cepas *pacX20* combinado con las mutaciones *sltBΔ* y *sltA1*. **B)** Detección de formas PacC en un mutante hipofuncional *sltA60*. La inmunodetección de α-tubulina (anti-tub) se usó como control de carga de proteína total.

La pérdida de la forma SlfA<sup>32kDa</sup> en los fondos mutantes anteriores parece ser la causante de la pérdida de la correcta señalización de PacC. Para averiguar si el mutante más “weak” aislado en *sltA* tiene también un efecto sobre dicha señalización estudiamos

la forma mutante SltA60, SltA (1-607). La cepa MAD3419 porta la mutación *sltA60* y el alelo *pacC900* (Calcagno-Pizarelli et al., 2011). En la figura R.5.1.B se observan las formas de PacC detectadas en el mutante *sltA60* en condición sin estrés (C) y con estrés por alcalinidad y se comparó con las formas que se detectan en extractos proteicos de una cepa silvestre (MAD7627) y un doble mutante *sltAΔ pacX20* (MAD7629) tratados 30 minutos con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. El mutante *sltA60* presentaba una acumulación de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> en condiciones de alcalinidad como se observó en cepas carentes de función SltA. Sin embargo, en este mutante *sltA60* se detectó la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> con una movilidad electroforética similar a la observada en la cepa silvestre. Además, tras 60 minutos en condiciones de alcalinidad se detectó una acumulación preferente de la forma de mayor movilidad electroforética de PacC<sup>27kDa</sup>, aunque también se observaron unos niveles ligeramente elevados de las formas de menor movilidad respecto a la cepa silvestre.

El conjunto de resultados muestra que se requiere de la forma SltA<sup>32kDa</sup>, quizás en ambas formas fosforilada y desfosforilada, para que se produzca el patrón correcto de proteólisis de PacC que se observa en una cepa silvestre. Además, apunta a la importancia de la región carboxilo terminal de SltA, que está pobremente conservada entre sus homólogos (Mellado et al., 2015), como indispensable para dicha función reguladora sobre PacC.

## 5.2. Análisis del procesamiento de PacC a tiempos largos de exposición al pH alcalino y efecto conjunto del pH alcalino y el calcio

El procesamiento de PacC ocurre mediante la señalización transmitida por los elementos de la ruta Pal pocos minutos después de la alcalinización del medio extracelular. Sin embargo, esta respuesta es temporal y tras tiempos prolongados en medio alcalino se observa la acumulación *de novo* de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup>. Este patrón de formas PacC se le ha denominado el proceso de adaptación al pH ambiental alcalino. Además, las formas procesadas acumuladas se van degradando durante ese tiempo a menor ritmo que la síntesis *de novo* de PacC<sup>72kDa</sup> (Lucena-Agell et al., 2016). Determinadas mutaciones de pérdida de función en alguno de los elementos de la ruta Pal permiten la señalización y proteólisis de PacC, pero retrasan la adaptación a la alcalinidad extracelular. Un ejemplo de este fenotipo es el causado por el mutante *palH486* que presenta una deleción de los residuos 450 a 486. El alelo *palH486* retrasa el procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup>. Las formas PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> se observan

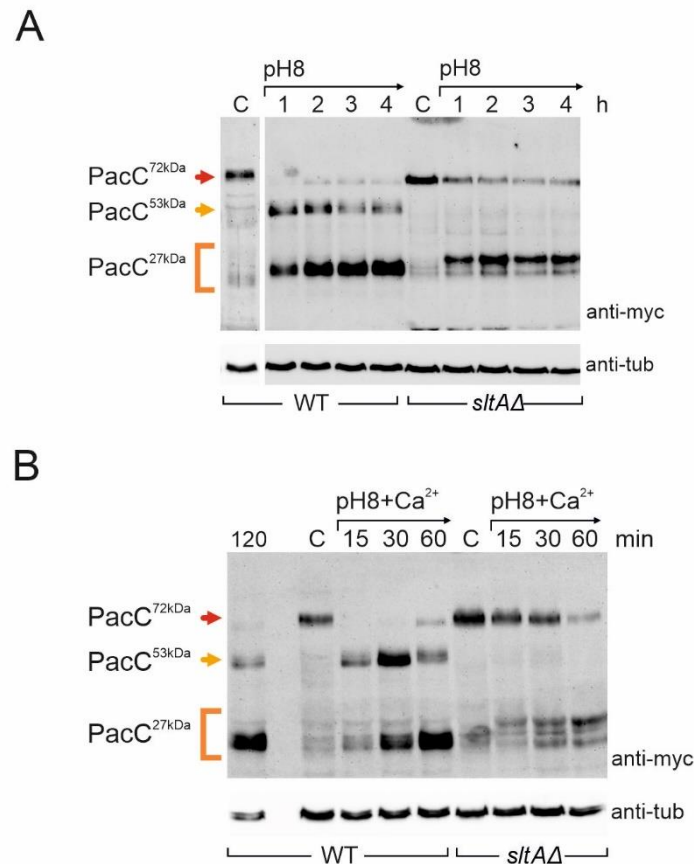
transcurridos más de 60 y 90 minutos tras la alcalinización del medio (Lucena-Agell et al., 2016). Debido al ineficiente procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> en un fondo nulo *sltA*, nos planteamos averiguar si el proceso de adaptación al pH ambiental está también retrasado, o completamente anulado en este fondo mutante.

Usando las cepas MAD7627 (WT) y MAD7630 (*sltA*Δ) se estudió el efecto de la alcalinización del pH extracelular a lo largo de cuatro horas. En la figura R.5.2.A se muestra el patrón de bandas detectadas para PacC900 en ambas cepas. Se observó el procesamiento de PacC a pH 8 en la cepa silvestre con una baja detección de forma primaria tras una hora en condiciones de alcalinidad ambiental y la recuperación leve de los niveles de PacC<sup>72kDa</sup> a lo largo de las cuatro horas del ensayo. Por otro lado, la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> fue perdiendo señal en favor de la forma totalmente procesada. En ausencia de *Sl*A, se observó una menor señal de proteína PacC<sup>72kDa</sup> a pH 8 con respecto a la señal detectada a pH ácido. Sin embargo, la acumulación de esta forma se mantuvo durante las cuatro horas a pH 8. Al igual que se ha observado en tiempos tempranos de inducción de estrés, no se ha detectado la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> y la acumulación de las formas PacC<sup>27kDa</sup> de baja movilidad electroforética fue mayor respecto a las formas que se acumulaban preferentemente en la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que la ausencia de *Sl*A provoca un procesamiento deficiente en PacC independientemente del tiempo de exposición al pH alcalino.

La pérdida total de función *Sl*A causa un fenotipo de alta sensibilidad a estrés ambiental por alta concentración de cationes mono y divalentes como el sodio, el potasio, el litio o el magnesio, pero no al calcio. Además, la esporulación de cepas *sltA*Δ mejora cuando el medio de cultivo es suplementado con cloruro cálcico (Spielvogel et al., 2008). Así, hipotetizamos que dicho efecto supresor del calcio podría también ayudar a recuperar el procesamiento esperado de PacC a pH 8.

Usando la cepa silvestre (MAD7627) y el mutante *sltA*Δ (MAD7630) se realizó un ensayo de estrés por alcalinidad donde se suplementó al medio de cultivo con 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Las muestras de micelio se recogieron a los 15, 30 y 60 minutos en ambas cepas y hasta los 120 minutos en la cepa silvestre. En la figura R.5.2.B se observó que la adición de cationes de calcio no afectaba al procesamiento de PacC a pH 8 en la cepa silvestre, y tanto el procesamiento y posterior recuperación de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup>, como la acumulación de las formas intermedia y procesada fueron detectadas. Este patrón proteolítico no se observó en ausencia de *Sl*A. La forma primaria se observó en todos los tiempos analizados, mientras que la forma intermedia apenas fue detectada.

Tampoco se obtuvo una acumulación de la forma PacC<sup>27kDa</sup> con la misma movilidad electroforética que la observada en la cepa silvestre.



**Figura R.5.2.** Efecto a largo plazo de la alcalinidad y efecto del calcio en ambientes alcalinos en el procesamiento de PacC en el fondo mutante *sltAΔ*. **A)** Inmunodetección de las formas PacC<sup>72kDa</sup>, PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> en extractos de proteína total de cultivos crecidos en medio mínimo (MMA) en ausencia de estrés ambiental (C), y tratados con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8) entre 1 y 4 horas. **B)** Detección de formas PacC durante 15, 30 y 60 minutos en combinación con 10 mM CaCl<sub>2</sub>. La inmunodetección de α-tubulina (anti-tub) se usó como control de carga de proteína total.

### 5.3. Estudio del procesamiento proteolítico de PacC<sup>72kDa</sup> en ausencia de las funciones PalB y SlfA

En los modelos actuales el último paso en la ruta de señalización Pal es el procesamiento de la forma PacC<sup>72kDa</sup> por la función calpain-proteasa de la proteína PalB tras ser reclutada por PalA (Rodríguez-Galán et al., 2009; Vincent et al., 2003). Este paso señalizador dependiente de pH alcalino permite el corte proteolítico de PacC entre los residuos 493 y 500 (Peñas et al., 2007; Tilburn et al., 1995), dando lugar a la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup>. Como se había descrito previamente en el capítulo 3 (sección

3.5), la delección de *sltA* no afectaba al reclutamiento de PalA en puntos concretos de la membrana en respuesta a la alcalinización del pH ambiental. Sin embargo, no hemos determinado si los pasos restantes hasta el procesamiento de PacC son o no eficientes puesto que el aumento de expresión y proteína PacC mediante la mutación *pacX20* (capítulo 4) no han logrado revertir el patrón proteolítico de PacC en el fondo nulo *sltA*. Mediante transformación se obtuvieron dobles mutantes *palBΔ sltAΔ* para valorar si el procesamiento inadecuado de PacC en el fondo nulo *sltA* a pH 8 es independiente de la función PalB.

En la figura R.5.3.A se muestra el fenotipo de las cepas silvestre, los nulos simples para los genes *palB* y *sltA*, así como el doble mutante *palBΔ sltAΔ*, en diferentes condiciones de estrés ambiental. El mutante simple *palBΔ* presentaba una ligera sensibilidad a las condiciones de estrés por exceso de catión sodio y de molibdato en comparación con el fenotipo observado en la cepa silvestre. A pesar de este fenotipo de sensibilidad, este mutante es capaz de conidiar en el medio 1M NaCl, a diferencia del fondo nulo simple *sltA* y el doble mutante. Todos los mutantes mostraron una alta sensibilidad a la condición de alcalinidad ambiental como ya se había descrito para los mutantes simples (Mellado et al., 2015). El doble mutante mostró un fenotipo similar al observado en el mutante simple *sltAΔ* con una alta sensibilidad al estrés por exceso de sodio extracelular, así como a pH 8. En cuanto al estrés por presencia de molibdato se observó que las cepas carentes de PalB presentaban una mayor sensibilidad que la observada en ausencia de *SlmA*. El doble mutante mostró un efecto combinado de alta sensibilidad a molibdato además del cambio de pigmentación que se detectó también en el nulo simple *sltA*.

La cepa doble mutante *palBΔ sltAΔ* también es portadora del alelo *pacC900* que nos permitió la inmunodetección PacC<sup>72kDa</sup> y de sus otras formas a pH 8. Usando las cepas mostradas en el análisis fenotípico, se realizó un ensayo de alcalinidad con una inducción de la condición de estrés durante 30 minutos (ver apartados 1, 2 y 10 de Materiales y Métodos) y el posterior análisis de los extractos de proteína total mediante inmunodetección. En la figura R.5.3.B se observa que la delección simple de *palB* (carriles 7 y 8), impide el procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> a la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> cuando aumenta el pH extracelular, y únicamente se generó, a unos niveles muy bajos, una forma similar a PacC<sup>27kDa</sup> de menor movilidad electroforética. La combinación de las mutaciones *palBΔ* y *sltAΔ* resultó en un patrón proteolítico muy similar al observado en el mutante simple *sltAΔ*. Tras 30 minutos de inducción de estrés ambiental se observó la acumulación de la forma primaria y de las formas procesadas PacC<sup>27kDa</sup> de menor movilidad.



forma PacC<sup>27kDa</sup> de mayor tamaño independientemente de la señalización de la ruta Pal y del paso final de procesamiento llevado a cabo por la proteasa PalB. Concluimos que deben existir elementos adicionales que participen en este paso proteolítico alternativos a la ruta Pal y que son funcionales en ausencia de SltA.

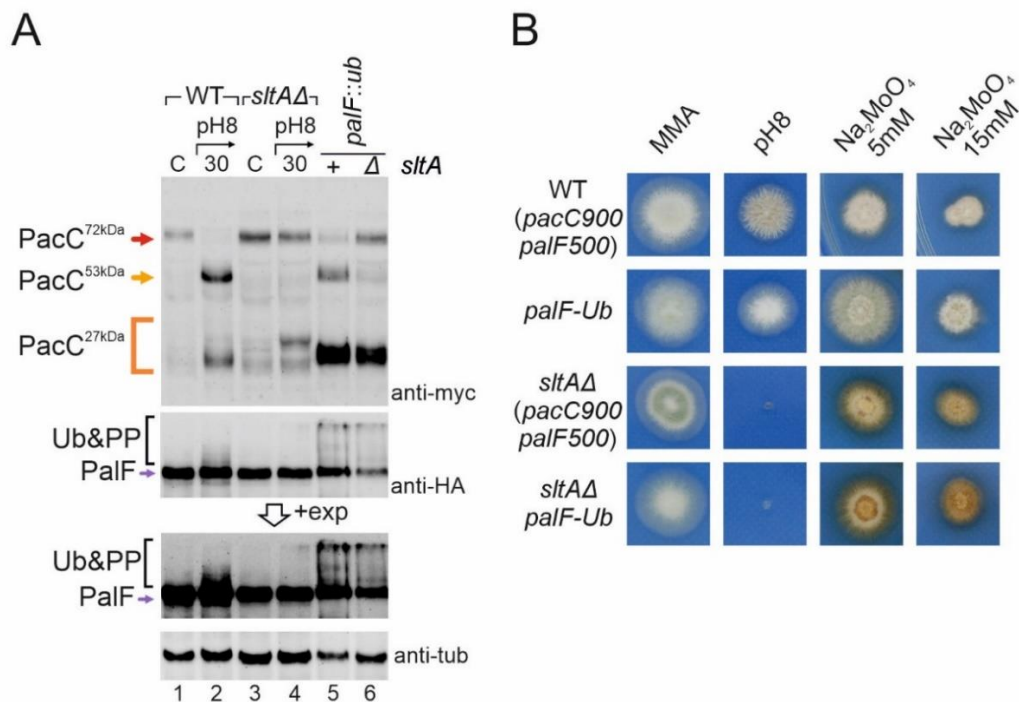
Para determinar si PacC puede ser correctamente procesado a su forma PacC<sup>27kDa</sup> en ausencia de SltA optamos por utilizar diferentes estrategias genéticas que activen la ruta Pal independientemente del pH ambiental o eludan la misma usando alelos *pacC* que no necesiten de dicha señalización.

#### 5.4. Efecto de la delección de *sltA* durante la activación constitutiva de la ruta Pal

Dado que los niveles de modificación post-traduccional de PalF están alterados en ausencia de SltA, consideramos el estudio de una forma constitutivamente ubiquitinada de PalF, el alelo *palF-ub*. Esta versión modificada de PalF da lugar a una ganancia de función de la ruta Pal que señala a PacC<sup>72kDa</sup> independientemente del pH extracelular. Estos mutantes son capaces de tolerar el pH alcalino y se caracterizan además por su hiperresistencia a ciertas concentraciones de molibdato (Peñalva & Arst, 2002). En trabajos previos se generaron diferentes construcciones de PalF etiquetado y/o modificado para el estudio de su activación y su papel transductor de señal en la ruta Pal en ambientes alcalinos. En (Hervás-Aguilar et al., 2010a) se creó el plásmido p1861 que porta la construcción *palF* bajo el promotor constitutivo de *gpdA* (*gpdA<sup>mini</sup>*) fusionado en la región C-terminal a 3 copias del epítipo HA y a ubiquitina usando como marcador de selección de transformación al gen *pyroA*. Esta construcción permite por tanto la inmunodetección de estas formas modificadas de PalF de manera “similar” a las de una cepa silvestre en medio alcalino. En este trabajo se ha introducido este alelo *palF-ub* en la cepa *sltAΔ pacC900* (MAD7631) generando un triple mutante (MAD7634).

En la parte superior de la figura R.5.4.A observamos las formas procedentes de PacC900 en condiciones de pH ácido y de inducción durante 30 minutos de estrés por alcalinidad en cepas silvestre y fondo nulo *sltA*. En el mutante simple *palF::ub* (carril 5) se observó un procesamiento similar al obtenido en la cepa silvestre tras 30 minutos a pH 8 (carril 2), donde se detectó un bajo nivel de PacC<sup>72kDa</sup> en favor de las formas intermedia y activa PacC<sup>27kDa</sup>, la cual mostró una movilidad electroforética similar a la detectada en la cepa silvestre. La ubiquitinación constitutiva de PalF en un fondo nulo *sltA* revierte parte de las alteraciones observadas en el mutante simple *sltAΔ*. La forma

primaria  $\text{PacC}^{72\text{kDa}}$  sigue acumulándose y hay una baja detección de la forma  $\text{PacC}^{53\text{kDa}}$  (carril 6). Sin embargo, es notable que la forma procesada de 27kDa recuperaba la movilidad electroforética característica de las formas  $\text{PacC}^{27\text{kDa}}$  detectadas en la cepa silvestre y en el mutante simple PalF-Ub. El revelado de PalF en las mismas muestras (parte inferior de la figura R.5.4.A) mostró que la alcalinización del medio activaba la modificación postraduccional de PalF en la cepa silvestre mientras que estas modificaciones apenas son detectadas en el mutante simple *sltAΔ* a pH alcalino. En ambas cepas PalF-Ub se detectaron estas formas modificadas independientemente de la mutación *sltAΔ*.



**Figura R.5.4.** Efecto de la activación constitutiva de PalF en un fondo *sltAΔ*. **A**) Inmunodetección de las formas PacC (72 kDa, 53 kDa y 27kDa) y PalF (Forma primaria PalF y formas modificadas post-traduccionalmente Ub&PP) en las cepas silvestre (WT), *sltAΔ*, PalF ubiquitinado (*palF::ub*) (MAD4499) y el doble mutante *palF::ub sltAΔ* (MAD7634). La inmunodetección de  $\alpha$ -tubulina (anti-tub) se usó como control de carga de proteína total. **B**) Análisis de fenotipo en placas de Petri con MMA de las cepas usadas en el Western Blot del panel A y sometidas a estrés ambiental por alcalinidad y molibdato sódico. Las imágenes se tomaron tras una incubación de 48 h a 37°C.

Dado que en el fondo *palF-ub sltAΔ* se había observado la recuperación de la movilidad electroforética de la forma activa ( $\text{PacC}^{27\text{kDa}}$ ) a la detectada en la cepa silvestre, se realizó un análisis fenotípico para verificar si la presencia de esta forma PacC suprimía los fenotipos de sensibilidad al pH alcalino y/o al molibdato. En la imagen de la figura R.5.4.B se observa que tanto la cepa silvestre como el mutante simple PalF-Ub, eran capaces de responder a todas las condiciones de estrés ensayadas y en el caso del

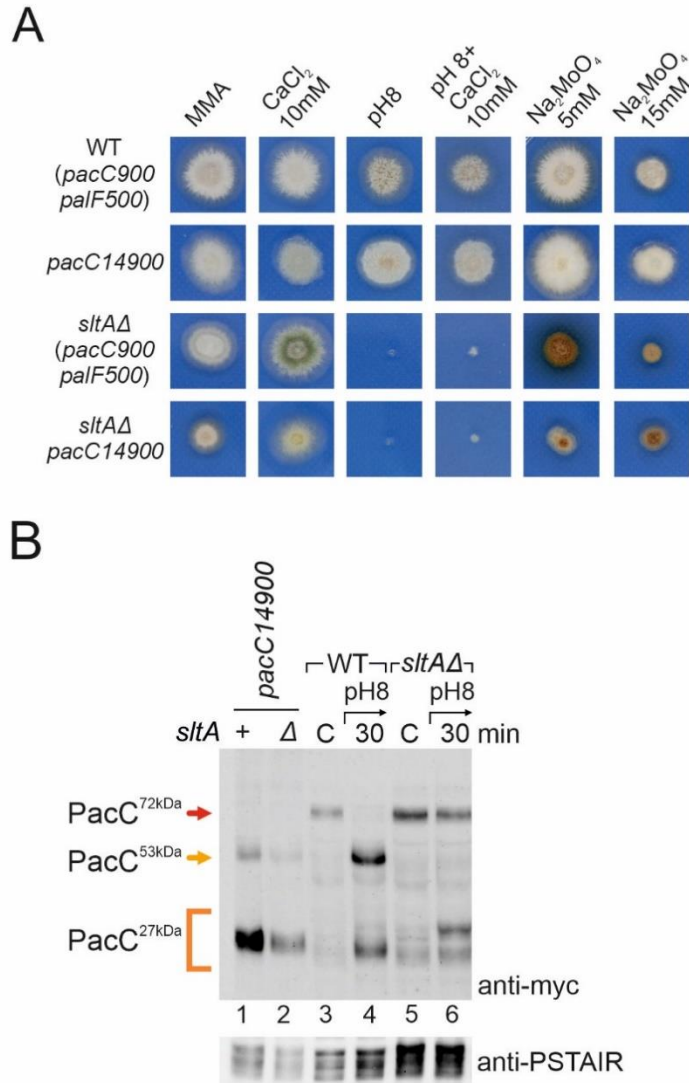
mutante PalF-Ub se observó un mayor crecimiento radial de la colonia en la condición 5 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> respecto a la cepa silvestre. El mutante *sltAΔ* mostró cierta resistencia a ambas concentraciones de molibdato y, a diferencia del silvestre y del mutante simple PalF-Ub, las colonias adquirieron una pigmentación anaranjada. Por último el doble mutante *palF::ub, sltAΔ* mostró un fenotipo similar al mutante simple *sltAΔ* tanto a pH 8 como en ambas concentraciones de molibdato estudiadas.

Estos resultados sugieren que la función SltA es necesaria para la correcta señalización de PacC<sup>72kDa</sup>. La ganancia de función de la ruta Pal a través de la ubiquitinación de PalF no es suficiente para rescatar el fenotipo de tolerancia a pH 8, a pesar de recuperar la movilidad electroforética de la forma procesada PacC<sup>27kDa</sup>.

### 5.5. Efecto de la ausencia de SltA en un mutante de mimesis de alcalinidad (I): El alelo *pacC14900*

Dado que la activación de la ruta *pal* a través de la ubiquitinación constitutiva de PalF no recuperaba completamente el patrón de procesamiento de PacC ni el fenotipo silvestre a pH 8, se optó por analizar el patrón proteolítico de PacC en mutantes cuyo procesamiento proteolítico es independiente de la ruta Pal. En Tilburn y colaboradores (Tilburn et al., 1995) se caracterizó una mutación clásica en *pacC*, *pacC<sup>c</sup>14*. La mutación presente en este alelo genera un truncamiento temprano en el aminoácido 492 que da lugar a una forma con un tamaño similar a PacC<sup>53kDa</sup>. Al igual que el alelo *pacC* silvestre se ha generado un alelo mutante *pacC<sup>c</sup>14* etiquetado con tres copias del epítipo MYC, designado como *pacC14900* (Hervás-Aguilar et al., 2007). El alelo mutante *pacC14900* nos permite visualizar una forma primaria parecida a la intermedia de PacC<sup>53kDa</sup> y que es procesada por el proteosoma independientemente de la señalización por pH ambiental. Usando las cepas mutantes *pacC14900* (MAD1445) y *sltAΔ pacC14900* (MAD4296), y las cepas silvestre (MAD7627) y *sltAΔ* (MAD7630) usadas en capítulos previos, se analizó el fenotipo en diferentes condiciones de estrés, así como los niveles y el patrón proteolítico de PacC900.

En la figura R.5.5.A se muestran los fenotipos de las cepas inoculadas sobre MMA con diferentes condiciones de estrés. La cepa mutante *pacC14900*, que causa la acumulación de las formas de 53 y 27kDa, mostró un crecimiento de colonia similar al observado en la cepa silvestre en todas las condiciones estudiadas. Sin embargo, se observó una buena capacidad de esporulación en el medio suplementado con 5 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, mientras que la adición de calcio generaba ciertas alteraciones tanto en



**Figura R.5.5.** Efecto de la delección de *sltA* en el mutante de mimesis de alcalinidad *pacC14900*. **A)** Análisis fenotípico de tolerancia a estrés ambiental por alcalinidad, calcio y molibdato en el mutante simple *pacC14900* (MAD1445) y en el mutante doble *pacC14900 sltAΔ* (MAD4296). Las conidiosporas de estas cepas además de las cepas silvestre (MAD7627) y *sltAΔ* (MAD7630) se inocularon en placas de Petri con MMA en las diferentes condiciones ambientales indicadas. Las imágenes fueron tomadas tras una incubación a 37°C durante 48 h. **B)** Inmunodetección de las formas PacC a partir de extractos de proteína total de las cepas usadas en el panel A. Las cepas WT y *sltAΔ* se han tratado con pH alcalino durante 30 minutos, mientras que las cepas *pacC14900* y en el mutante doble *pacC14900 sltAΔ* no requieren de un cambio del pH ambiental. Como control de carga de proteína total se ha usado el motivo PSTAIR de las quinasas dependientes de ciclina (anti-PSTAIR).

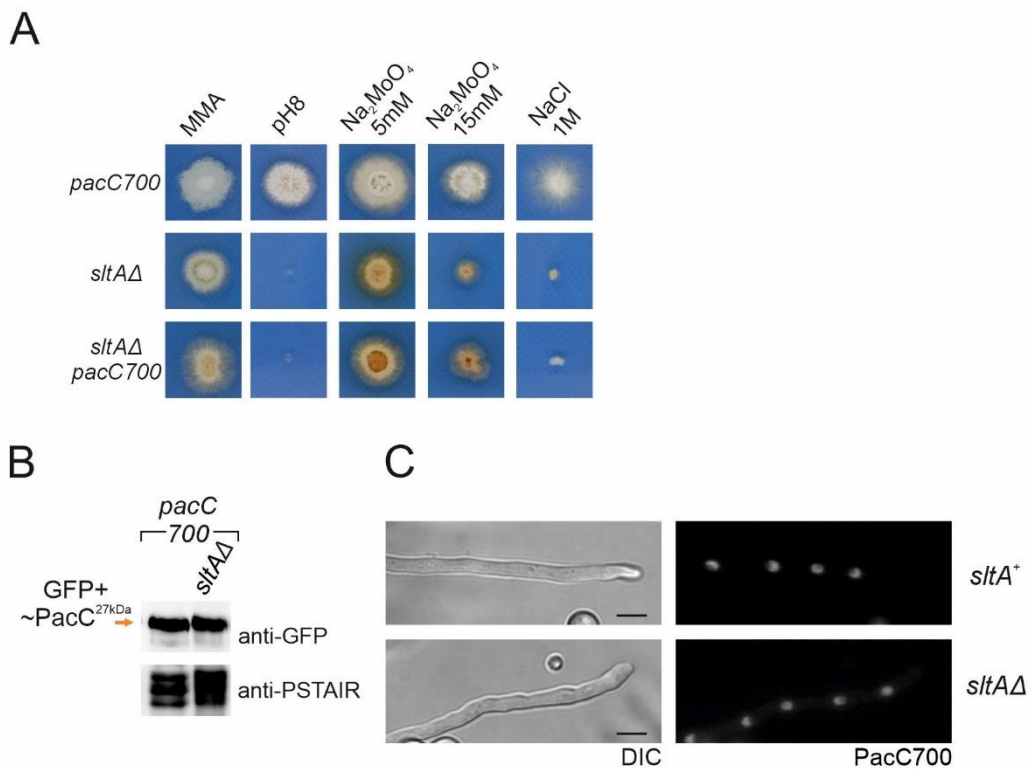
crecimiento como en capacidad de conidiación. El mutante simple *sltAΔ* mostró un crecimiento de colonia similar a las cepas control en ausencia de estrés y una mejora de la conidiación en el medio suplementado con calcio. Por otro lado, ambas concentraciones de molibdato dieron lugar a un menor crecimiento de la cepa *sltAΔ* que, además, adquirió una pigmentación anaranjada observada previamente (Figura R.5.4.B). La cepa doble mutante *pacC14900 sltAΔ* presentó un crecimiento reducido y baja capacidad de esporulación tanto en el medio mínimo sin estrés como en el medio

suplementado con calcio. Al alcalinizar el medio de cultivo se observó un efecto epistático de la mutación *sItAΔ* sobre la mutación *pacC14* y no se observó crecimiento colonial a pesar de suplementar con calcio el medio alcalinizado. Este mismo efecto epistático se observó también en la condición de estrés por altas concentraciones de molibdato en la cual las colonias eran más pequeñas que en las cepas silvestre o mutantes simples, y mostrando la misma pigmentación anaranjada observada en el fondo nulo simple *sItA*.

A partir de extractos de proteína total de las diferentes cepas en una o varias condiciones de pH, se procedió a la inmunodetección de las formas PacC (PacC900 y PacC14900). Para el análisis de las cepas silvestre y *sItAΔ* se recurrió a extractos de proteína total en condiciones de ausencia de estrés y tras 30 minutos de incubación a pH 8, mientras que los extractos proteicos de los mutantes *pacC14900*, al presentar un fenotipo alcalino en el procesamiento de PacC, se obtuvieron solo en condiciones estándar. En la figura R.5.5.B se muestra el ensayo de inmunodetección en el que se observó como el patrón de proteólisis del mutante simple *pacC14900* se asemeja al observado en la cepa silvestre tras 30 minutos en condiciones de estrés por alcalinidad (carriles 1 y 4). Se detectó levemente la forma PacC<sup>53kDa</sup> y una señal elevada de la forma procesada por el proteosoma, PacC<sup>27kDa</sup>, con una movilidad electroforética similar a la forma acumulada en la cepa silvestre. La combinación de esta mutación con la delección de *sItA* dio lugar a menores niveles de proteína total (ver detección con anticuerpo anti-PSTAIR en la parte inferior de la figura R.5.5.B), y, por tanto, también se detectaron menores niveles de proteína PacC (carril 2). Pese a los bajos niveles de proteína observados en el doble mutante, el perfil proteolítico se asemeja al observado en el mutante simple *pacC14900*. De modo que la función del proteosoma no parece estar alterada en ausencia de función SItA e interpretamos que el procesamiento ineficiente de PacC en las cepas mutantes simples *sItAΔ* se debe a problemas relacionados con la ruta de señalización Pal. Por otro lado, estos resultados muestran un efecto epistático de las mutaciones que afectan al sistema SIt sobre el procesamiento de PacC que, aunque consiga generar las formas equivalentes a PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> no se suprime el fenotipo de sensibilidad que muestran las cepas *sItAΔ*.

### 5.6. Efecto de la ausencia de *SlfA* en un mutante de mimesis de alcalinidad (II): El alelo *pacC700*

En esta última sección se abordó el estudio de la combinación del alelo *sltAΔ* y *pacC<sup>c700</sup>*. La mutación *pacC<sup>c700</sup>* genera una proteína, PacC5-250, de tamaño similar a PacC<sup>27kDa</sup>. De este modo la generación de esta forma de PacC<sup>27kDa</sup> es independiente de los dos pasos proteolíticos llevados a cabo por la ruta Pal y el proteosoma, respectivamente. Además, esta forma truncada de PacC se encuentra etiquetada con GFP en su extremo N-terminal (Fernández-Martínez et al., 2003). Este etiquetado nos permite tanto analizar los niveles de proteína PacC mediante inmunodetección, como determinar la localización subcelular usando microscopía de fluorescencia. Mediante cruce se obtuvo progenie que portaban la delección de *sltA*, así como esta forma de GFP-PacC<sup>27kDa</sup> para el estudio a nivel fenotípico, de proteína y de localización celular.



**Figura R.5.6.** Efecto de la delección de *sltA* en el mutante de mimesis de alcalinidad *pacC<sup>c700</sup>*. **A)** Análisis fenotípico de tolerancia a estrés ambiental por alcalinidad, molibdato y alta concentración de catión sodio en el mutante simple *pacC700* (MAD7632) y en el mutante doble *pacC700 sltAΔ* (MAD7633). Las conidiosporas se inocularon en placas de Petri con MMA y los compuestos correspondientes en cada caso (indicado en la parte superior del panel). Las imágenes fueron tomadas tras una incubación de las placas a 37°C durante 48 h. **B)** Inmunodetección de la forma PacC700 (~27kDa) a partir de extractos de proteína total de las cepas *pacC700* usadas en el panel A. Como control de carga de proteína total se ha usado el motivo PSTAIR de las quinasas dependientes de ciclina. **C)** Localización celular de PacC700 (GFP-PacC<sup>27kDa</sup>) en un fondo silvestre y un fondo mutante *sltAΔ*. Las imágenes se obtuvieron en un único plano en el eje Z aplicando una exposición de 100-200 ms. Las barras representan 5 μm.

En primer lugar, se analizó el fenotipo de la cepa doble mutante y se comparó con las cepas parentales (Figura R.5.6.A). La mutación *pacC<sup>c700</sup>* confiere resistencia a la alcalinización del medio y la presencia de molibdato. Sin embargo, la combinación *pacC<sup>c700</sup> sltAΔ* causa el mismo fenotipo de sensibilidad al pH alcalino que el alelo nulo *sltA*. También se pone de manifiesto la sensibilidad del doble mutante a 1M cloruro sódico, condición en la que el mutante simple *pacC<sup>c700</sup>* muestra tolerancia. La presencia de molibdato en el medio causa en los fondos nulos *sltA* el característico color anaranjado, independientemente de la presencia del alelo *pacC<sup>c700</sup>*. En segundo lugar, se analizaron extractos de proteína total de ambas cepas mediante inmunodetección de PacC700. En la figura R.5.6.B se muestra que los niveles de PacC son similares en ambas cepas y que la movilidad electroforética no se ha visto alterada en ausencia de SltA. Por último, en el análisis de microscopía de fluorescencia no se observaron diferencias de localización subcelular entre el silvestre y el nulo *sltA*. La figura R.5.6.C localiza a PacC700 en los núcleos tanto en el fondo *sltA<sup>+</sup>*, previamente descrita en Fernández-Martínez y colaboradores (Fernández-Martínez et al., 2003), como en el mutante *sltAΔ*.

Los resultados de esta sección indican que la función de PacC<sup>27kDa</sup> en la respuesta transcripcional a alcalinidad está sujeta a la correcta actividad del factor transcripcional SltA, a pesar de mantener aparentemente unos niveles de proteína y localización celular idénticos a una cepa silvestre en el fondo *sltAΔ*. En conjunto, en este capítulo se refleja la importancia de la función del sistema Slt, que permite el procesamiento y la correcta función de SltA, sobre el papel del sistema PacC/Pal durante eventos de estrés por alcalinidad ambiental.

## Capítulo 6. Estudios de posibles efectores de la función SltA y de la respuesta al estrés

La funcionalidad de SltA es necesaria para el correcto funcionamiento no solo de PacC o elementos de la ruta Pal, sino que también mantiene los niveles de expresión de una gran variedad de genes como se ha descrito en el análisis de secuenciación masiva (ver capítulo 2 de Resultados). Puesto que casi un 10% del transcriptoma se encuentra alterado en ausencia de SltA, se seleccionaron algunos genes para realizar análisis más extensos y tratar de definir la relación de los niveles de expresión de estos genes con la función del factor transcripcional SltA. Los genes seleccionados fueron aquellos que presentaban un patrón de expresión dependiente de SltA similar al observado para el gen *sltB* (Mellado et al., 2015), es decir, niveles muy reducidos de expresión independientemente de la condición ambiental en el fondo nulo SltA (Picazo et al., 2020).

Las secuencias de las proteínas codificadas por los genes seleccionados fueron analizadas inicialmente mediante BLASTP para identificar proteínas de la misma familia o con dominios homólogos en *A. nidulans*, así como en la búsqueda de proteínas ortólogas en *S. cerevisiae*. En el estudio de estos genes se realizó en primer lugar una verificación de los niveles de expresión de cada gen mediante qPCR en las cepas silvestre y *sltAΔ* en ausencia de estrés y a pH 8 durante 60 minutos. En segundo lugar, en algunos de los genes estudiados se recurrió a la obtención de mutantes nulos para estos genes para su análisis fenotípico en condiciones de estrés. Por último, se realizaron análisis de microscopía de fluorescencia, bien para describir por primera vez en *A. nidulans* la localización celular de algunas proteínas codificadas por estos genes, tanto en un silvestre como en un mutante nulo *sltA*, o bien para el estudio del fenotipo vacuolar en los mutantes nulos simples obtenidos.

### 6.1. Transportadores de magnesio

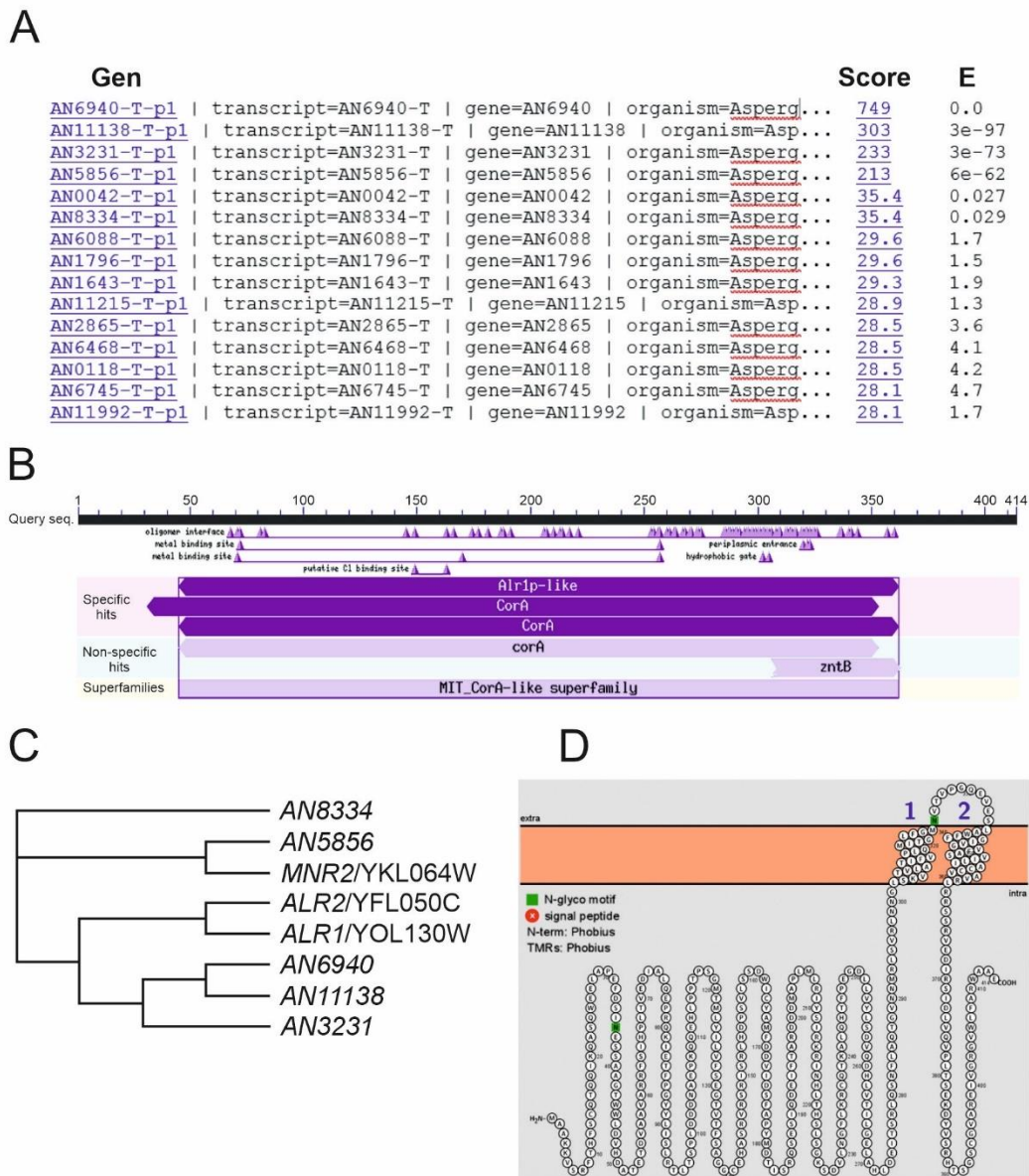
La homeostasis de cationes es esencial para la supervivencia y adaptación celular de cualquier organismo incluidos los hongos. Esta homeostasis se logra gracias a la función de proteínas transportadoras de cationes mono y divalentes que equilibran las proporciones de carga entre los ambientes intracelular y extracelular. Un tipo de estos transportadores son, por ejemplo, los transportadores del catión divalente magnesio. Estos transportadores se han identificado y descrito en *S. cerevisiae* como ALR1 y

ALR2, ya que la sobreexpresión de los respectivos genes causa un fenotipo de resistencia al estrés por aluminio, entre otros compuestos (Macdiarmid & Gardner, 1998). Previamente se ha descrito en *S. cerevisiae* que estos transportadores pueden actuar tanto en la importación como extrusión de cationes divalentes (Graschopf et al., 2001; G. J. Liu et al., 2002) por lo que su localización celular es necesaria tanto en la membrana plasmática como en la membrana vacuolar con el fin de mantener el equilibrio catiónico intracelular.

Los sistemas de transporte de magnesio no han sido identificados en *A. nidulans* aunque sí la participación de los factores SltA y CrzA, así como la coordinación con los iones calcio (Manoli & Espeso, 2019). Una cepa silvestre de *A. nidulans* es capaz de tolerar estrés causado por altas concentraciones de catión magnesio, mientras que en mutantes como una cepa *sltA* $\Delta$  presentan una alta sensibilidad a este catión (Spielvogel et al., 2008).

En el análisis de datos del ensayo de RNAseq (ver capítulo 2), el gen *AN6940* que codifica para un transportador de magnesio presentaba un patrón de expresión similar al observado en el gen *sltB*. Usando la base de datos FungiDB (<https://fungidb.org/>), se encontraron quince genes que codifican para proteínas con un dominio común descrito como “*CorA domain*” (Figura R.6.1.1.A) realizando una búsqueda “BLASTP” con la secuencia aminoacídica de AN6940. Este dominio no presenta código identificativo de la base de datos Interpro, pero sí de Pfam (PF01544) y los valores “E-value <0” solo se detectaron en tres, además de AN6940, de las quince proteínas identificadas. Posteriormente se realizó un nuevo análisis BLASTP en la plataforma de BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) enfrentando la secuencia de AN6940 con las proteínas anotadas de *A. nidulans* FGSCA4 y *S. cerevisiae* S0288C. Este análisis permitió identificar que los genes *AN6940*, *AN11138*, *AN3231* y *AN5856* codifican para proteínas que presentan un dominio “*Alr1p-like*” (cd12829), que los convertirían en posibles ortólogos de la familia ALR de los transportadores de magnesio en *S. cerevisiae*, la cual, está compuesta por tres genes que presentan el dominio ALR: *ALR1/YOL130W*, *ALR2/YFL050C* y *MNR2/YKL064W* (Figura R.6.1.1.B). Con los genes que presentaban un dominio “*Alr1p-like*” para *A. nidulans* y ALR en *S. cerevisiae* se realizó un alineamiento múltiple, en el que se incluyó a *AN8334* que presentaba un dominio *CorA* pero no “*Alr1p-like*”. El resultado del alineamiento múltiple se refleja en forma de árbol filogenético en la figura R.6.1.1.C. La proteína con el dominio *CorA*, codificada por el gen *AN8334*, no se agrupa con el resto de las proteínas analizadas, mientras que *AN6940* se agrupa próxima a *AN3231* y *AN11138*, así como a las proteínas de levadura ALR1 y ALR2. Por otro lado, *AN5856* y *MNR2* se agruparon en un clado

separado, probablemente por motivos específicos que localicen a estas proteínas en otras membranas celulares como es el caso de MNR2 cuya localización es vacuolar (Pisat et al., 2009).

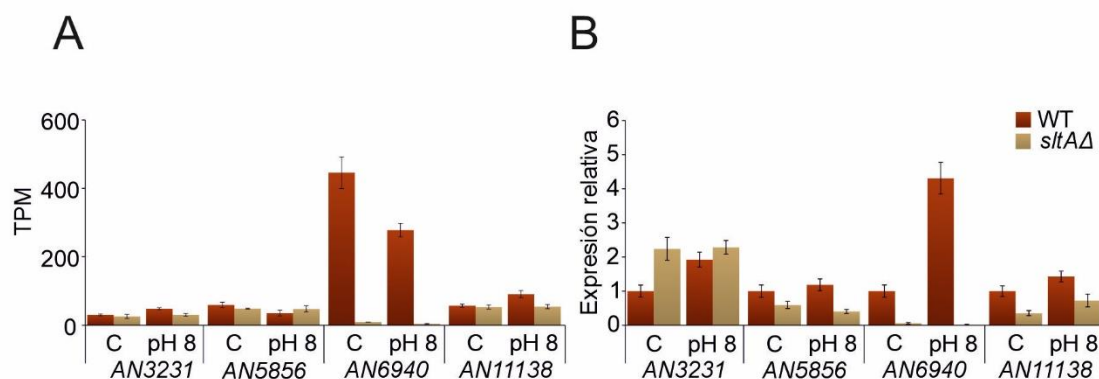


**Figura R.6.1.1.** Identificación *in silico* de las proteínas transportadoras de magnesio de la familia ALR. **A)** Búsqueda de genes homólogos de *AN6940*. **B)** Identificación de dominios de la proteína *AN6940*. **C)** Árbol filogenético de los genes ALR de *A. nidulans* y *S. cerevisiae*. **D)** Predicción de los motivos de *AN6940* y su localización celular utilizando la herramienta bioinformática de predicción de dominios “Protter”.

El dominio ALR o “*Alr1p-like*” basan su semejanza aparentemente en dos dominios transmembrana normalmente próximos a la región C-terminal. Usando la herramienta bioinformática Protter (<https://wlab.ethz.ch/protter/start/>) se obtuvo un modelado de la proteína codificada por *AN6940* en el que se observan dichos dominios transmembrana (Figura R.6.1.1.D). El resto de las proteínas analizadas en el alineamiento múltiple

fueron también modeladas y, a excepción de *AN8334*, todas presentaban una localización de estos dominios similar a *AN6940* (resultados no mostrados).

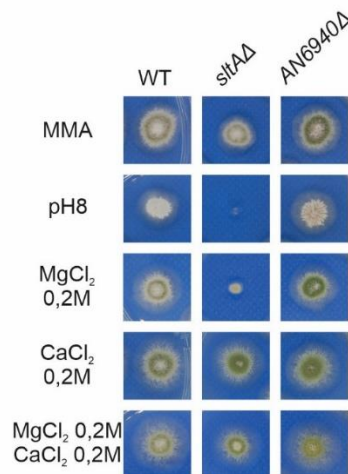
A partir de estos resultados de análisis *in silico* se verificaron mediante qPCR los niveles de expresión de los genes de la familia “*Alr1p-like*”, en las cepas silvestre y *sltAΔ* en las condiciones control y a pH 8 tras 60 minutos siguiendo la metodología experimental detallada en Materiales y Métodos (apartados 1, 2, 5 y 7) y en los capítulos 1 y 3 de Resultados. En la figura R.6.1.2.A se muestran los niveles de expresión TPM obtenidos en el análisis secuenciación masiva de RNA (Enlace al anexo de datos RNAseq en el capítulo 2.1 de Resultados). El gen *AN6940* mostró unos niveles de expresión mayores a pH 8 respecto al resto de genes analizados en la cepa silvestre y la delección de *sltA* causó un descenso drástico de los valores TPM en ambas condiciones ambientales. El análisis de qPCR (Figura R.6.1.2.B) mostró algunas diferencias en los niveles de expresión respecto a lo observado en los resultados de RNAseq para algunos de los genes y condiciones estudiadas, sin embargo, se observó la misma caída de los niveles de expresión de *AN6940* en el fondo nulo *sltA* independientemente de la condición ambiental.



**Figura R.6.1.2.** Estudio de la respuesta transcripcional a alcalinidad ambiental de los genes que codifican para los transportadores de magnesio de tipo ALR. **A)** Niveles de expresión relativos de los genes de la familia ALR en ausencia de estrés (C), y en respuesta a estrés durante 60 minutos a pH 8 (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) en los fondos genéticos silvestre y *sltAΔ*, obtenidos mediante el análisis experimental de secuenciación masiva de RNA (RNAseq). Los niveles de expresión se miden como transcrito por millón (TPM). **B)** Niveles de expresión relativos de los genes de la familia ALR en ausencia de estrés (C), y en respuesta a estrés durante 60 minutos a pH 8 (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) en los fondos genéticos silvestre y *sltAΔ*, obtenidos mediante el análisis experimental de PCR cuantitativa (qPCR). El nivel de expresión relativo de cada gen se obtuvo usando como gen de referencia a *AN1182/benA*. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas experimentales en el caso del análisis de RNAseq y de tres réplicas experimentales en el caso del análisis de qPCR.

*AN6940* es el único gen que presenta una expresión dependiente de *SlrA* de los cuatro genes estudiados. Para determinar si el fenotipo de sensibilidad a elevadas concentraciones de magnesio que presenta una cepa nula *sltA* pudiera deberse a los

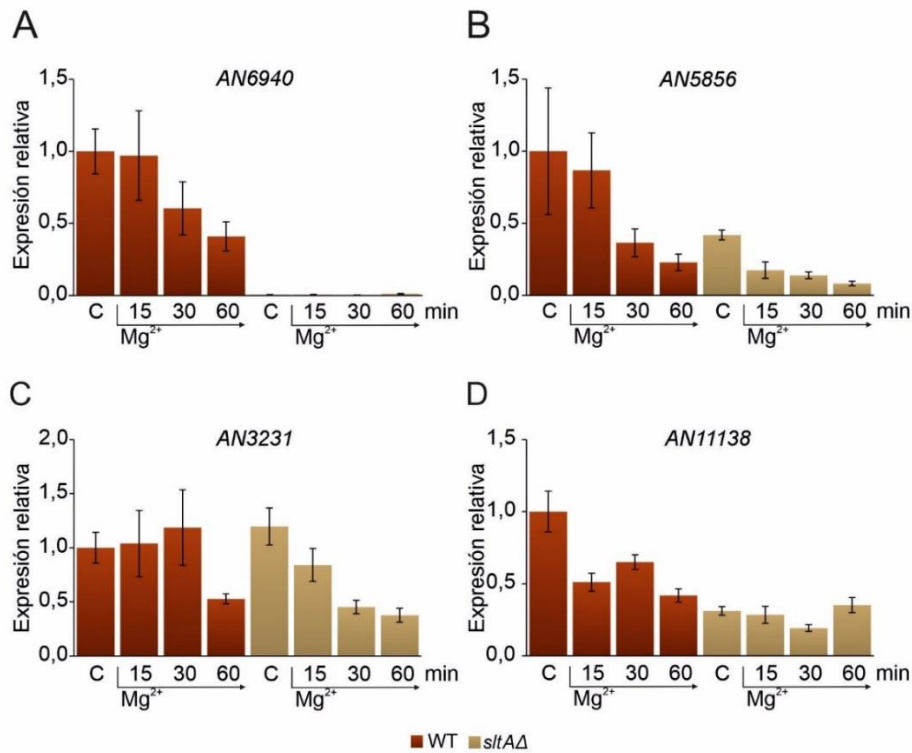
bajos niveles de expresión de *AN6940* detectados en dicho fondo genético, se construyó una cepa portadora del alelo nulo *AN6940* para determinar el fenotipo de la ausencia de dicho transportador. En la figura R.6.1.3 se muestra el análisis comparativo de una de las cepas *AN6940Δ* construidas con la cepa silvestre y la mutante *sltAΔ*. La cepa *AN6940Δ* creció sin notables diferencias con la cepa silvestre en todas las condiciones ensayadas y contrastaba con la ausencia de crecimiento de la cepa *sltAΔ*, como era esperable, en presencia de pH alcalino o 200 mM de catión magnesio. Tampoco se observó efecto cruzado por añadir una elevada concentración de calcio, ya que se ha observado la competición entre los dos cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Manoli & Espeso, 2019). Los resultados sugieren que los bajos niveles de expresión de *AN6940* no explican por si solos el fenotipo de sensibilidad al estrés ambiental que causa la mutación *sltAΔ*.



**Figura R.6.1.3.** Análisis de fenotipo de tolerancia a condiciones de estrés por alcalinidad (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), magnesio y calcio en mutantes *sltAΔ* y *AN6940Δ*. En placas de Petri con MMA y suplementado en cada caso (indicado en la parte izquierda del panel), se inocularon conidiosporas de las cepas silvestre (MAD1427), *sltAΔ* (MAD3816) y *AN6940Δ* (MAD8234). Las imágenes fueron tomadas tras una incubación a 37°C durante 48 h.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que la expresión de los genes que codifican para estos transportadores disminuye en condiciones de estrés por altas concentraciones de magnesio extracelular, de modo que en esta sección también analizamos el efecto de esta condición de estrés en los niveles de expresión de estos genes, así como un breve estudio del efecto de este tipo de estrés en el sistema Slt, tanto a nivel transcripcional como de proteína.

Puesto que la función de estos transportadores en *S. cerevisiae* es el transporte de cationes de magnesio se procedió a realizar un ensayo de estrés por alta concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ . A partir de cultivos de las cepas silvestre y *sltAΔ* en MMA durante 16 h a 37°C

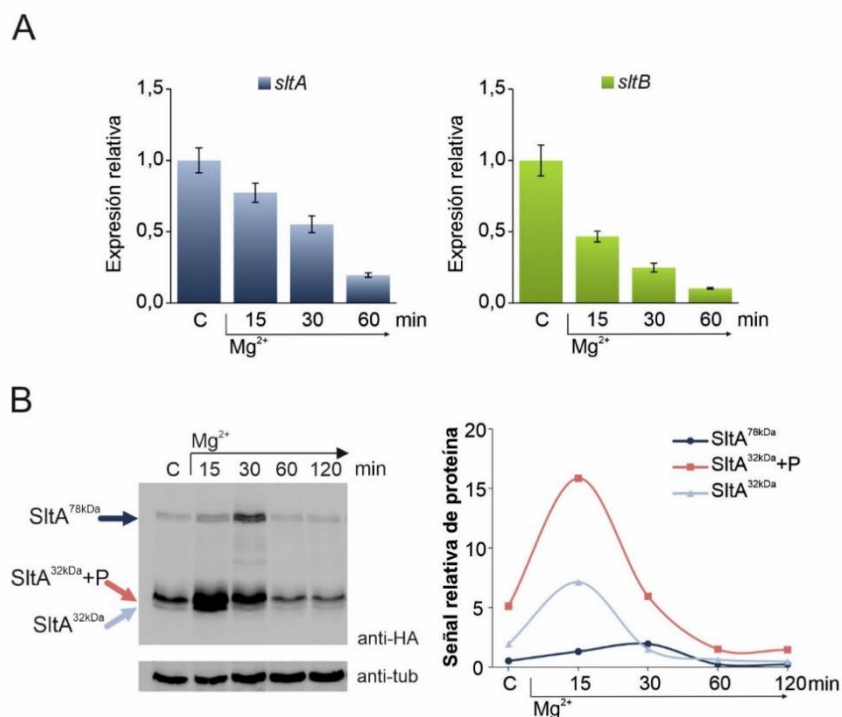


**Figura R.6.1.4.** Análisis de expresión relativa de los genes de la familia ALR mediante qPCR en condiciones de estrés por alta concentración de catión magnesio (200 mM  $MgCl_2$ ). En los fondos genéticos silvestre (WT, MAD3652) y mutante *sltAΔ* (MAD3816) se estudiaron los niveles de expresión de los genes **A)** *AN6940*, **B)** *AN5856*, **C)** *AN3231* y **D)** *AN11138*, en condición de ausencia de estrés (C), y en condiciones de estrés por catión magnesio durante 15, 30 y 60 minutos. El gen de referencia usado fue *AN1182/benA* ( $\beta$ -tubulina) y los niveles de expresión de cada perfil se normalizaron respecto a la condición control en la cepa WT. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas experimentales para cada muestra.

se indujo la condición de estrés añadiendo 200 mM  $MgCl_2$  y recogiendo el micelio tras 15, 30 y 60 minutos de inducción para la extracción de RNA total y posterior generación de cDNA para el análisis de expresión génica mediante qPCR. Para este protocolo de análisis se siguieron los procedimientos estandarizados descritos en Materiales y Métodos (apartados 2, 5 y 7) y en los capítulos 1 y 3 de Resultados. El análisis de los perfiles de expresión de los genes que codifican para estos transportadores mostró una disminución de sus niveles de expresión en el silvestre a lo largo de los 60 minutos de inducción de estrés (Figura R.6.1.4.A-D). En ausencia de función *SlfA* se detectó la caída de los niveles de expresión de *AN6940* en todas las condiciones estudiadas como se había observado en el análisis de RNAseq (Figura R.6.1.4.A). La expresión de los genes *AN5856* y *AN11138* mostraron un leve descenso de los niveles de expresión en la cepa mutante con respecto a la silvestre, aunque se mantuvo cierta regulación de la expresión en respuesta al estrés por catión magnesio (Figura R.6.1.4.B-C). El perfil de expresión de *AN3231* era diferente entre cepas en la condición de estrés, aunque en

ambas se detectó un menor nivel de expresión tras 60 minutos de inducción de estrés ambiental (Figura R.6.1.4.D).

Usando las mismas muestras de cDNA de la cepa silvestre en condiciones de inducción de estrés por 200 mM  $MgCl_2$  se realizó un análisis de qPCR para evaluar la respuesta transcriptómica de los genes *sltA* y *sltB*. En la figura R.6.1.5.A se observa que el efecto de la alta concentración de magnesio genera una respuesta transcripcional muy regulada en ambos genes. Tras 15 minutos de inducción de estrés los niveles de expresión descendieron respecto a la condición control y este descenso se alargó durante los 60 minutos del ensayo. Además del estudio del perfil transcriptómico de *SlfA*, también se analizaron los niveles de proteína *SlfA* en esta condición de estrés. Siguiendo el mismo protocolo de cultivo y de inducción de estrés que el seguido en otros ensayos de estrés ambiental (ver capítulo 1 de Resultados), a partir de la cepa MAD3652 (*SlfA*-HA) se obtuvo el micelio necesario para la extracción de proteína total y el análisis del patrón de procesamiento de *SlfA* en condiciones de estrés por alta concentración de catión magnesio. En la figura R.6.1.5.B se muestra el resultado de la



**Figura R.6.1.5.** Efecto del estrés por alta concentración de cationes de magnesio en el sistema *Slf*. **A)** Perfiles de expresión de los genes *sltA* y *sltB* en respuesta a 200 mM  $MgCl_2$  en una cepa silvestre (MAD3652) usando análisis de qPCR. El gen *AN1182/benA* se usó como referencia para la obtención de los niveles de expresión relativa. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas experimentales para cada muestra. **B)** Inmunodetección de las formas *SlfA*-HA (MAD3652) a partir de extractos de proteína total obtenidos de cultivos en ausencia de estrés (MMA, C) y tratados con 200 mM  $MgCl_2$  durante 15, 30, 60 y 120 minutos. La  $\alpha$ -tubulina se usa como control de carga de proteína total en la cuantificación de la señal relativa de proteína.

inmunodetección de SltA (izquierda) y la cuantificación de la señal relativa de cada una de las formas proteicas (derecha). En ausencia de estrés se detectan las tres formas de SltA de las cuales SltA<sup>32kDa</sup>+P es la que presentó una mayor acumulación. La inducción de estrés por catión magnesio dio lugar a un aumento notable de los niveles de las formas procesadas de 32kDa tras 15 minutos, y la forma primaria se acumuló ligeramente a lo largo de los primeros 30 minutos del análisis. A partir de los 30 minutos se detectó un descenso general de los niveles de proteína de las tres formas, los cuales quedaron por debajo de los observados en ausencia de estrés.

Así, la actividad del factor transcripcional SltA parece estar involucrada también en la respuesta a estrés por aumento de la concentración del catión divalente magnesio en el medio extracelular ya que se observan modificaciones en los perfiles transcriptómicos y proteicos en esta condición de estrés, que además son diferentes a los observados anteriormente en la respuesta a la alcalinidad ambiental o al estrés salino por catión sodio (Comparar con Figura R.1.1). De los genes transportadores de cationes de magnesio de la familia “*Alr1p-like*” (dominio ALR en *S. cerevisiae*), aparentemente solo *AN6940* es dependiente de la función SltA en cualquier condición ambiental, mientras que el resto de transportadores presentan únicamente alteraciones leves en los niveles de expresión tanto en análisis de qPCR como de RNAseq.

## 6.2. Estudio del gen *AN7792* codificante de una lisofosfolipasa

Entre los genes desregulados obtenidos en el RNAseq (Capítulo 2 sección 2.2) en ausencia de SltA independientemente de la condición ambiental encontramos el gen *AN7792* cuyo valor  $\log_2FC$  es -9,8 al comparar las cepas silvestre y *sltAΔ* en ausencia de estrés. La caída de la expresión se mantiene en el fondo nulo *sltA* en ambas condiciones de estrés extracelular. Usando la base de datos FungiDB (<https://fungidb.org/>) y BLASTP en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) encontramos que la proteína codificada por este gen presenta dominios similares a la familia de fosfolipasas cuyos homólogos en *S. cerevisiae* son los genes *PLB1*, *PLB2* y *PLB3* (resultados no mostrados), que actúan como hidrolasas que ayudan a mantener la homeostasis lipídica en la célula así como a generar segundos mensajeros para rutas de señalización (Patton-Vogt & de Kroon, 2020). Debido a esta función se ha propuesto que pueden ser uno de los elementos que participan en la correcta fragmentación vacuolar en levaduras (Michaillat & Mayer, 2013). Mediante la obtención de un mutante *AN7792Δ* hemos decidido analizar la funcionalidad de esta proteína en *A. nidulans* en



En primer lugar, se procedió a la verificación de los resultados obtenidos en el análisis de RNAseq mediante PCR cuantitativa. Al igual que se ha realizado en los genes descritos en apartados previos, a partir de muestras de cDNA en las diferentes cepas y condiciones se analizaron los niveles de expresión del gen en cuestión. En la figura R.6. 2.1.A se observan los niveles de expresión génica de los análisis de RNAseq y qPCR respectivamente. En ambos ensayos en la cepa silvestre a pH 8 los niveles de expresión aumentaron mientras que en el fondo nulo *sltA* no se detectaron niveles de expresión en ninguna de las dos condiciones analizadas.

Tras verificar la variación de los niveles de expresión entre las diferentes cepas, se generó mediante transformación una cepa *AN7792Δ* (MAD7798) para estudiar la tolerancia de este mutante a diferentes condiciones de estrés ambiental y el fenotipo vacuolar. En la figura R.6.2.B se muestra el fenotipo de las cepas silvestre, *sltAΔ* y *AN7792Δ* en diferentes condiciones de estrés catiónico y a pH alcalino. La delección de *AN7792* no afectó al nivel de tolerancia de *A. nidulans* a las condiciones estudiadas y este mutante presenta un crecimiento colonial y esporulación similares a los observados en la cepa silvestre. De modo que el fenotipo de *sltAΔ* en condiciones de estrés no puede explicarse únicamente por unos bajos niveles de expresión del gen *AN7792*.

En segundo lugar, se analizó la morfología vacuolar en hifas del fondo *AN7792Δ*. Para dicho análisis se recurrió a la tinción con el reactivo CMAC que se acumula en endosomas tardíos y vacuolas por su afinidad con el pH ácido del lumen vacuolar (ver protocolo en Materiales y Métodos). La figura R.6.2.C muestra de nuevo las tres cepas usadas en el análisis de crecimiento en placa. En el mutante *AN7792Δ* se observó cierta fragmentación vacuolar en el conidio, en el cual se observa habitualmente una vacuola de gran tamaño, mientras que en la punta de la hifa se detectaron vacuolas con una morfología similar al observado en la cepa *sltAΔ*.

El conjunto de los resultados muestra que los bajos niveles de expresión de *AN7792* en un fondo nulo *sltA* no son los responsables del fenotipo de sensibilidad al estrés ambiental ni del fenotipo de hipertrofia vacuolar descrito en ausencia de este factor transcripcional.

### 6.3. Regulación de la proteína activadora de la función GTPasa de Rab7, *AN6618* (AnGYP7)

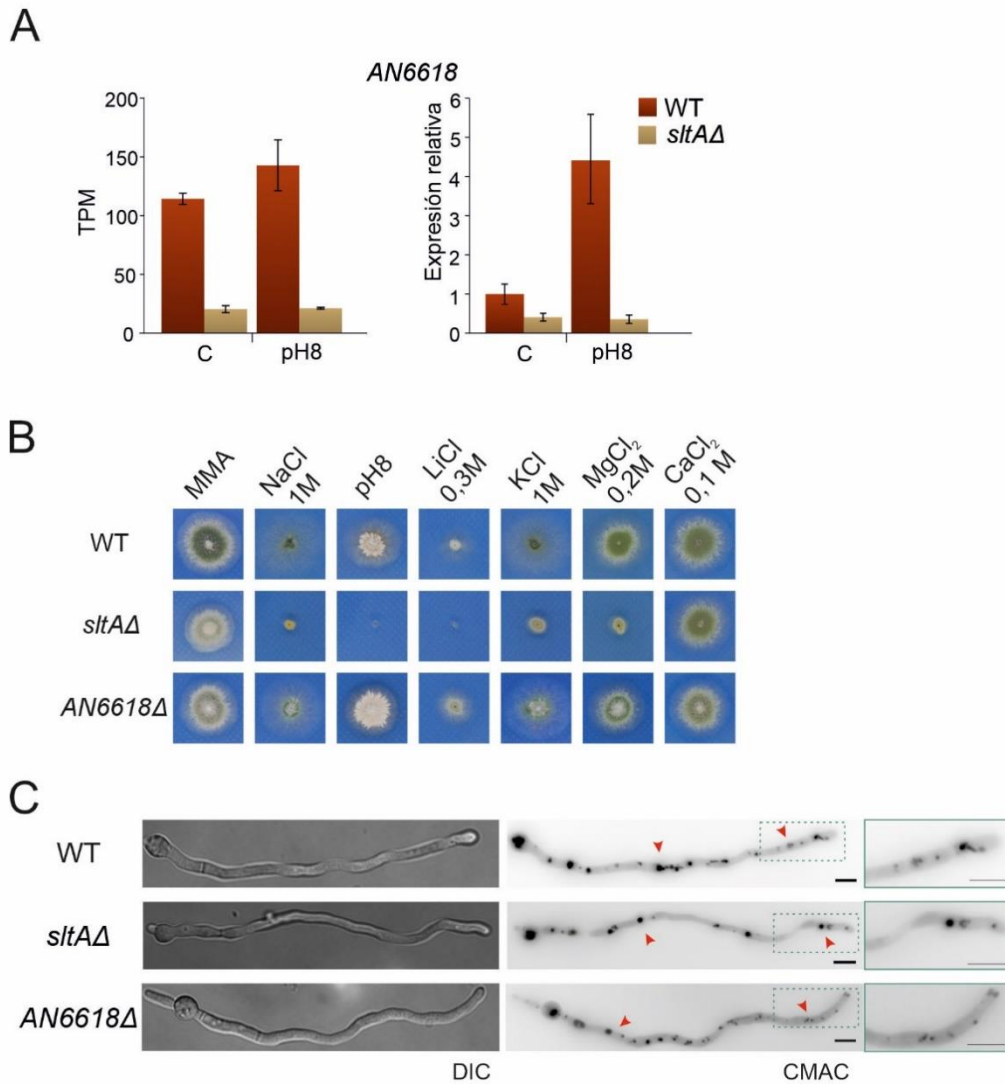
En el análisis de secuenciación masiva de RNA se detectaron 764 genes diferencialmente “*downregulated*” en un fondo nulo *sltA* en ausencia de estrés. Entre

estos genes identificamos el gen *AN6618* ( $\log_2FC=-2,07$ ) cuya expresión era dependiente de *SltA* y presentaba un perfil de expresión similar al observado para el gen *sltB* o *AN7792*. Este gen codifica para un activador de Rab-GTPasas (GAP) y cuyo homólogo en *S. cerevisiae* es *GYP7* (*Gyp7p*). Esta proteína se encarga de activar la función GTPasa de la proteína *Ypt7* cuyos homólogos son *RabS* en *A. nidulans* y *RAB7* en mamíferos (Brett et al., 2008; Pinar et al., 2013). En *S. cerevisiae* se ha descrito que mutantes de sobreexpresión provocan un fenotipo de fragmentación vacuolar en la célula en condiciones de estrés osmótico, mientras que la delección del gen *GYP7* da lugar a un ligero aumento del tamaño vacuolar (Brett et al., 2008; Stroupe, 2018). Dado que la delección de *sltA* resulta en una hipertrofia vacuolar (Findon et al., 2010; Mellado et al., 2015), hemos realizado un estudio funcional en *A. nidulans* del gen *AN6618* con el objetivo de determinar si el fenotipo de hipertrofia en vacuolas en un fondo nulo *sltA* se debe a la expresión a la baja del gen que codifica para esta RabS GAP.

En primer lugar, se procedió a verificar mediante qPCR los resultados de cambios de expresión obtenidos en el análisis de RNAseq. En la figura R.6.3.A se muestran a la izquierda los niveles de expresión (TPM) obtenidos en el análisis de secuenciación masiva, y a la derecha se muestran los niveles de expresión resultantes del análisis de PCR cuantitativa en ambas cepas, silvestre y *sltAΔ*, y en condiciones sin estrés y de estrés por alcalinidad tras 60 minutos. Ambos ensayos muestran un descenso de los niveles de expresión de *AN6618* en ausencia de *SltA* independientemente de la condición ambiental. Este resultado verifica que existe un alto grado de dependencia, directa o indirecta, de *SltA* en la expresión de *AN6618*.

En segundo lugar, se generó mediante transformación de *A. nidulans* una cepa nula para el gen *AN6618* para estudios fenotípicos en diferentes condiciones ambientales, así como para el análisis del sistema vacuolar. En la figura R.6.3.B se muestran los fenotipos de las cepas silvestre, *sltAΔ* y *AN6618Δ* en diferentes condiciones de estrés ambiental. La delección de *AN6618* fue capaz de tolerar todas las condiciones de estrés ambiental analizadas de manera similar a lo observado en la cepa silvestre. Por otro lado, se analizó mediante microscopía de fluorescencia la distribución y tamaño de las vacuolas en las tres cepas mediante una tinción con CMAC.

En la figura R.6.3.C se observó en las tres cepas la presencia de una vacuola de gran tamaño en la conidiospora. En la hifa, las vacuolas de mayor tamaño y con mayor señal se detectan en las zonas basal, próxima a la conidia, y media, mientras que en las regiones próximas a la punta de la hifa esta señal es menor o se forman acúmulos de pequeñas vacuolas o endosomas tardíos. Por otro lado, el mutante *sltAΔ* mostró un



**Figura R.6.3.** Estudio del gen *AN6618*. **A)** Comparativa de niveles de expresión del gen *AN6618* obtenidos en condiciones sin estrés (C) y por estrés por alcalinización ambiental (pH 8) durante 60 minutos en los fondos genéticos silvestre y *sltAΔ*, mediante las técnicas experimentales de RNAseq (izquierda) y qPCR (derecha). Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas experimentales en el caso del análisis de RNAseq y de tres réplicas experimentales en el caso del análisis de qPCR. **B)** Fenotipo de cepa *AN6618Δ* en condiciones de estrés ambiental. Las conidiosporas de una cepa silvestre (MAD2733) y de las cepas mutantes *sltAΔ* (MAD3816) y *AN6618Δ* (MAD7797) se inocularon en placas de Petri con MMA y los compuestos adicionales en cada caso (parte superior del panel B). Las imágenes fueron tomadas tras una incubación a 37°C durante 48 h. **C)** Detección de vacuolas por microscopía de fluorescencia y tinción 10 μM CMAC. Algunas de las vacuolas se señalan mediante puntas de flecha rojas. La zona apical de la hifa marcada con una línea discontinua verde se corresponde con la ampliación en la parte derecha del panel. Las imágenes muestran una máxima proyección de entre 10-15 imágenes en diferentes planos del eje Z, aplicando una exposición de 40 ms usando el filtro DAPI. Las barras representan 5 μm.

fenotipo descrito previamente (Findon et al., 2010), en el que la mayoría de las vacuolas observadas presentaban un tamaño similar a lo largo de toda la hifa y apenas se detectaron vacuolas pequeñas o endosomas tardíos. La delección de *GYP7* en *S. cerevisiae* puede dar lugar a un exceso de fusión homotípica de vacuolas resultando

en un aumento del tamaño de las mismas (Brett et al., 2008; Stroupe, 2018). Sin embargo, la delección del gen homólogo en *A. nidulans*, *AN6618*, no causó cambios en la distribución o tamaño vacuolar y el fenotipo observado fue similar al de una cepa silvestre.

De modo que, aunque la expresión de *AN6618* dependa directa o indirectamente de la función *SltA*, el fenotipo causado por la delección de *sltA* de sensibilidad a estreses abióticos y de alteraciones morfológicas y celulares, no se debe a una menor expresión o funcionalidad de *AN6618*.

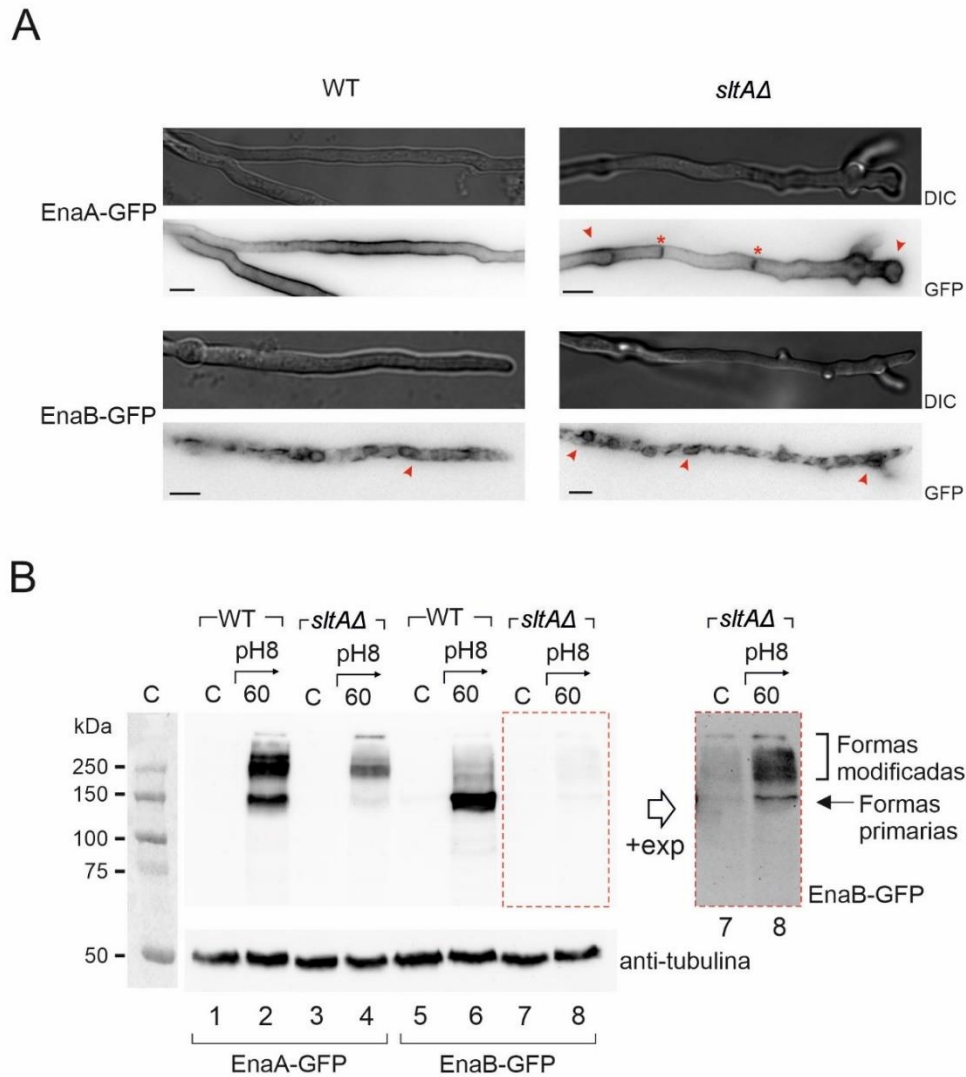
#### 6.4. Localización y detección de las ATPasas EnaA y EnaB en el fondo *sltAΔ*

Entre los transportadores de iones estudiados y descritos en *A. nidulans* que mantienen la homeostasis celular, en el análisis de RNAseq destacan los genes *enaA/AN6642* y *enaB/AN1628* que codifican para ATPasas que median el transporte de cationes de potasio y sodio en condiciones de alcalinidad (Markina-Iñárraegui et al., 2020; Spielvogel et al., 2008). Observando los valores de expresión diferencial, el gen *enaA* presentaba un valor  $\log_2FC = 4,4$  en la cepa silvestre tras la inducción de pH alcalino y un  $\log_2FC = 8,4$  en el fondo nulo *sltA* en respuesta al aumento de pH. Pese a esta regulación al alza a pH 8 en el mutante *sltAΔ*, en ausencia de condiciones de estrés los niveles de expresión fueron significativamente menores en el fondo nulo *sltA* respecto al silvestre. Por otro lado, la expresión diferencial de *enaB* en la cepa silvestre a pH 8 fue de  $\log_2FC = 8,78$  y la alcalinización del medio en la cepa *sltAΔ* dio lugar a un valor  $\log_2FC = 9,98$ . A diferencia de *enaA*, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *enaB* en ausencia de estrés. La funcionalidad conjunta de ambos genes *enaA* y *enaB* son esenciales en la tolerancia de *A. nidulans* a pH 8 y su expresión está regulada por el pH extracelular ya que dependen de la función del factor transcripcional *PacC*, pero es relativamente independiente de la función de *SltA* (Markina-Iñárraegui et al., 2020). En el trabajo desarrollado se ha observado que existe una alteración general en los niveles de expresión de *pacC*, así como en la activación y procesamiento de la forma proteica *PacC* a su forma activa de 27kDa en ausencia de *SltA*, por lo que decidimos estudiar la localización celular y los niveles de proteína *EnaA* y *EnaB* en un fondo nulo *sltA*.

Se obtuvieron cepas que expresaban la fusión *EnaA-GFP* o *EnaB-GFP* en un fondo genético nulo *sltA* (cepa receptora de las construcciones MAD3919). En primer lugar, se realizó un análisis de localización celular de ambas proteínas transportadoras. En la

figura R.6.4.A se muestra la señal de EnaA (paneles superiores) y EnaB (paneles inferiores) en un fondo silvestre y en un mutante *sItAΔ*, tras la inducción de alcalinidad durante 60 minutos necesaria para la observación de las mismas. EnaA se localizó a lo largo de la membrana plasmática en una cepa silvestre como ya se había descrito previamente en Markina-Iñarrairaegui et al. (Markina-Iñarrairaegui et al., 2020). En ausencia de SItA la localización de EnaA no cambió, localizándose en la membrana plasmática y septos (ver asteriscos rojos en la figura R.6.4.A, panel EnaA-GFP). El efecto combinado de la alcalinización del medio y la delección de *sItA* dio lugar a alteraciones morfológicas en *A. nidulans* con una pérdida parcial de la polaridad que da lugar a ramificaciones nuevas a lo largo de la hifa y al ensanchamiento o excesiva ramificación en la punta de la célula (ver flechas rojas en la figura R.6.4.A, panel EnaA-GFP). Por otro lado, en una cepa silvestre, EnaB-GFP mostró fluorescencia en estructuras que bordean los núcleos y desde donde se observan extensiones que se corresponden con el retículo endoplásmico periférico (Markina-Iñarrairaegui et al., 2020) (ver flecha roja en panel EnaB-GFP cepa WT). La delección de *sItA* no causó alteraciones en la localización de este transportador. Sin embargo, se detectó una acumulación de señal EnaB-GFP en la región apical de la hifa (ver flecha roja en el panel EnaB-GFP *sItAΔ*, figura R.6.4. A). La exposición a un medio alcalino en un fondo *sItAΔ* provoca la parada del crecimiento polarizado de la hifa, pero no de procesos celulares como la mitosis, lo que daría lugar aparentemente a una acumulación de núcleos en la punta de la hifa.

Usando estas mismas cepas se obtuvieron extractos de proteína total para la inmunodetección de ambos transportadores (Materiales y métodos, secciones 2 y 10). Al igual que en el ensayo de microscopía, la inducción de alcalinidad ambiental es necesaria para la detección tanto de EnaA-GFP como de EnaB-GFP y en la condición control no se detectó ninguna de las proteínas etiquetadas (Figura R.6.4.B ver filas 1, 3, 5 y 7). En la condición de inducción de estrés alcalino en un cultivo durante 60 minutos permitió la detección de las formas primarias de ambas proteínas, así como la detección de formas modificadas post-traduccionalmente en las cepas silvestres (Figura R.6.4.B, ver filas 2 y 4 para la detección EnaA-GFP, y filas 6 y 8 para la detección de EnaB-GFP). En ausencia de SItA tanto la forma primaria como las formas modificadas de ambas proteínas fueron detectadas, aunque la señal detectada fue menor que la observada en las respectivas cepas silvestres. La inmunodetección de tubulina nos permitió descartar que estas diferencias se debiesen a diferencias de carga de extracto proteico. La inmunodetección de EnaB-GFP en el fondo nulo *sItA* fue mucho menor que la señal de



**Figura R.6.4.** Efecto de la delección de *sltA* en la localización y nivel de proteína de las ATPasas EnaA y EnaB. **A)** Localización celular de EnaA-GFP y EnaB-GFP mediante microscopía de fluorescencia e inducción de estrés por alcalinización del medio (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) durante 1 hora. Las imágenes mostradas se corresponden con una máxima proyección de un stack de aproximadamente 30 planos en el eje Z y aplicando una exposición de 10 ms. Las barras representan 5  $\mu\text{m}$ . Los asteriscos indican los septos de la hifa. Las flechas rojas señalan las estructuras celulares donde se acumulan EnaA-GFP o EnaB-GFP. **B)** Inmunodetección de formas primarias y modificadas post-traduccionamente de EnaA-GFP y EnaB-GFP en fondos *sltA*<sup>+</sup> (MAD25ED y MAD26ED) y *sltA* $\Delta$  (MAD7667 y MAD7668). El panel derecho marcado con líneas discontinuas en rojo muestra la inmunodetección de los carriles 7 y 8 (EnaB-GFP en el fondo mutante *sltA* $\Delta$ ) a los que se aplicó un tiempo de exposición mayor (+exp). La señal de  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga de proteína total.

EnaA-GFP en el mismo fondo mutante, siendo necesaria la aplicación de un mayor tiempo de exposición para la observación de las formas primaria y modificadas post-traduccionalmente. Puesto que los datos de Markina-Iñarrairaegui y colaboradores (Markina-Iñarrairaegui et al., 2020) y los datos de RNAseq (capítulo 2) revelan que la expresión de estos genes es independiente de *SlTA*, es posible que la disminución de

los niveles de proteína observados se deba a la existencia de formas hipermodificadas post-traduccionalmente.

De modo que el efecto de la delección de *sItA* que afecta al procesamiento de PacC para su correcto funcionamiento a pH 8 no impide la activación transcripcional o traducciona l de los transportadores de la familia de las ENA, EnaA y EnaB aunque limita la cantidad de forma primaria y de formas correctamente modificadas post-traduccionalmente.

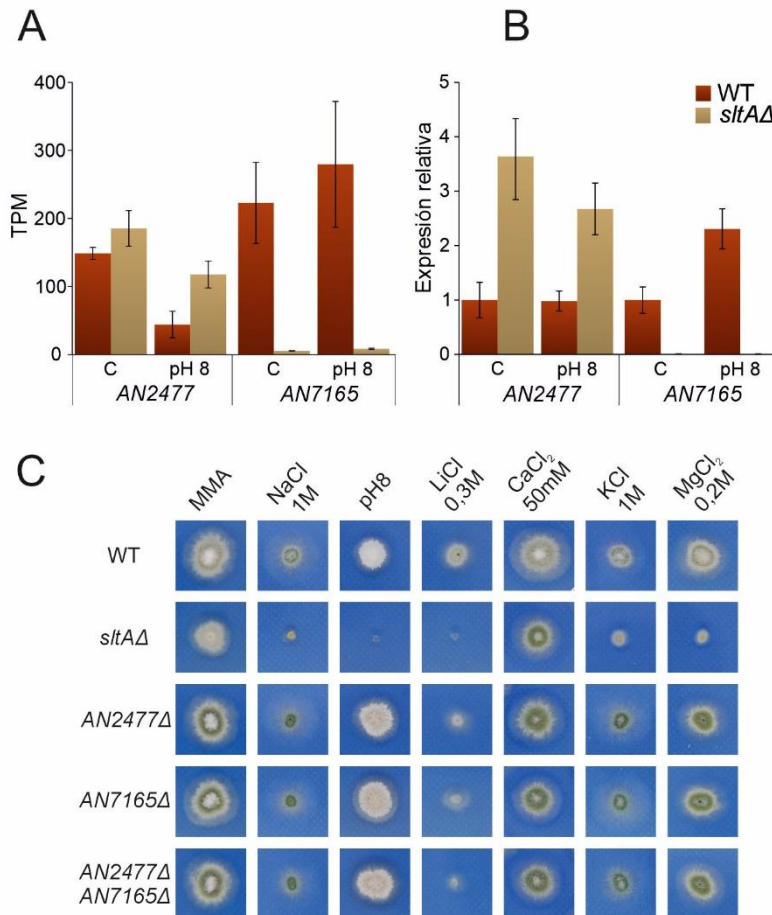
### 6.5. Análisis funcional de los homólogos IST2 en *A. nidulans*

Además de las proteínas transportadoras localizadas en las membranas celulares que ayudan a mantener la homeostasis celular, existen proteínas que se encargan de establecer puntos de contacto entre membranas de diferentes orgánulos con el fin de facilitar funciones de transporte y señalización celular. Un ejemplo en *S. cerevisiae* son las proteínas que conectan la membrana del retículo endoplásmico con la membrana plasmática: TCB1, TCB2, TCB3, SCS2, SCS22 e IST2 (Manford et al., 2012). En *A. nidulans* los genes *AN2477* y *AN7165* son candidatos a codificar posibles homólogos de IST2. En *S. cerevisiae*, *IST2* no es un gen esencial (Entian et al., 1999), y otros pueden suplir su función, sin embargo, nunca se ha determinado su funcionalidad en *A. nidulans* ni su localización celular.

El análisis de RNAseq reveló una posible dependencia de *SItA* de uno de estos homólogos de IST2, *AN7165*, de modo que estos niveles de expresión fueron verificados mediante qPCR tanto para este gen como para el otro homólogo de IST2 *AN2477*. En la figura R.6.5.A se muestran los niveles de expresión en TPM obtenidos en el RNAseq para ambos genes y en la figura R.6.5.B se muestran los niveles de expresión obtenidos en la qPCR. Esta última muestra que el perfil de expresión en respuesta a alcalinidad en la cepa silvestre es similar para ambos genes al compararlo con los resultados de RNAseq, así como el efecto de la delección de *sItA*. El gen *AN2477* aumenta ligeramente su expresión en ausencia de *SItA* en las condiciones analizadas, mientras que la expresión de *AN7165* apenas es detectable en este mutante independientemente del pH ambiental.

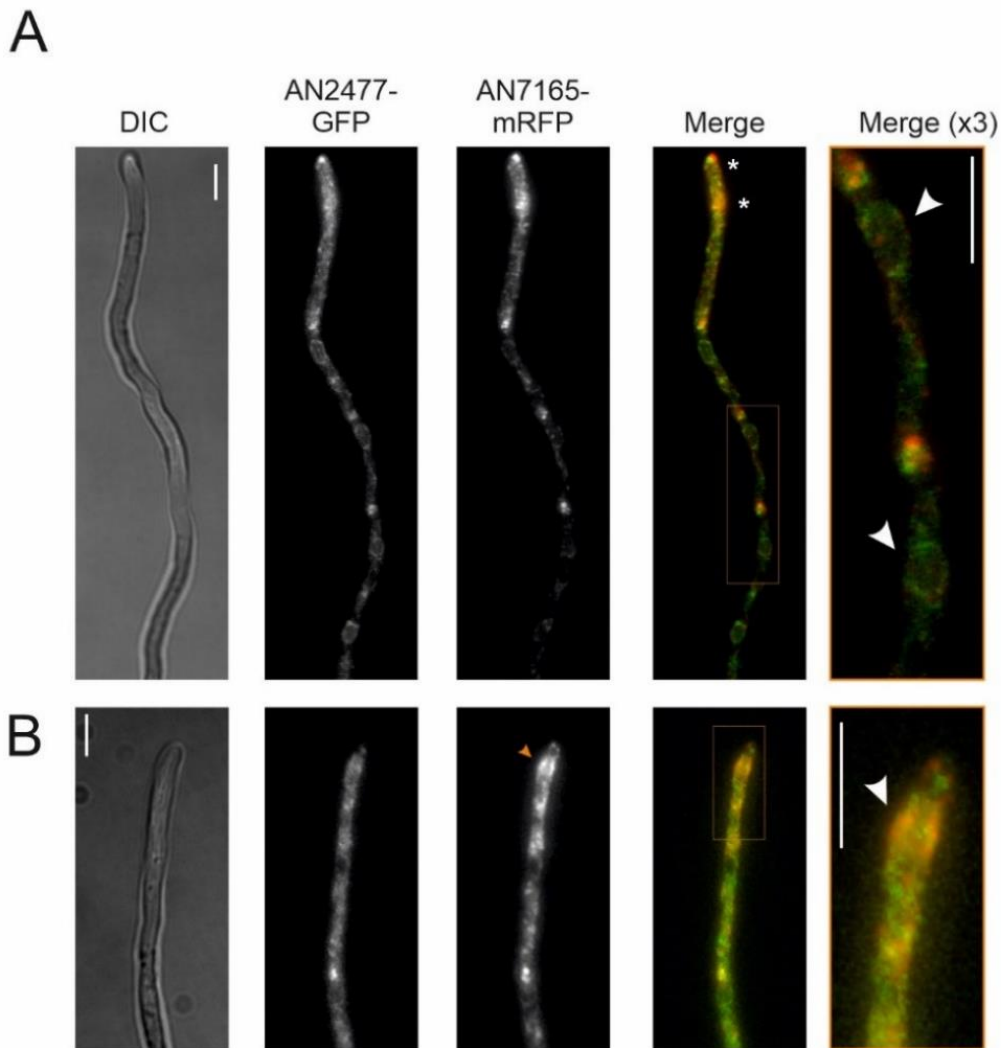
Debido a los bajos niveles de expresión de *AN7165* en un fondo nulo *sItA*, es posible que las funciones de transporte o señalización llevadas a cabo no funcionen correctamente y pueda ser uno de los factores que expliquen el fenotipo de sensibilidad a estrés ambiental en ausencia de función *SItA*. Para este estudio, se generaron

mutantes nulos simples para ambos genes *IST2*, *AN2477* y *AN7165*, y un mutante doble nulo mediante transformación. La figura R.6.5.C muestra el crecimiento colonial de las diferentes cepas mutantes obtenidas. Las tres cepas mutantes para los genes *AN2477* y/o *AN7165* mostraron un fenotipo de tolerancia a todas las condiciones de estrés catiónico y alcalino estudiadas. De modo que los bajos niveles de expresión de *AN7165* en un fondo nulo *sltA* no serían la causa del fenotipo de sensibilidad a las condiciones de estrés ambiental por alcalinidad o alta concentración de cationes.



**Figura R.6.5.1.** Estudio de los genes *AN2477* *AN7165*. **A)** Niveles de expresión de *AN2477* y *AN7165* en respuesta a estrés durante 60 minutos a pH 8 (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) en los fondos genéticos silvestre y *sltA*Δ, obtenidos mediante el análisis experimental de secuenciación masiva de RNA (RNAseq). Los niveles de expresión se miden como transcrito por millón (TPM). **B)** Niveles de expresión de *AN2477* y *AN7165* en respuesta a estrés durante 60 minutos por 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8) en los fondos genéticos silvestre y *sltA*Δ, obtenidos mediante el análisis experimental de PCR cuantitativa (qPCR). En este panel se muestra el nivel de expresión relativa de cada gen respecto al gen de referencia *AN1182/benA*. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas experimentales en el caso del análisis de RNAseq y de tres réplicas experimentales en el caso del análisis de qPCR. **C)** Estudio del fenotipo de las cepas silvestre (WT, MAD1427) y mutantes simples *sltA*Δ (MAD3816), *AN2477*Δ (MAD8230), *AN7165*Δ (MAD8231) y el doble mutante *AN2477*Δ, *AN7165*Δ (MAD8232) en condiciones de estrés ambiental. En placas de Petri con MMA, en las que se añadieron los correspondientes compuestos indicados en la parte superior del panel, se inocularon condiosporas de cada cepa. Las imágenes fueron tomadas tras una incubación a 37°C durante 48 h.

Para el análisis de localización celular los genes *AN2477* y *AN7165* se fusionaron a los marcadores *gfp::pyrG<sup>Af</sup>* y *mRFP::riboB<sup>Af</sup>* respectivamente. En la figura R.6.5.2 se muestran dos hifas que ejemplifican la localización celular de las proteínas AN2477-GFP y AN7165-mRFP (canales verde y rojo respectivamente, ver imágenes “Merge”). En las hifas estudiadas la localización celular para ambas proteínas es aparentemente citoplasmática con una baja colocalización en función de la región de la hifa. La proteína AN2477-GFP mostró una localización muy difusa en el citoplasma y cierta acumulación delimitando los núcleos, por lo que podría corresponderse con una localización en el retículo endoplásmico perinuclear (Figura R.6.5.2.A, flechas blancas “Merge (x3)”)



**Figura R.6.5.2.** Estudio de localización subcelular de AN2477 y AN7165. Detección por microscopía de fluorescencia AN2477-GFP (fluorescencia verde en los paneles “Merge”) y AN7165-mRFP (fluorescencia roja en los paneles “Merge”). **A)** Hifa en la que se observa la acumulación de ambas proteínas en la zona terminal de la hifa indicada con asteriscos, mientras que las puntas de flecha blancas indican el retículo endoplásmico periférico. **B)** Hifa en la que se observa una acumulación de ambas proteínas en el anillo endocítico (flechas naranja y blanca). En la detección de ambas proteínas se aplicó una exposición de 200 ms y se realizó la máxima proyección de un “stack” de 5-8 imágenes. Las barras indican 5  $\mu$ m.

aunque los resultados eran variables (ver AN2477-GFP en figuras R.6.5.2.A-B). En el caso de la proteína AN7165-mRFP la señal perinuclear fue menor y la fluorescencia se acumuló hacia la región apical pudiendo detectarse en la punta de la hifa (fig6.5.2. A), que podría corresponderse con el “*Spitzenkörper*”, o en la región apical próxima al anillo endocítico (Figura R.6.5.2.B).



# Discusión



## 1. El significado de la respuesta transcripcional al sodio y al pH alcalino ambiental

Frente a un estímulo externo las respuestas celulares pueden ser variadas, producirse en diferentes intervalos de tiempo y ser generales o específicas del estímulo. Así, en determinadas condiciones de estrés ambiental se pueden encontrar respuestas o efectos diferentes a corto, medio y largo plazo. El análisis fenotípico clásico es un claro ejemplo del estudio del efecto a largo plazo donde se analiza si una cepa de *A. nidulans* crece en una condición de estrés, como sería en el caso de esta tesis por alta concentración de sodio o en un ambiente alcalinizado (Figura R.4.2 en la sección de Resultados) (Picazo et al., 2020). Es por lo tanto esperable que las respuestas a corto y medio plazo también sean diferentes y ofrezcan matices que nos permitan entender mejor como se modulan dichas respuestas. La respuesta a corto y medio plazo se puede observar en los cambios en el patrón transcripcional y, posteriormente en el medio y largo plazo se esperarían cambios en el proteoma.

En el estudio de la respuesta a corto y medio plazo encontramos cambios en el patrón transcripcional. Entre las técnicas usadas para estudiar los cambios de expresión en diferentes condiciones experimentales, actualmente se recurre a la secuenciación masiva de RNA (RNAseq). En estudios llevados a cabo mediante esta técnica se ha detectado que la mayoría de los genes expresados diferencialmente en respuesta a un estrés ambiental presentan un pico de expresión a los treinta minutos de la inducción de la condición de estrés (Antal et al., 2020; Loss et al., 2017). En este trabajo de tesis además de tratar de explicar el efecto transcripcional de la alcalinización ambiental y de la respuesta a estrés por elevada concentración de sodio mediante RNAseq, se ha estudiado cual es el papel regulador del factor transcripcional SltA en dichas condiciones de estrés. El patrón proteolítico de SltA y el equilibrio entre sus tres formas es más homogéneo tras sesenta minutos en las condiciones de estrés por alcalinización (pH 8) y elevados niveles de sodio (1M Na<sup>+</sup>), por lo que se optó por estudiar que ocurre con el patrón transcripcional tras sesenta minutos en lugar de los treinta minutos de inducción usados en otros trabajos similares (Picazo et al., 2020) (Figura R.1.1 y R.1.2 en la sección de Resultados). Este tiempo sigue siendo biológicamente significativo para poder detectar cambios transcripcionales, principalmente a medio plazo.

Los resultados resumidos en el análisis de PCA muestran como efectivamente independientemente de la cepa, la respuesta transcripcional es diferente según el tipo de estrés inducido durante sesenta minutos (Figura R.2.1.B en la sección de Resultados). De modo que, aunque normalmente el pico de expresión de muchos genes

se encuentre en tiempos experimentales de treinta minutos, mayores tiempos de inducción de un estímulo de estrés mantienen un patrón transcripcional diferente al descrito en la condición sin estrés. Este nuevo tiempo de análisis permite incluso detectar la expresión diferencial de genes que se activen como consecuencia de la respuesta a corto plazo previa y que formen parte, por ejemplo, de rutas relacionadas con el metabolismo secundario que ocurren en la respuesta a medio y largo plazo.

Cuantitativamente se evalúa el número de genes diferencialmente expresados al alza o a la baja a pH 8 o en 1M Na<sup>+</sup> con respecto a la condición sin estrés ambiental. En total el pH alcalino tiene un efecto de expresión diferencial sobre un 10% del genoma, mientras que la alta concentración de catión sodio supone un cambio de expresión significativo en un 2% del genoma. Estos resultados indican, como se ha sugerido previamente, que en *A. nidulans* y otros hongos filamentosos del género *Aspergillus*, no se ha detectado una respuesta común frente a eventos de estrés ambiental como sí ocurre en levaduras como *S. cerevisiae*, en la que se han identificado una serie de genes que actúan conjuntamente en esta respuesta a estrés y que se ha definido como “*core stress response*” (Andersen et al., 2008; Antal et al., 2020; Brown et al., 2017; Loss et al., 2017). La respuesta común está formada por la expresión diferencial de hasta un 10% del genoma en *S. cerevisiae*, mientras que en el caso de *Aspergillus*, esta respuesta común apenas alcanzaría el 1%. La falta de la detección de una respuesta común en hongos filamentosos puede deberse al tiempo experimental de análisis. Normalmente el estudio del transcriptoma en *Aspergillus* se ha llevado a cabo estudiando el efecto a largo plazo de diferentes condiciones ambientales (Emri et al., 2015; Salazar et al., 2009) mientras que en estudios donde se ha analizado un perfil temporal a corto y medio plazo como en Loss y colaboradores (Loss et al., 2017) el máximo número de genes expresados diferencialmente en una condición de estrés por cation calcio ocurre en tiempo inferiores a treinta minutos, mientras que la repuesta a pH alcalino es gradual y el mayor número de DEGs se detectan tras sesenta minutos de inducción (Loss et al., 2017). Así, aparentemente la respuesta transcripcional a eventos de estrés ambiental generaría una respuesta más específica en hongos filamentosos frente a la respuesta descrita en levaduras. Futuros análisis transcriptómicos estableciendo diferentes tiempos inferiores a sesenta minutos de inducción de estrés ambiental podrían ayudar a describir una posible “*core stress response*” en *Aspergillus*.

Además de una falta de respuesta común frente a las condiciones de estrés ambiental, la proporción de genes cuya expresión aumenta o disminuye también ha resultado ser diferente en función del tipo de estrés ambiental inducido. En cualquier condición es esperable que haya una respuesta transcripcional positiva y negativa debido a la

actividad de proteínas reguladoras o factores de transcripción que actúan como activadores, represores o ambos (Ma, 2005). En la condición de estrés por alcalinidad la respuesta transcripcional implica que casi el 70% de los DEGs se encuentra regulado a la baja, es decir, su expresión desciende en esta condición con respecto a la condición sin estrés, mientras que, la inducción de estrés por 1M Na<sup>+</sup> genera una respuesta transcripcional equilibrada donde aproximadamente el 50% de los DEGs se encuentra regulado al alza y el otro 50% a la baja. Estas diferencias en el número de genes regulados al alza y a la baja en cada condición indican que es poco probable que exista una respuesta común porque además de existir pocos DEGs coincidentes, los que se expresan diferencialmente también lo hacen de manera diferente.

La disminución significativa de los niveles de expresión en la mayoría de los DEGs a pH 8 indica que el impacto de este estímulo es más relevante que el estrés celular causado por elevadas concentraciones de sodio. La alcalinización ambiental podría generar respuestas a corto y medio plazo relacionadas con la inactivación temporal de ciertas rutas metabólicas que afectasen al crecimiento de las hifas. En ambos casos lo que sí se esperaba es la activación de rutas o factores transcripcionales que promuevan la expresión de genes que codifiquen para proteínas transportadoras que medien en la protección celular mediante el restablecimiento del equilibrio osmótico entre el medio intracelular y extracelular o señalizando rutas del tráfico intracelular para el almacenamiento de los agentes nocivos en compartimentos celulares como las vacuolas o para la activación de otros sistemas de regulación transcripcional.

Aunque los genes expresados diferencialmente en ambas condiciones de estrés son relativamente escasos, sí observamos que las proteínas codificadas por los DEGs en cada condición de estrés pertenecen a familias comunes y que por lo tanto pueden llevar a cabo funciones similares. Tanto el efecto del pH alcalino como del exceso de catión sodio genera un cambio de expresión en genes que codifican principalmente para proteínas transportadoras de tipo MFS y ABC y, en genes que codifican para factores de transcripción putativos. La amplia superfamilia que forman las proteínas con dominios de tipo transportador ya sea MFS o ABC se han descrito como elementos que mantienen la homeostasis celular y pueden responder además a eventos de estrés ambiental, incluyendo la resistencia a fármacos (de Vries et al., 2017; Del Sorbo et al., 2000), pero la mayoría de estas proteínas apenas se han estudiado a fondo individualmente, lo que nos impide entender que supone la regulación al alza o a la baja de sus genes. La inducción o represión en las condiciones ensayadas en este trabajo ayudarían en futuros estudios de dichas proteínas.

Por otro lado, aunque en todas las comparaciones el segundo grupo más representativo estaba formado por proteínas con una posible función como regulador transcripcional, el efecto fue mayor bajo estrés por alcalinidad que por exceso de sodio. El hecho de que un mayor número de proteínas reguladoras estén diferencialmente expresadas a pH 8 podría explicar las diferencias en el cambio del patrón transcripcional ya que la regulación al alza o a la baja de genes como *pacC*, *sltA* o *crzA* o la actividad de los resultantes factores de transcripción puede dar lugar a la regulación de la expresión de otros factores de transcripción o de otras proteínas estructurales resultando en las redes de regulación transcripcional, las cuales son complejas y difíciles de conectar entre sí con los datos disponibles actualmente.

Es importante destacar que, en este trabajo, entre todos los DEGs detectados en estas condiciones de estrés ambiental, aproximadamente el 20% son genes que codifican para proteínas cuyos dominios y funciones se desconocen por completo. Esta proporción aumenta si incluimos a aquellos genes cuyas proteínas presentan un dominio con una posible homología o una predicción de su localización, pero las cuales no se han identificado como tal ni se ha descrito su función en *A. nidulans* u otros hongos. Este resultado genera cajas negras de información en las redes de regulación transcripcional que participan en la respuesta a estrés ambiental y de nuevo interfieren en la capacidad de explicar lo que supone el estrés ambiental por alcalinización del medio o por altas concentraciones de sodio. Por otro lado, esta apreciación es un ejemplo del enorme potencial de *A. nidulans* y otros hongos filamentosos en la adaptación a una gran variedad de ambientes y abre la puerta al descubrimiento de nuevas proteínas, “clusters” de genes o a elementos que pertenecen a sistemas descritos pero que no estarían completamente explicados.

## 2. El modelo de regulación del sistema Slt en respuesta a estrés ambiental

La regulación transcripcional está mediada por los factores de transcripción. La función de estos suele producirse en momentos o condiciones específicas siendo regulados por las denominadas rutas de señalización. Así por ejemplo, en condiciones de estrés por aumento del pH ambiental y/o de la concentración de calcio en el medio extracelular, se han identificado los elementos que forman parte de las rutas de señalización que activan a los factores de transcripción PacC y CrzA en hongos del filo Ascomycota (Peñalva et al., 2008; Spielvogel et al., 2008). La regulación de la señalización de PacC es trazable en función del pH extracelular. Cuando el pH ambiental es ácido encontramos

preferentemente la forma PacC<sup>72kDa</sup>, la forma primaria de traducción. Actualmente se ha adjudicado una función transcripcional negativa para PacC<sup>72kDa</sup> y durante mucho tiempo se le ha clasificado como una forma “inactiva”. A pH alcalino, por acción de la ruta señalizadora Pal y del proteosoma, esta forma de 72kDa se proteoliza a una forma intermedia de 53kDa y esta a su vez en la forma de 27kDa que actúa como regulador transcripcional activador y represor (H. N. Arst & Peñalva, 2003b; Espeso et al., 1993; Tilburn et al., 1995). A medida que el hongo se adapta a esta nueva condición ambiental el sistema se acomoda a unos niveles estabilizados de las diferentes formas de PacC así como de expresión transcripcional (Bussink et al., 2015; Peñalva & Arst, 2002).

En el modelo de señalización descrito para el factor CrzA se describe una regulación temporal en la que la forma fosforilada de CrzA se encontraría inactiva en el citosol en condiciones estándar de ausencia de estrés (Hernández-Ortiz & Espeso, 2013). Frente a eventos de estrés ambiental como pH alcalino o aumento de la concentración de calcio se activa la función de la proteína fosfatasa calcineurina que se encarga de modular el grado de fosforilación de CrzA. La defosforilación de CrzA modifica la localización de este factor transcripcional siendo entonces transportado al interior del núcleo y completando así su función como regulador transcripcional (Hernández-Ortiz & Espeso, 2013).

El factor de transcripción SltA también es necesario para tolerar la alcalinización del pH ambiental, y además está involucrado en la resistencia a altas concentraciones de diferentes cationes y aniones (Spielvogel et al., 2008; Villarino et al., 2017). Desde el punto de vista genético y funcional, nuestro conocimiento de los elementos que componen el sistema Slt se reduce al propio factor transcripcional SltA y a su proteasa procesativa denominada SltB. Durante la realización de la tesis doctoral de la Dra. Laura Mellado se realizó una rápida aproximación al efecto de los estreses por pH alcalino y elevada concentración de sodio sobre las formas detectables mediante inmunodetección de las proteínas SltA y SltB (Mellado, 2014). En este trabajo se ha profundizado en estos efectos.

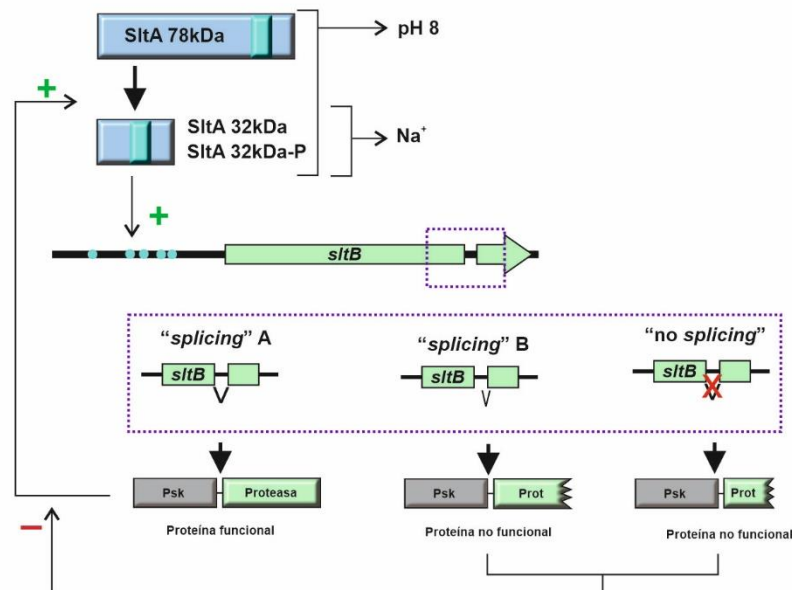
El estudio del patrón proteolítico y de fosforilación de SltA, (ver figura R.1.1 en la sección de Resultados), muestra que la regulación del sistema Slt puede estar basado en el control de las proporciones de cada forma de SltA de manera específica al tipo de estrés ambiental. En ausencia de estrés se observa el procesamiento proteolítico de SltA<sup>78kDa</sup> y la fosforilación de SltA<sup>32kDa</sup>. El incremento del sodio extracelular causa una elevación de las formas SltA<sup>32kDa</sup> con un máximo a los 30 minutos. La alcalinización del pH ambiental causa también una subida de la forma SltA<sup>32kDa</sup> fosforilada pero también de la

forma SltA<sup>78kDa</sup> a los 30 minutos. Este efecto es temporal y, tras 120 minutos de inducción de los estreses, las proporciones relativas de las tres formas cambian con una tendencia que puede aproximarse a los valores inicialmente medidos. Estos resultados evidenciaron que la acumulación de la forma SltA<sup>32kDa</sup>, y la consiguiente reducción en la forma SltA<sup>78kDa</sup>, es una respuesta específica al exceso de sodio extracelular. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos del análisis funcional de la forma truncada que inicia en la metionina 400 (SltA<sup>Met400</sup>) (Mellado, 2014). Una cepa que expresa esta proteína mutante muestra un fenotipo de sensibilidad al pH alcalino, pero es tolerante al sodio. Por lo tanto, la presencia de la forma SltA<sup>78kDa</sup> debe ser necesaria para poder tolerar la alcalinidad ambiental. En un fondo mutante *sltBΔ* o de pérdida de función total de SltB, se acumula la forma SltA<sup>78kDa</sup>, sin embargo, estas cepas no toleran ni el pH alcalino ni el exceso de sodio (Mellado et al., 2015) (Figura R.4.2 en la sección de Resultados). Por lo tanto, la forma SltA<sup>78kDa</sup> es candidata a tener una función a pH alcalino de forma coordinada con las formas SltA<sup>32kDa</sup> que si parecen ser suficientes para mantener el crecimiento en sodio. Para el mantenimiento de estos equilibrios entre las formas de SltA hipotetizamos que deben de existir tanto mecanismos de señalización en SltA y SltB, como la existencia de elementos alternativos que formen parte del sistema señalizador Slt

Los estudios transcriptómicos realizados en este trabajo nos han permitido profundizar en la regulación transcripcional mediada por la función SltA. El análisis de secuenciación masiva de mRNA nos ha proporcionado una información completa de la regulación del genoma dentro de una ventana de análisis de inducción de estrés (Picazo et al., 2020). Los perfiles de expresión por qPCR aportaron un espectro más amplio sobre el modo de regulación transcripcional de un número determinado de genes, incluidos *sltA* y *sltB* (Figura R.1.2 en la sección de Resultados). Observamos que los niveles de expresión de *sltA* y *sltB* se incrementan significativamente cuando se alcaliniza el pH o se añadió sodio al medio. Sin embargo, el patrón transcripcional fue diferente en ambas condiciones para los dos genes. Los niveles de *sltA* se incrementaron hasta más de 15 veces a los 30 minutos a pH alcalino, y en sodio no superaron las 7 veces. La dinámica de *sltB* fue la opuesta, elevándose en presencia de sodio a los 30 minutos hasta más de 30 veces, mientras que a pH 8 no subió de 10 veces a los 15 minutos. El incremento de expresión de *sltB* podría indicar elevación de los niveles de SltB y por lo tanto justificarían los reducidos niveles de SltA<sup>78kDa</sup> que serían procesados a la forma de 32 kDa. La elevación de los niveles de *sltA* a pH8 y la menor expresión de *sltB* estaría de acuerdo con la acumulación de la forma primaria SltA<sup>78kDa</sup> dado que existiría más

traducción y menor procesamiento por los niveles más reducidos de SltB. El etiquetado de SltB es complejo y no permitió verificar el anterior modelo regulatorio.

La figura D.1 presenta un modelo actualizado de la regulación cruzada entre SltA y SltB a partir de los datos previos y los obtenidos en esta tesis. Teniendo en cuenta que la expresión de *sltB* tiene una fuerte dependencia de la actividad reguladora de SltA y a su vez, el procesamiento del factor transcripcional es dependiente de la actividad de SltB (Mellado et al., 2016), las diferencias observadas en los niveles de expresión de ambos genes, así como la variación de la proporción de las formas de SltA según la condición de estrés inducida, ayudarían a explicar la regulación del sistema Slt. Así, en condiciones de estrés por sodio se necesitaría principalmente la función de la forma de SltA<sup>32kDa</sup>, lo que requeriría un aumento de los niveles de SltB para procesar SltA<sup>78kDa</sup>. Por otro lado, en condiciones de alcalinidad se necesitaría un nivel menor de proteína SltB para limitar el procesamiento de SltA<sup>78kDa</sup>, pero ¿Cómo es capaz de autorregularse el sistema retornando las formas de SltA a las proporciones previas al estrés?



**Figura D.1.** Modelo de señalización del sistema Slt en respuesta a estrés ambiental por elevadas concentraciones de catión sodio o por pH alcalino. Posibles mecanismos de regulación del procesamiento de SltA según el tipo de estrés inducido a través de diferentes formas de SltB generadas por "splicing" alternativo en su único intrón. El "splicing" A es el más frecuente y el único que da lugar a una proteína SltB funcional. Las formas no funcionales generadas por "splicing" B o la ausencia de "splicing" ayudaría a regular el nivel de procesamiento de SltA<sup>78kDa</sup>. El promotor de *sltB* cuenta además con cinco dianas de unión de SltA (indicadas en azul) sobre las que las formas procesadas de SltA<sup>32kDa</sup> podrían llevar a cabo su función de regulación transcripcional positivo. Este modelo generaría una situación de equilibrio entre la expresión de *sltB* y los niveles de las distintas formas de SltA que puede cambiar para adaptarse a cada condición de estrés ambiental.

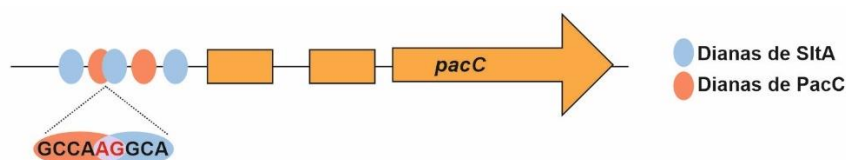
Los datos transcriptómicos nos permiten aproximarnos a una nueva hipótesis sobre la posible autorregulación de *sItB*. En ciertas condiciones de cultivo el único intrón de *sItB* puede procesarse por “*splicing*” alternativo y dar lugar a una proteína diferente. La proporción de esta forma alternativa denominada B es baja en condiciones de cultivo de medio mínimo suplementado con tartrato de amonio como fuente de nitrógeno (Mellado et al., 2015). La posibilidad de que exista un “*splicing*” alternativo generando dos formas, una funcional (Figura D.1, “*splicing*” A) y otra claramente disfuncional (dado que carece de dominio proteasa, específicamente del residuo responsable de la función serin-proteasa Ser1142) (Figura D.1, “*splicing*” B) podría explicar las diferencias tanto a nivel de transcripción como de traducción de SItA en las condiciones de estrés por pH ambiental alcalino y por altas concentraciones de sodio. Además, en nuestros resultados se detectó también el no procesamiento del intrón (Figura D.1, “*no splicing*”) (resultados no mostrados) que resultaría en una proteína disfuncional similar a la forma B, dando lugar a un complejo equilibrio entre proteínas SItB que modularan el procesamiento de SItA. El estudio de cómo se equilibran estas formas de SItB así como su funcionalidad en diferentes condiciones de estrés ayudaría a comprender el modelo de regulación del sistema SIt.

### 3. La conexión entre los sistemas SIt y Pal/PacC: la importancia de la función SItA sobre PacC

¿Que hemos aprendido sobre la regulación transcripcional de *pacC*? Como se ha descrito en los apartados anteriores de esta sección, así como en las secciones de Introducción y Resultados, la correcta expresión del gen *pacC* y la funcionalidad de este factor transcripcional son requisitos para observar un fenotipo de tolerancia a la alcalinización ambiental. Antes de esta tesis doctoral, los niveles de expresión de *pacC* en respuesta a estreses ambientales, en especial la alcalinización del pH, se han estudiado esencialmente aplicando técnicas de *Northern Blot* (Bussink et al., 2015; Markina-Iñarrairaegui et al., 2020). En este trabajo hemos usado técnicas de secuenciación masiva de mRNA y PCR cuantitativa (Loss et al., 2017; Picazo et al., 2020).

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten establecer de forma más precisa el patrón transcripcional de *pacC* a la alcalinización del pH ambiental. Los datos de PCR cuantitativa muestran que los niveles de expresión de *pacC* aumentan siete veces tras al menos 15 minutos en condiciones de alcalinidad, manteniendo esta elevación durante más de 60 minutos. El aumento de los niveles de expresión de *pacC* en respuesta a pH

alcalino se atribuyeron en un principio a la actividad de la forma procesada PacC<sup>27kDa</sup>, la cual tiene un papel regulador positivo sobre la expresión de algunos genes (“*alkaline expressed genes*”) y negativo sobre otros (“*acid expressed genes*”). Basándonos en este modelo, *pacC* se clasificó como gen expresado a pH alcalino autorregulado positivamente por la forma procesada PacC<sup>27kDa</sup> (Tilburn et al., 1995) Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la forma primaria de PacC, PacC<sup>72kDa</sup>, tenía un papel negativo en los niveles de expresión del propio gen. Así, el aumento de los niveles de expresión de *pacC* a pH ambiental alcalino se debía en realidad a una desrepresión por el procesamiento de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> en favor de las formas PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup>. Este mecanismo permite la autorregulación de la expresión de *pacC* para la respuesta a cambios en el pH ambiental y la parada del sistema tras la adaptación a largo plazo mediante la acumulación de PacC<sup>72kDa</sup> que ha sido sintetizada *de novo* (Bussink et al., 2015). Los resultados de RNAseq y PCR cuantitativa mostrados en este trabajo confirman este perfil de expresión y además ponen los cimientos para incorporar un nuevo mecanismo regulatorio en la activación de los niveles de expresión de *pacC* a través de la función del factor de transcripción SltA. En ausencia de SltA, los niveles de expresión de *pacC* no se elevan en la misma medida que lo observado en una cepa silvestre en condiciones de estrés por alcalinización ambiental (ver figura R.2.3.2.J en la sección de Resultados). El papel regulador de SltA sobre *pacC* adquiere importancia ya que la ausencia de *sltA* no afecta solo a la expresión de *pacC* tras 60 minutos de inducción de pH alcalino, sino que desregula todo el perfil de expresión desde los 15 minutos a las 2 horas de inducción de estrés ambiental (ver figura R.3.1 en la sección de Resultados). La regulación de *pacC* por SltA podría ser mediada directamente por la interacción del factor de transcripción SltA con la región promotora de *pacC* (Figuras D.2. y D.3). Sin descartar posibles acciones de SltA sobre elementos, conocidos o no, que formen parte del circuito regulador del sistema Pal/PacC. En la región promotora de *pacC* existen varias secuencias diana de unión para el propio PacC (5' GCCAAG 3') y tres secuencias diana para SltA (5' AGGCA 3'), de las cuales una presenta una parte común con una de las secuencias diana de unión a DNA de PacC (Figura D.2).



**Figura D.2.** Dianas de unión putativas de SltA y PacC en el promotor de *pacC*. La región promotora de *pacC* posee dos sitios con la secuencia consenso/diana de PacC (5'-GCCAAG-3', indicado en naranja, y con tres sitios diana de SltA (5'-AGGCA-3', indicado en azul). el solapamiento entre el primer sitio de unión de PacC y el segundo sitio de unión de SltA se indica en la parte inferior de la figura (ver nucleótidos marcados en rojo).

La presencia de estos sitios de unión putativos de SltA al promotor de *pacC* abre la puerta al estudio de las relaciones entre las diferentes formas de PacC y SltA, y su posible interacción o distinta afinidad por cada una de sus posibles dianas en el promotor de *pacC*. Un punto adicional de interés es el hecho de que esta relación PacC/SltA queda restringida a los hongos del filo Pezizomycotina que incluye una mayoría de hongos filamentosos de gran interés clínico y biotecnológico.

El trabajo desarrollado por Bussink y colaboradores introdujo un nuevo elemento en el control de la expresión de *pacC*, el factor transcripcional PacX, portador de un dominio de unión a DNA de tipo “*binuclear zinc cluster*” (Bussink et al., 2015). Este mecanismo regulatorio se sumaría al de la autorregulación de PacC, y de la regulación positiva mediada por SltA. El papel asignado a PacX ha sido el de regulador negativo. En este trabajo hemos abordado el estudio genético y transcripcional de eliminar el control positivo mediado por SltA y del negativo ejercido por PacX. La pérdida de función de PacX mediante la mutación *pacX20* en el fondo nulo *sltA* no fue capaz de rescatar los niveles de expresión de *pacC*, apoyando la hipótesis de SltA como un regulador principal. El sistema Pal/PacC estaría meticulosamente coordinado en condiciones de alcalinidad ambiental con diferentes sistemas de control transcripcional tanto negativo como positivo. El promotor de *pacX* cuenta con una diana de unión SltA, pero carece de dianas de unión de PacC (resultados no mostrados). La ausencia de SltA reduce también la elevación que causa el pH alcalino sobre la expresión de *pacX*. La posible función directa de SltA sobre *pacX* queda pendiente de ser estudiada. Se desconoce cuál es la secuencia reconocida por el “*binuclear zinc cluster*” de PacX. Aparentemente, la función de PacX queda restringida a PacC dado que no se han observado cambios en la expresión de *palF* ni en *sltA* o *sltB*. El futuro análisis funcional de los promotores de estos genes permitirá establecer el conjunto de mecanismos reguladores de la transcripción en respuesta al pH ambiental alcalino en hongos filamentosos.

SltA no solo regula la expresión de *pacC* y *pacX*. Entre los genes que componen la ruta de señalización Pal solo la expresión del gen *palF* está regulada por el pH ambiental y al contrario de lo que ocurre con la expresión de *pacC*, el incremento del pH provoca una regulación a la baja de los niveles de expresión de *palF* (Bussink et al., 2015). En el fondo nulo *sltA*, *palF* pierde su expresión diferencial (ver figuras R.2.3.2.J y R.3.3.1 en la sección de Resultados). Al igual que ocurría con *pacC*, es posible que exista también un papel regulador de SltA sobre la expresión de *palF* aunque en este caso esta regulación sería indirecta debido a que el promotor de *palF* carece de sitios de unión de SltA. En Bussink y colaboradores (Bussink et al., 2015) se propuso un papel regulador transcripcional negativo de PacC<sup>53kDa</sup> y PacC<sup>27kDa</sup> sobre los niveles de

expresión de *palF*. Esta tesis ofrece una posible explicación a los cambios observados en la regulación de *palF* en ausencia de *sltA* y que se sustentan sobre los efectos observados en el perfil proteolítico de PacC y que se discuten a continuación.

¿Cómo afecta la ausencia de SltA a la señalización del sistema Pal/PacC? Más allá de la regulación transcripcional de SltA sobre *pacC*, en esta tesis nos enfocamos a estudiar cómo la ausencia de SltA está afectando a la función, localización y niveles de proteína de elementos clave en el sistema de regulación Pal/PacC en condiciones de pH alcalino. Los niveles de proteína PacC en ausencia de SltA apenas se vieron afectados respecto a lo esperado por la disminución en los niveles de expresión a pH 8. Sin embargo, se detectaron cambios en el patrón de proteólisis de PacC a pH 8 en comparación con la cepa silvestre. En el fondo genético mutante *sltAΔ* observamos una incorrecta señalización de PacC. La forma primaria PacC<sup>72kDa</sup>, que es rápidamente proteolizada por la ruta Pal en respuesta al pH alcalino, se mantiene, sin embargo, a altos niveles en el mutante *sltAΔ*. Así mismo, la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> es apenas detectable y las formas generadas de PacC<sup>27kDa</sup> no mostraban la movilidad que habitualmente se observa en el fondo silvestre (Figura R.3.2 en la sección de Resultados). Estas observaciones planteaban dos posibles escenarios, por un lado, que se afectase la proteólisis de la forma primaria de PacC a la de 53kDa, y por el otro, que en el fondo *sltAΔ* la actividad del proteosoma estuviese alterada y muestra de ello serían las diferencias en la movilidad de las formas que componen PacC<sup>27kDa</sup> (Figura R.3.2 en la sección de Resultados) (Hervás-Aguilar et al., 2007; Rodríguez-Galán et al., 2009).

El segundo corte proteolítico de PacC no está sujeto a regulación. Las diferentes formas PacC<sup>27kDa</sup> se forman por el proteosoma independientemente del pH ambiental. En el modelo establecido inicialmente (Hervás-Aguilar et al., 2007), el proteosoma actúa normalmente sobre la forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup>, sin embargo, también puede actuar sobre formas que no se pliegan correctamente y dan lugar a la apertura de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> (Díez et al., 2002; Hervás-Aguilar et al., 2007). La proteólisis de PacC<sup>72kDa</sup> a PacC<sup>53kDa</sup> y su consiguiente modificación post-traducciona deja accesible la región comprendida entre los aminoácidos 254 y 492 a la actividad del proteosoma. La degradación procesativa de PacC<sup>53kDa</sup> llega hasta el residuo 254, aunque este límite no es preciso y por ello se obtienen formas de diferente longitud (Mingot et al., 1999; Peñalva et al., 2014). El estudio realizado por Hervás-Aguilar y colaboradores mostró que cuando se observa en PacC<sup>27kDa</sup> un patrón proteolítico alterado puede deberse a defectos en la función del proteosoma (en particular se estudió la pérdida de función del proteosoma a través de mutaciones en el gen *preB* que codifica para la subunidad β5 del proteosoma). Por ello, la menor movilidad observada en las formas procesadas de

PacC<sup>27kDa</sup> en el nulo *sltA* sugería defectos similares e incluso que la forma generada no fuera funcional (Díez et al., 2002; Hervás-Aguilar et al., 2007).

Tomando ventaja de los resultados de RNAseq se analizaron los niveles de expresión de los genes codifican para las diferentes subunidades del proteosoma en el fondo nulo *sltA* y las comparamos con los niveles en el silvestre. En ningún caso se detectaron diferencias entre las cepas y condiciones (ver enlace a datos de RNAseq en el apartado 12.1 de la sección de Materiales y Métodos). Estos resultados sugieren que es poco probable que exista un problema funcional en el proteosoma dado que en primer lugar apenas detectamos forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup>, la cual es posible que se obtenga en niveles bajos y que sea procesada rápidamente en el proteosoma con diferente grado de eficiencia, y en segundo lugar el procesamiento heterogéneo de la forma de 27kDa puede ser el resultado de la proteólisis de PacC<sup>72kDa</sup> con una conformación abierta en el proteosoma que no requeriría del primer paso dependiente de la ruta Pal (Díez et al., 2002; Espeso et al., 2000). Los resultados de expresar una forma ya troncada de PacC, la forma mutante PacC<sup>c14</sup> mostraban que este podría ser el caso. La forma generada por este alelo mutante es equivalente a PacC<sup>53kDa</sup> y es directamente procesada por el proteosoma (Hervás-Aguilar et al., 2007; Orejas et al., 1995). En el fondo mutante nulo *sltA* se observa que las formas PacC<sup>27kDa</sup> procedentes de este alelo de *pacC* poseen movilidades similares a las observadas en el fondo silvestre *sltA*. En consecuencia, el primer escenario que contemplaba que la desregulación del sistema de señalización Pal/Vps fuese la única causa de la movilidad anómala de la forma PacC<sup>27kDa</sup> en el fondo *sltAΔ* se consideró el más probable.

El proceso de señalización y procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> es resultado de la activación de la ruta Pal por la cual los genes que codifican para las proteínas PalA, PalB, PalC, PalF, PalH y Pall son necesarios, además de algunas de las proteínas Vps que forman parte de los complejos ESCRT implicados en el tráfico intracelular (Peñalva et al., 2014). En esta tesis nos hemos centrado en estudiar la arrestina PalF. En el fondo nulo *sltA* no se detectaron las esperadas modificaciones post-traduccionales (MPT) que ocurren en PalF a pH 8, como son la fosforilación y la ubiquitinación y que, ambas, son esenciales en la ruta de señalización Pal (Galindo et al., 2012; Hervás-Aguilar, Galindo, et al., 2010) (ver figura R.3.3.2 en la sección de Resultados). La enorme reducción de los niveles de PalF modificado debe comprometer la transmisión de la señal de pH ambiental desde las proteínas receptoras de la señal de estrés alcalino PalH y Pall al resto de los elementos señalizadores de PacC. Dado que solo algunas proteínas se han podido etiquetar con marcadores fluorescentes para su localización subcelular sin interferir en la correcta función de la ruta (Galindo et al., 2012; Hervás-Aguilar, Rodríguez-Galán,

et al., 2010), hemos utilizado estos pocos elementos señalizadores que acepten ser etiquetados para determinar el posible efecto de SltA corriente debajo de PalF. La proteína del complejo ESCRT-I Vps23-GFP es funcional y se localizaba en puntos inmóviles en la membrana plasmática a pH alcalino. Esta localización no se afectaba en un fondo *sltAΔ*, lo que indica que los bajos niveles detectados de ubiquitinación de PalF son suficientes para mantener esta localización de Vps23 y que se requiere para la señalización de PacC (Galindo et al., 2012). La ubiquitinación constitutiva de PalF permite la señalización de la ruta Pal independientemente del pH ambiental (Hervás-Aguilar et al., 2010a). Investigamos entonces si esta forma mutante de PalF podría solucionar los problemas de señalización de PacC<sup>72kDa</sup> y para ello se generó una cepa doble mutante que combinaba dicho alelo de PalF con el fondo mutante *sltAΔ*. Observamos que se recuperaba la movilidad de la forma PacC<sup>27kDa</sup> y se incrementaban sus niveles a los observados en el fondo *sltA* silvestre. También se detectaba una leve señal de PacC<sup>53kDa</sup>, pero se mantenía la acumulación de PacC<sup>72kDa</sup> en el fondo nulo *sltA* (Figura R.5.4.A). Estos resultados confirmaban nuestra hipótesis sobre la correcta funcionalidad del proteosoma y que la ausencia de MPTs en PalF era una de las posibles causas de la desconexión entre pH ambiental y la ruta de señalización hacia el primer corte proteolítico de PacC. Sin embargo, la forma PalF-Ub no mimetiza completamente la situación silvestre.

Por ello nos seguimos concentrando en determinar que elementos de la ruta Pal estaban afectados por el bloqueo de PalF. La otra proteína de la ruta que mantiene una señalización correcta a pH 8 en este mutante *sltAΔ* fue PalA, lo que indicaría que el proceso de señalización y reclutamiento de elementos hasta PalA es efectivo en ausencia de función SltA a pesar del bajo grado de modificación postraduccional de PalF (ver figuras R.3.4.2 y R.3.5 de la sección de Resultados). Cuando PalA es señalizado se encarga de reclutar a PacC<sup>72kDa</sup> uniéndose a través de los motivos YPx[L/I] para el posterior corte proteolítico que es llevado a cabo por PalB (Peñas et al., 2007; Rodríguez-Galán et al., 2009; Vincent et al., 2003). El estudio del patrón proteolítico de PacC en un doble mutante *sltAΔ palBΔ* se asemejaba a ambos mutantes simples, aunque la ausencia de SltA resultaba en una mayor acumulación de las formas de menor movilidad electroforética de 27kDa (ver figura R.5.3.A de la sección de Resultados). Esta observación sugiere que el problema de procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> debe tener lugar en dos puntos concretos de la ruta Pal. Por un lado, puede existir un problema de reconocimiento y/o reclutamiento de PacC a los motivos de PalA impidiendo el paso posterior de proteólisis, o por otro lado puede ser que PacC se reclute correctamente y sea la función de PalB la que esté afectada. En este último caso no debería de

detectarse procesamiento alguno de PacC<sup>72kDa</sup>, pero no descartamos esta hipótesis debido a que en otros mutantes *palB*<sup>-</sup> se ha detectado cierto procesamiento que se explicaría por la existencia de una ruta alternativa a la ruta Pal de menor eficiencia en la respuesta a pH 8 (Rodríguez-Galán et al., 2009).

La pérdida de función de SltA es epistática sobre el sistema Pal/PacC. Fenotípicamente, las mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los genes *pal* (*pal*<sup>-</sup>) conocidas como mutaciones de mimesis de acidez (“*acidity mimiking mutants*”) dan lugar a la acumulación prácticamente exclusiva de la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> resultando en sensibilidad al pH alcalino y al molibdato y de tolerancia al antibiótico neomicina. En cambio, las mutaciones que afectan a *pacC* generando formas que se procesan independientemente de la ruta Pal se conocen como mutantes de mimesis de alcalinidad (“*alkalinity mimiking mutants*”), *pacC*<sup>c</sup>, y dan lugar a un fenotipo de tolerancia al pH alcalino ambiental e hiperresistencia al molibdato y sensibilidad a la neomicina (Peñalva & Arst, 2002). Esencialmente estos fenotipos de sensibilidad y resistencia opuestos entre el bloqueo de la señalización de PacC y su ausencia de control han sido la base del aislamiento de nuevos alelos en cada uno de los elementos de esta ruta o nuevos elementos como fue *pacX* (H. Arst & Cove, 1970; Bussink et al., 2015; Díez et al., 2002; Peñalva & Arst, 2002; Tilburn et al., 1995). Las nuevas cepas generadas mediante genética clásica o en reverso y que por primera vez combinan mutantes en el sistema de pH ambiental y en el sistema Slt nos evidencian el efecto epistático de la ausencia de función *sltA*.

Este efecto epistático de *sltA* parece ser completo sobre el sistema Pal/PacC a todos los niveles, incluyendo no solo a los alelos hipofuncionales *pal* sino también a mutaciones *pacC* constitutivas o pérdida de función en *pacX*. En todas las combinaciones genéticas que incluyen el alelo nulo SltA observamos la sensibilidad a pH alcalino y a los diferentes estreses catiónicos independientemente de los alelos mutantes usados en el sistema de respuesta a pH ambiental (Figura D.3). Así, la cepa doble mutante *sltAΔ palBΔ* presenta sensibilidad a pH 8, como sería esperable por la presencia del alelo *palBΔ*, y también al exceso de catión sodio en el medio extracelular. Sin embargo, esta cepa es tolerante al molibdato y las colonias adquieren la coloración anaranjada típica de los mutantes simples *sltAΔ* en estrés por molibdato en el medio (ver figura R.5.3 de la sección de Resultados).

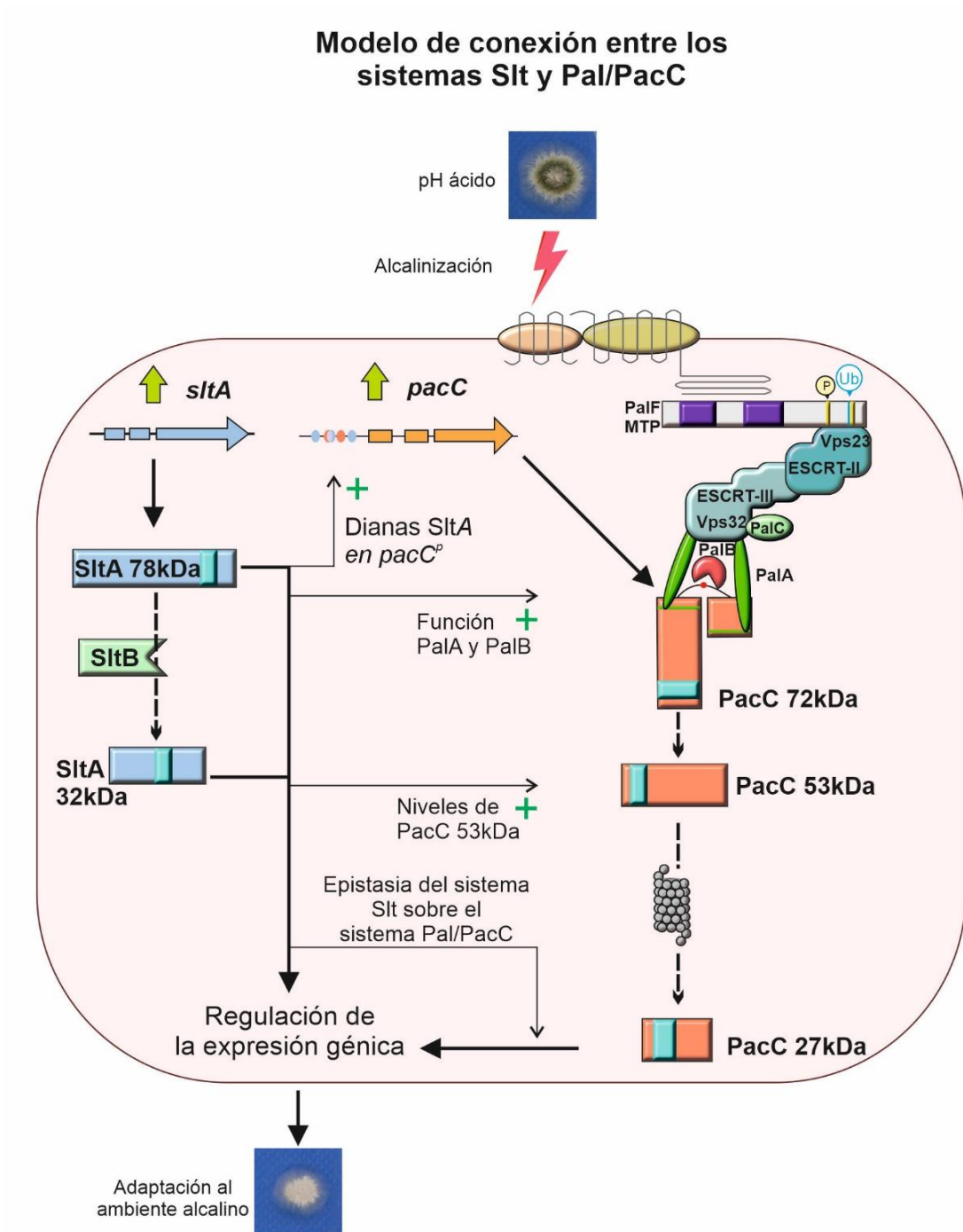
Por otro lado, las mutaciones de ganancia de función PacC *pacC*<sup>c14</sup> y *pacC*<sup>c700</sup> generan truncamientos tempranos dando lugar a una forma intermedia PacC<sup>53kDa</sup> y prescindiendo de la señalización de la ruta Pal en el primer caso (Hervás-Aguilar et al.,

2007; Tilburn et al., 1995) y, en el segundo caso a la forma totalmente procesada de 27kDa sin necesidad de las modificaciones post-traduccionales de PacC (Fernández-Martínez et al., 2003). Al igual que ocurre en los mutantes PalF ubiquitinados (PalF-Ub) constitutivamente en el fondo nulo *sItA*, en los dobles mutantes *sItAΔ* y *pacC<sup>c</sup>* se logró recuperar la forma de 27kDa observada en la cepa silvestre pero la presencia de esta forma funcional de PacC no fue suficiente para revertir el fenotipo de sensibilidad a pH alcalino (ver figuras R.5.5 y R.5.6 de la sección de Resultados). Respecto a las mutaciones de pérdida de función en PacX que suprimen algunas mutaciones que causan la pérdida de función parcial en PacC al aumentar tanto el nivel de expresión de *pacC* como de su proteína (Bussink et al., 2015). El alelo *sItAΔ* es epistático sobre la mutación de pérdida completa de función PacX, *pacX20*. El doble mutante *sItAΔ pacX20* muestra sensibilidad al pH ambiental alcalino y otras condiciones de estrés por cationes como en un fondo nulo *sItA* mientras que el alelo *pacX20* muestra un fenotipo de ganancia de función en PacC. Esta relación de epistasia de SItA sobre el sistema Pal/PacC en respuesta a la alcalinidad ambiental situaría al sistema SIt como principal sistema regulador en esta condición de estrés en hongos filamentosos.

Si el alelo nulo de SItA tiene un efecto epistático sobre mutaciones en el sistema Pal/PacC, ¿por qué no se han aislado mutaciones en este gen en los diferentes ensayos genéticos? Las mutaciones *pacC<sup>c</sup>* toleran el pH alcalino ambiental, son hiperresistentes al molibdato y sensibles a neomicina, un fenotipo opuesto al observado en mutantes *pal* o *pacC<sup>-</sup>* (Peñalva & Arst, 2002). Esta oposición de fenotipos permitió la obtención de mutaciones supresoras en *pacC* en función del medio selectivo usado. Por ejemplo, en mutantes *pal* o *pacC<sup>-</sup>* se inducía la aparición de mutaciones supresoras en medios suplementados con molibdato dando lugar a mutaciones *pacC<sup>c</sup>*, también *pacC<sup>c/-</sup>* (denominadas *neutrality mimicking*). A su vez, las anteriores mutaciones podrían ser nuevamente revertidas seleccionando alelos de pérdida de función PacC en medios suplementados con neomicina (Peñalva & Arst, 2002). Los resultados de esta tesis doctoral muestran que SItA tiene un importante papel regulador sobre el sistema Pal/PacC. La relación de epistasia, especialmente sobre alelos *pacC<sup>c</sup>* nos sugiere que habría sido posible aislar mutaciones de pérdida completa de función en *sItA* en dichos fondos mutantes *pacC*, si por ejemplo se hubieran seleccionado supresores sensibles al pH alcalino, ya que las cepas *sItAΔ pacC<sup>c</sup>*, si exhiben dicho fenotipo. Sin embargo, este tipo de selección de mutantes no ha sido explorado. Dado que la pérdida de función de SItA causa un fenotipo de ligera tolerancia al molibdato y sensibilidad a neomicina, similar a lo que se observaría en mutantes *pacC<sup>c</sup>*, sí podrían haberse seleccionado mutaciones en *sItA* como supresoras de la pérdida de función en genes *pal*. Quizás

dichos mutantes fueran descartados al seguir presentando sensibilidad al pH alcalino. Como bien se observa que el doble nulo *sltAΔ palBΔ* crece como una cepa silvestre en medio sin estrés, es resistente al molibdato y sensible al pH alcalino (Figura R.5.3.A).

Sin embargo, la supresión de ciertos mutantes *vpsΔ* ha sido una fuente inagotable de mutaciones en *sltA*, permitiendo también la caracterización de *sltB*. Existe una obvia conexión a nivel genético entre los sistemas Pal/PacC y Slt a través de las mutaciones en *sltA* y *sltB* que suprimen el fenotipo de algunos genes *vps* (*vpsΔ*) cuyas proteínas participan en la ruta de señalización Pal y en los complejos CORVET y HOPS de maduración de endosomas (Calcagno-Pizarelli et al., 2011; López-Berges et al., 2017). Dado que la ausencia de función total de SltA causa una desregulación general del sistema Pal/PacC, se analizó el patrón proteolítico de PacC en un mutante “mild” *sltA* (*sltA60*) donde la forma primaria PacC<sup>72kDa</sup> se acumulaba como en un nulo *sltA*, pero sí se detectaban las formas intermedia y proteolizada en pH 8 (Calcagno-Pizarelli et al., 2011) (ver figura R.5.1 de la sección de Resultados). Esta recuperación del patrón y de la tolerancia ligera al pH alcalino incide por un lado en la importancia de la forma procesada SltA<sup>32kDa</sup> en la respuesta a la alcalinización ambiental, y por otro en la posible importancia de unos niveles de proteína PacC<sup>53kDa</sup> suficientes para llevar a cabo funciones aun no descritas en la tolerancia al pH 8 (Figura D.3). En levaduras la ruta de señalización RIM y el factor transcripcional RIM101p, homólogas de la ruta Pal y el factor de transcripción PacC, solo requiere de un corte proteolítico mediado por la señalización de los elementos que conforman la ruta RIM (Peñalva & Arst, 2002), por lo que el nexo o la coordinación entre los sistemas Pal/PacC y Slt podría producirse entre PacC<sup>53kDa</sup> y SltA<sup>32kDa</sup>, ya que ambos elementos son exclusivos de hongos filamentosos.



**Figura D.3.** Modelo de la conexión entre los sistemas Slt y Pal/PacC en respuesta a la alcalinidad ambiental. En esta representación se resume como el correcto funcionamiento del sistema Pal/PacC está sujeto a la presencia del sistema Slt funcional tanto a nivel transcripcional con un papel positivo de SltA sobre la expresión de *pacC* (Dianas SltA en *pacC*<sup>o</sup>), como a nivel de proteína donde su función es necesaria para el adecuado reclutamiento y procesamiento de PacC<sup>72kDa</sup> (Funciones PalA y PalB), permitiendo unos niveles estables de PacC<sup>53kDa</sup> y una forma activa de 27kDa correctamente proteolizada (Niveles de PacC<sup>53kDa</sup>). El efecto epistático de la pérdida de función de SltA sobre mutantes *pal/pac* constitutivos sitúa a SltA como el principal factor de transcripción junto a PacC en la respuesta a estrés por pH ambiental alcalino.



# Conclusiones



- El incremento en la concentración extracelular de cationes sodio o la alcalinización del pH ambiental causan diferentes respuestas a nivel transcripcional y traduccional en los elementos del sistema Slt.
- El patrón transcriptómico de *A. nidulans* es diferente en condiciones de estrés por exceso de catión sodio que, en la condición de alcalinidad ambiental, siendo esta última la que presenta mayor variabilidad.
- El factor transcripcional SltA tiene un papel regulador dual y afecta con diferente grado a los niveles de expresión de parte de los genes que componen el transcriptoma, ya sea directa o indirectamente.
- El cambio en el patrón transcripcional causado por la ausencia de SltA es observable tanto en condiciones de ausencia de estrés como cuando el micelio fue enfrentado a altos niveles de sodio extracelular o a la alcalinización del pH ambiental.
- La ausencia de SltA altera los niveles de expresión de los genes *palF* y *pacC*. Este fenotipo no se suprime eliminando la función del regulador negativo de *pacC*, PacX.
- Las modificaciones postraduccionales en respuesta a pH 8 de PalF y PacC se encuentran alteradas en el fondo nulo *sltA*, pese incluso al aumento del nivel de proteína PacC en mutantes *pacX20*.
- El rescate del patrón proteolítico de PacC se logra con mutantes de ganancia de función en *pacC*, *pacC<sup>c</sup>*, que carecen de las regiones reguladoras y por lo tanto son independientes de la ruta Pal.
- Mutaciones de pérdida de función en SltA son epistáticas a las mutaciones de ganancia de función *pacC<sup>c</sup>*. El rescate del patrón proteolítico de PacC no logra suprimir la sensibilidad a la alcalinidad ambiental que causa la ausencia de la función SltA.
- Los bajos niveles de expresión de algunos genes dependientes de SltA con un patrón de expresión similar a *sltB* en condiciones de estrés y en ausencia de SltA no explican por si solos el fenotipo de sensibilidad de los fondos mutantes *slt* en condiciones de estrés por elevada concentración de cationes o por pH ambiental alcalino.



# **Bibliografía**



- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). *Molecular Biology of the Cell*. (6th ed.). W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>
- Andersen, M. R., Vongsangnak, W., Panagiotou, G., Salazar, M. P., Lehmann, L., & Nielsen, J. (2008). A trispecies *Aspergillus* microarray: comparative transcriptomics of three *Aspergillus* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(11), 4387-4392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709964105>
- Andréasson, C., Heessen, S., & Ljungdahl, P. O. (2006). Regulation of transcription factor latency by receptor-activated proteolysis. *Genes & development*, *20*(12), 1563-1568. <https://doi.org/10.1101/gad.374206>
- Antal, K., Gila, B. C., Pócsi, I., & Emri, T. (2020). General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology*, *124*(5), 376-386. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.009>
- Apostolaki, A., Harispe, L., Calcagno-Pizarelli, A. M., Vangelatos, I., Sophianopoulou, V., Arst, H. N., Peñalva, M. A., Amillis, S., & Scazzocchio, C. (2012). *Aspergillus nidulans* CkiA is an essential casein kinase I required for delivery of amino acid transporters to the plasma membrane. *Molecular Microbiology*, *84*(3), 530-549. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08042.x>
- Arst, H., & Cove, D. J. (1970). Molybdate Metabolism in *Aspergillus nidulans* II. Mutations Affecting Phosphatase Activity or Galactose Utilization. *MGG Molecular & General Genetics*, *108*(2), 146–153. <https://doi.org/10.1007/BF02430520>
- Arst, H. N., Bignell, E., & Tilburn, J. (1994). Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *MGG Molecular & General Genetics*, *245*(6). <https://doi.org/10.1007/BF00297286>
- Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2003a). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends in Genetics*, *19*(4), 224-231. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00052-0)
- Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2003b). Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal Genetics and Biology*, *40*(1), 1-3. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(03\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(03)00077-X)
- Barda, O., Maor, U., Sadhasivam, S., Bi, Y., Zakin, V., Prusky, D., & Sionov, E. (2020). The pH-Responsive Transcription Factor PacC Governs Pathogenicity and Ochratoxin A Biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00210>
- Bertuzzi, M., Schrettl, M., Alcazar-Fuoli, L., Cairns, T. C., Muñoz, A., Walker, L. A., Herbst, S., Safari, M., Cheverton, A. M., Chen, D., Liu, H., Saijo, S., Fedorova, N. D., Armstrong-James, D., Munro, C. A., Read, N. D., Filler, S. G., Espeso, E. A., Nierman, W. C., Bignell, E. M. (2014). The pH-Responsive PacC Transcription Factor of *Aspergillus fumigatus* Governs Epithelial Entry and Tissue Invasion during Pulmonary Aspergillosis. *PLoS Pathogens*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004413>
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A. M., Haynes, K., Arst, H. M., & Rogers, T. (2005). The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Molecular Microbiology*, *55*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04472.x>
- Brett, C. L., Plemel, R. L., Lobingier, B. T., Vignali, M., Fields, S., & Merz, A. J. (2008). Efficient termination of vacuolar Rab GTPase signaling requires coordinated action by a GAP and a protein kinase. *Journal of Cell Biology*, *182*(6), 1141-1151. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801001>

- Brewster, J. L., & Gustin, M. C. (2014). Hog1: 20 years of discovery and impact. *Science Signaling* (Vol. 7, Número 343). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005458>
- Brown, A. J. P., Cowen, L. E., di Pietro, A., & Quinn, J. (2017). Stress Adaptation. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0048-2016>
- Bussink, H. J., Bignell, E. M., Múnera-Huertas, T., Lucena-Agell, D., Scazzocchio, C., Espeso, E. A., Bertuzzi, M., Rudnicka, J., Negrete-Urtasun, S., Peñas-Parilla, M. M., Rainbow, L., Peñalva, M. A., Arst, H. N., & Tilburn, J. (2015). Refining the pH response in *Aspergillus nidulans*: A modulatory triad involving PacX, a novel zinc binuclear cluster protein. *Molecular Microbiology*, 98(6), 1051-1072. <https://doi.org/10.1111/mmi.13173>
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G., & Arst, H. N. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *MGG Molecular & General Genetics*, 203(2), 346–353. <https://doi.org/10.1007/BF00333978>
- Calcagno-Pizarelli, A. M., Hervás-Aguilar, A., Galindo, A., Abenza, J. F., Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (2011). Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. *Journal of Cell Science*, 124(23), 4064-4076. <https://doi.org/10.1242/jcs.088344>
- Calcagno-Pizarelli, A. M., Negrete-Urtasun, S., Denison, S. H., Rudnicka, J. D., Bussink, H. J., Múnera-Huertas, T., Stanton, L., Hervás-Aguilar, A., Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2007). Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: Pal assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryotic Cell*, 6(12), 2365-2375. <https://doi.org/10.1128/EC.00275-07>
- Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Espeso, E. A., González-Verdejo, C. I., García-Maceira, F. I., & Di Pietro, A. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology*, 48(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03465.x>
- Cassiday, L. A., & Maher, L. J. (2002). Having it both ways: transcription factors that bind DNA and RNA. *Nucleic acids research*, 30(19), 4118-4126. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf512>
- Chilton, I. J., Delaney, C. E., Barham-Morris, J., Fincham, D. A., Hooley, P., & Whitehead, M. P. (2008). The *Aspergillus nidulans* stress response transcription factor StzA is ascomycete-specific and shows species-specific polymorphisms in the C-terminal region. *Mycological Research*, 112(12), 1435-1446. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.06.028>
- Cornet, M., & Gaillardin, C. (2014). pH signaling in human fungal pathogens: A new target for antifungal strategies. *Eukaryotic Cell*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/EC.00313-13>
- Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et biophysica acta*, 113(1), 51-56. [https://doi.org/10.1016/s0926-6593\(66\)80120-0](https://doi.org/10.1016/s0926-6593(66)80120-0)
- de Jonge, W. J., Patel, H. P., Meeussen, J. V. W., & Lenstra, T. L. (2022). Following the tracks: How transcription factor binding dynamics control transcription. *Biophysical journal*, 121(9), 1583-1592. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.03.026>
- de Mendoza, A., & Sebé-Pedrós, A. (2019). Origin and evolution of eukaryotic transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 58-59, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.07.010>
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Grigoriev, I. V. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations

- in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
- Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. J., & De Waard, M. A. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1), 1-15. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1206>
- Denison, S. H. (2000). pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 29(2), 61-71. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1188>
- Denison, S. H., Negrete-Urtasun, S., Mingot, J. M., Tilburn, J., Mayer, W. A., Goel, A., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (1998). Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Molecular Microbiology*, 30(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01058.x>
- Díez, E., Álvaro, J., Espeso, E. A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO Journal*, 21(6), 1350-1359. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1350>
- Dorn, G. (1965). Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1017/S0016672300003943>
- Du, W., Zhai, P., Wang, T., Bromley, M. J., Zhang, Y., & Lu, L. (2021). The C2H2 Transcription Factor SitA Contributes to Azole Resistance by Coregulating the Expression of the Drug Target Erg11A and the Drug Efflux Pump Mdr1 in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(4), e01839-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01839-20>
- Dubey, A. K., Barad, S., Luria, N., Kumar, D., Espeso, E. A., & Prusky, D. B. (2016). Cation-stress-responsive transcription factors SitA and CrzA regulate morphogenetic processes and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *PLoS ONE*, 11(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168561>
- Duran, R., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2010). Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins*, 2(4). <https://doi.org/10.3390/toxins2040367>
- Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H., Han, K.-H., Yu, J.-H., & Pócsi, I. (2015). Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC genomics*, 16(1), 478. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1705-z>
- Entian, K.-D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Götz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Hinnen, A. (1999). Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *MGG Molecular and General Genetics*, 262(4-5), 683-702. <https://doi.org/10.1007/PL00013817>
- Espeso, E. A., & Arst, H. N. (2000). On the Mechanism by which Alkaline pH Prevents Expression of an Acid-Expressed Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 20(10), 3355-3363. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.10.3355-3363.2000>
- Espeso, E. A., Roncal, T., Díez, E., Rainbow, L., Bignell, E., Álvaro, J., Suárez, T., Denison, S. H., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2000). On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO Journal*, 19(4). <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.719>
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *The EMBO Journal* vol, 12(10), 3947-3956. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06072.x>

- Espeso, E. A., Tilburn, J., Sánchez-Pulido, L., Brown, C. V., Valencia, A., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *Journal of Molecular Biology*, 274(4). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1428>
- Etxebeste, O. (2021). Transcription factors in the fungus *Aspergillus nidulans*: Markers of genetic innovation, network rewiring and conflict between genomics and transcriptomics. *Journal of Fungi*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/jof7080600>
- Etxebeste, O., & Espeso, E. A. (2016). Neurons show the path: tip-to-nucleus communication in filamentous fungal development and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 021(40). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw021>
- Etxebeste, O., & Espeso, E. A. (2019). *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology*, 23(1), 5-22. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00064-6>
- Fedotova, A. A., Bonchuk, A. N., Mogila, V. A., & Georgiev, P. G. (2017). C2H2 zinc finger proteins: The largest but poorly explored family of higher eukaryotic transcription factors. *Acta Naturae*, 9(2). <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-47-58>
- Fernández-Martínez, J., Brown, C. V., Díez, E., Tilburn, J., Arst, H. N., Peñalva, M. Á., & Espeso, E. A. (2003). Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *Journal of Molecular Biology*, 334(4), 667-684. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.072>
- Filtz, T. M., Vogel, W. K., & Leid, M. (2014). Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends in pharmacological sciences*, 35(2), 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.11.005>
- Findon, H., Calcagno-Pizarelli, A. M., Martínez, J. L., Spielvogel, A., Markina-Iñarrairaegui, A., Indrakumar, T., Ramos, J., Peñalva, M. A., Espeso, E. A., & Arst, H. N. (2010). Analysis of a novel calcium auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7), 647-655. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.002>
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International journal of cell biology*, 2010, 214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S. I., Baştürkmen, M., Spevak, C. C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scaccocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G. H., Draht, O., Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071). <https://doi.org/10.1038/nature04341>
- Galindo, A., Calcagno-Pizarelli, A. M., Arst, H. N., & Peñalva, M. Á. (2012). An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 125(7), 1784-1795. <https://doi.org/10.1242/jcs.098897>
- Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Rodríguez-Galán, O., Vincent, O., Arst, H. N., Tilburn, J., & Peñalva, M. A. (2007). PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic*, 8(10), 1346-1364. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00620.x>
- Graschopf, A., Stadler, J. A., Hoellerer, M. K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S. D., & Schweyen, R. J. (2001). The Yeast Plasma Membrane Protein Alr1 Controls Mg<sup>2+</sup> Homeostasis and is Subject to Mg<sup>2+</sup>-dependent Control of Its Synthesis and Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16216-16222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101504200>

- Hagiwara, D., Sakamoto, K., Abe, K., & Gomi, K. (2016). Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: Stress biology in the post-genomic era. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(9), 1667-1680. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1162085>
- Han, G., Lu, C., Guo, J., Qiao, Z., Sui, N., Qiu, N., & Wang, B. (2020). C2H2 Zinc Finger Proteins: Master Regulators of Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00115>
- Hernández-Ortiz, P., & Espeso, E. A. (2013). Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 89(3). <https://doi.org/10.1111/mmi.12294>
- 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. *Molecular and Cellular Biology*, 30(4), 897-907. <https://doi.org/10.1128/mcb.00132-09>
- Herranz, S., Rodríguez, J. M., Bussink, H.-J., Sánchez-Ferrero, J. C., Arst, H. N., Peñalva, M. A., Vincent, O., & Lefkowitz, R. J. (2005). Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12141–12146. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504776102>
- Hervás-Aguilar, A., Galindo, A., & Peñalva, M. A. (2010). Receptor-independent ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 18095-18102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.114371>
- Hervás-Aguilar, A., Rodríguez, J. M., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2007). Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 34735-34747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706723200>
- Hervás-Aguilar, A., Rodríguez-Galán, O., Galindo, A., Abenza, J. F., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2010). Characterization of *Aspergillus nidulans* DidB Did2, a non-essential component of the multivesicular body pathway. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 47(7), 636-646. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.010>
- Ikeda, M., Kihara, A., Denpoh, A., & Igarashi, Y. (2008). The Rim101 pathway is involved in Rsb1 expression induced by altered lipid asymmetry. *Molecular Biology of the Cell*, 19(5). <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-08-0806>
- Jean-Charles, P. Y., Freedman, N. J., & Shenoy, S. K. (2016). Chapter Nine - Cellular Roles of Beta-Arrestins as Substrates and Adaptors of Ubiquitination and Deubiquitination. En *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 141, pp. 339-369). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.04.003>
- Klein, T., Eckhard, U., Dufour, A., Solis, N., & Overall, C. M. (2018). Proteolytic Cleavage-Mechanisms, Function, and «Omic» Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification. *Chemical reviews*, 118(3), 1137-1168. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00120>
- Klug, A. (1999). Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *Journal of molecular biology*, 293(2), 215-218. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3007>
- Latchman, D. S. (2003). *Eukaryotic Transcription Factors: Fourth Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-437178-1.X5000-0>
- Li, B., Chen, Y., & Tian, S. (2022). Function of pH-dependent transcription factor PacC in regulating development, pathogenicity, and mycotoxin biosynthesis of phytopathogenic fungi. *FEBS Journal*, 289(7). <https://doi.org/10.1111/febs.15808>

- Liu, G. J., Martin, D. K., Gardner, R. C., & Ryan, P. R. (2002). Large Mg<sup>2+</sup>-dependent currents are associated with the increased expression of ALR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 213(2), 231-237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11311.x>
- Liu, H., Xu, W., Bruno, V. M., Phan, Q. T., Solis, N. V., Woolford, C. A., Ehrlich, R. L., Shetty, A. C., McCracken, C., Lin, J., Bromley, M. J., Mitchell, A. P., & Filler, S. G. (2021). Determining *Aspergillus fumigatus* transcription factor expression and function during invasion of the mammalian lung. *PLoS Pathogens*, 17(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009235>
- López-Berges, M. S., Arst, H. N., Pinar, M., & Peñalva, M. A. (2017). Genetic studies on the physiological role of CORVET in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(7). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx065>
- Loss, O., Bertuzzi, M., Yan, Y., Fedorova, N., McCann, B. L., Armstrong-James, D., Espeso, E. A., Read, N. D., Nierman, W. C., & Bignell, E. M. (2017). Mutual independence of alkaline- and calcium-mediated signalling in *Aspergillus fumigatus* refutes the existence of a conserved druggable signalling nexus. *Molecular Microbiology*, 106(6), 861-875. <https://doi.org/10.1111/mmi.13840>
- Lucena-Agell, D., Galindo, A., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2015). *Aspergillus nidulans* ambient pH signaling does not require endocytosis. *Eukaryotic Cell*, 14(6), 545-553. <https://doi.org/10.1128/EC.00031-15>
- Lucena-Agell, D., Hervás-Aguilar, A., Múnera-Huertas, T., Pougovkina, O., Rudnicka, J., Galindo, A., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2016). Mutational analysis of the *Aspergillus* ambient pH receptor PalH underscores its potential as a target for antifungal compounds. *Molecular Microbiology*, 101(6), 982-1002. <https://doi.org/10.1111/mmi.13438>
- Ma, J. (2005). Crossing the line between activation and repression. *Trends in Genetics*, 21(1), 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.11.004>
- Macdiarmid, C. W., & Gardner, R. C. (1998). Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* Magnesium Transport System Confers Resistance to Aluminum Ion. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1727-1732. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1727>
- MacPherson, S., Larochelle, M., & Turcotte, B. (2006). A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 583-604. <https://doi.org/10.1128/mmb.00015-06>
- Manford, A. G., Stefan, C. J., Yuan, H. L., MacGurn, J. A., & Emr, S. D. (2012). ER-to-Plasma Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology. *Developmental Cell*, 23(6), 1129-1140. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.11.004>
- Manoli, M. T., & Espeso, E. A. (2019). Modulation of calcineurin activity in *Aspergillus nidulans*: the roles of high magnesium concentrations and of transcriptional factor CrzA. *Molecular Microbiology*, 111(5), 1283-1301. <https://doi.org/10.1111/mmi.14221>
- Markina-Iñarrairaegui, A., Spielvogel, A., Etxebeste, O., Ugalde, U., & Espeso, E. A. (2020). Tolerance to alkaline ambient pH in *Aspergillus nidulans* depends on the activity of ENA proteins. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71297-z>
- Marquina Iñarrairaegui, A. (2011). *Rutas de transporte núcleo-citoplásmicas en "Aspergillus nidulans"*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología.
- Mellado, L. (2014). *Respuesta al estrés catiónico en Aspergillus nidulans: estudio del proceso de señalización del factor transcripcional SitA*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología III.

- Mellado, L., Arst, H. N., & Espeso, E. A. (2016). Proteolytic activation of both components of the cation stress-responsive Slr pathway in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*, 27(16), 2598-2612. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0049>
- Mellado, L., Calcagno-Pizarelli, A. M., Lockington, R. A., Cortese, M. S., Kelly, J. M., Arst, H. N., & Espeso, E. A. (2015). A second component of the SlrA-dependent cation tolerance pathway in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 116-128. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.06.002>
- Michaillat, L., & Mayer, A. (2013). Identification of Genes Affecting Vacuole Membrane Fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054160>
- Mingot, J.-M., Tilburn, J., Diez, E., Bignell, E., Orejas, M., Widdick, D. A., Sarkar, S., Brown, C. V., Caddick, M. X., Espeso, E. A., Arst, H. N., Jr, & Peñalva, M. A. (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. *Molecular and cellular biology*, 19(2), 1390-1400. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.2.1390>
- Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Diez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (1999). Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: Completion of gene characterization. *Molecular Microbiology*, 33(5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01540.x>
- Nishino, K., Obara, K., & Kihara, A. (2015). The C-terminal cytosolic region of Rim21 senses alterations in plasma membrane lipid composition: Insights into sensing mechanisms for plasma membrane lipid asymmetry. *Journal of Biological Chemistry*, 290(52). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.674382>
- Obara, K., Yamamoto, H., & Kihara, A. (2012). Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394205>
- O'neil, J. D., Bugno, M., Stanley, M. S., Barham-Morris, J. B., Woodcock, N. A., Clement, D. J., Clipson, N. J. W., Whitehead, M. P., Fincham, D. A., & Hooley, P. (2002). Cloning of a novel gene encoding a C2H2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Mycological Research*, 106(4). <https://doi.org/10.1017/S0953756202005701>
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (1995). Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes and Development*, 9(13), 1622-1632. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1622>
- Pabo, C. O., Peisach, E., & Grant, R. A. (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biochemistry*, 70, 313-340. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.313>
- Patton-Vogt, J., & de Kroon, A. I. P. M. (2020). Phospholipid turnover and acyl chain remodeling in the yeast ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1865, Número 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.05.006>
- Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (2002). Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 426-446. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.426-446.2002>
- Peñalva, M. A., Lucena-Agell, D., & Arst, H. N. (2014). Liaison alcaline: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling. *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 22, pp. 49-59). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.005>

- Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., & Arst, H. N. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*, 16(6), 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.006>
- Peñas, M. M., Hervás-Aguilar, A., Múnera-Huertas, T., Reoyo, E., Peñalva, M. Á., Arst, H. N., & Tilburn, J. (2007). Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryotic Cell*, 6(6), 960-970. <https://doi.org/10.1128/EC.00047-07>
- Picazo, I. (2016). *Regulación transcripcional y postraduccional del sistema Slt que controla la respuesta al estrés catiónico y alcalino en Aspergillus nidulans*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Picazo, I., Etxebeste, O., Requena, E., Garzia, A., & Espeso, E. A. (2020). Defining the transcriptional responses of *Aspergillus nidulans* to cation/alkaline pH stress and the role of the transcription factor SltA. *Microbial Genomics*, 6(8), 1-18. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000415>
- Pinar, M., Pantazopoulou, A., & Peñalva, M. A. (2013). Live-cell imaging of *Aspergillus nidulans* autophagy. *Autophagy*, 9(7), 1024-1043. <https://doi.org/10.4161/auto.24483>
- Pisat, N. P., Pandey, A., & MacDiarmid, C. W. (2009). MNR2 Regulates Intracellular Magnesium Storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 183(3), 873-884. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.106419>
- Pontecorvo, G., Roper, L. M., Hemmons, K. D., & Macdonald, J. A. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*, 5, 141-238. [https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(08\)60408-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(08)60408-3)
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>
- Razin, S. V., Borunova, V. V., Maksimenko, O. G., & Kantidze, O. L. (2012). Cys2His2 zinc finger protein family: Classification, functions, and major members. *Biochemistry (Moscow)*, 77(3), 217-226. <https://doi.org/10.1134/S0006297912030017>
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (2000). The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12). <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8290>
- Rodríguez-Galán, O., Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2009). Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4404-4412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808645200>
- Ryšlavá, H., Doubnerová, V., Kavan, D., & Vaněk, O. (2013). Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *Journal of Proteomics*, 92, 80-109. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.025>
- Salazar, M., Vongsangnak, W., Panagiotou, G., Andersen, M. R., & Nielsen, J. (2009). Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis. *Molecular Genetics and Genomics*. MGG, 282(6), 571-586. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0486-y>
- Sambrook, J., & Green, M. (2012). Molecular Cloning: a Laboratory Manual 4th Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (Vol. 1, Número 1).
- Schoch, C. L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P. B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R. M., Trippe, K., Ciufetti, L. M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B. P., Bonito, G., Groenewald, J. Z., ... Spatafora, J. W. (2009). The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the

- origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224-239. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp020>
- Sebastián-Pérez, V., Manoli, M.-T., Pérez, D. I., Gil, C., Mellado, E., Martínez, A., Espeso, E. A., & Campillo, N. E. (2016). New applications for known drugs: Human glycogen synthase kinase 3 inhibitors as modulators of *Aspergillus fumigatus* growth. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 116, 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.035>
- Shantappa, S., Dhingra, S., Hernández-Ortiz, P., Espeso, E. A., & Calvo, A. M. (2013). Role of the Zinc Finger Transcription Factor SltA in Morphogenesis and Sterigmatocystin Biosynthesis in the Fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068492>
- Spielvogel, A., Findon, H., Arst, H. N., Araújo-Bazán, L., Hernández-Ortiz, P., Stahl, U., Meyer, V., & Espeso, E. A. (2008). Two zinc finger transcription factors CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Journal*, 414(3), 419-429. <https://doi.org/10.1042/BJ20080344>
- Stroupe, C. (2018). This is the end: Regulation of Rab7 nucleotide binding in endolysosomal trafficking and autophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00129>
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *The New Phytologist*, 203(1), 32-43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(1), 12-36. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.12>
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*, 14(4), 779-790. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07056.x>
- Todd, R. B., & Andrianopoulos, A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 21(3), 388-405. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0993>
- Villarino, M., Etxebeste, O., Mendizabal, G., Garzia, A., Ugalde, U., & Espeso, E. A. (2017). Boron tolerance in *Aspergillus nidulans* is sustained by the SltA pathway through the SLC-family transporters SbtA and SbtB. *Genes*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/genes8070188>
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2003). YPXL/I Is a Protein Interaction Motif Recognized by *Aspergillus* PalA and Its Human Homologue, AIP1/Alix. *Molecular and Cellular Biology*, 23(5), 1647-1655. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.5.1647-1655.2003>
- Walsch, & Christopher. (2006). Posttranslational Modification of Proteins Expanding Nature's Inventory. Roberts and Co.
- Weidemüller, P., Kholmatov, M., Petsalaki, E., & Zaugg, J. B. (2021). Transcription factors: Bridge between cell signaling and gene regulation. *Proteomics*, 21(23-24), e2000034. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000034>

