

ÍNDICE

RESÚMEN.....	2
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Descripción general de <i>Aspergillus nidulans</i> y su ciclo de vida.....	3
1.2 Respuesta al estrés ambiental en hongos.....	4
1.3 El sistema <i>slt</i> regula la respuesta al estrés catiónico y osmótico en <i>Aspergillus</i>	4
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1 Medios de cultivo.....	6
3.2 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	7
3.2.1 Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	7
3.2.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	8
3.2.3 Plásmidos.....	8
3.2.4 Oligonucleótidos.....	8
3.3 Técnicas de Biología Celular y Molecular.....	9
3.3.1 Técnicas de PCR.....	9
3.3.1.1 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).....	9
3.3.1.2 Mutagénesis dirigida.....	10
3.3.1.3 PCR de fusión.....	10
3.3.2 Técnicas de transformación.....	11
3.3.2.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	11
3.3.2.2 Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i>	12
3.3.3 Técnicas de extracción de ADN.....	12
3.3.3.1 Purificación de plásmidos.....	12
3.3.3.2 Aislamiento de ADN de <i>Aspergillus nidulans</i>	12
3.3.4 Análisis de ADN por el método de <i>Southern blot</i>	13
3.3.5 Extracción de proteína total.....	13
3.3.6 Inmunodetección de proteínas.....	13
3.3.6.1 Determinación de carga y calidad del extracto proteico.....	13
3.3.6.2 Técnica de <i>Western blot</i>	14
3.3.7 Secuenciación.....	14
3.4 Herramientas Bioinformáticas.....	15
4. RESULTADOS.....	15
4.1 Residuos diana para mutagénesis dirigida en el putativo dominio proteasa de SltB.....	15
4.2 Construcción de cepas mutantes <i>sltB</i> ^{H1033A} y <i>sltB</i> ^{S1142A}	15
4.3 Análisis de las nuevas mutaciones generadas en SltB sobre el sistema regulatorio.....	18
4.3.1 Análisis fenotípico de las mutaciones en los transformantes.....	18
4.3.2 Efecto de las mutaciones en la expresión y procesamiento de SltB.....	19
4.4 Búsqueda de supresores de la pérdida de función en el sistema <i>slt</i>	20
5. DISCUSIÓN.....	22
6. CONCLUSIONES.....	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESÚMEN

La tolerancia a elevadas concentraciones de sales y el pH alcalino está mediada por la ruta *slt*. Dos componentes de esta ruta son el factor de transcripción SltA y la proteína señalizadora SltB, este último con dos posibles dominios funcionales. El pseudoquinasa, necesario para el procesamiento de SltA de su forma inicial (78kDa) a una de 32 kDa. El segundo podría contener una actividad peptidasa del tipo tripsina. Recientes experimentos sugieren que dicha actividad sería necesaria para el autoprocesamiento de SltB. El objetivo de este trabajo fue el análisis funcional de dos residuos (His1033 y Ser1142) que podrían formar parte de la triada catalítica del dominio proteasa. El efecto de la sustitución de estos residuos por alaninas, respectivamente, fue estudiado desde el punto de vista de la respuesta al estrés a nivel fentípico, y del procesamiento de SltB y de SltA. Se construyeron cepas mutantes que expresan como única forma de SltB a estas formas mutantes. Análisis por inmunodetección de la proteína mutante SltB^{H1033A}, reveló su bajo procesamiento, aunque suficiente para señalar a SltA, y permitiendo su procesamiento. El bajo procesamiento de SltA permite la tolerancia del hongo a la presencia de varios cationes, pero no es suficiente para soportar el pH alcalino. La forma mutante SltB^{S1142A} no es funcional, es producida a bajos niveles, no se procesa y por lo tanto no señala a SltA. Se aislaron supresores extragénicos a SltA y SltB del fenotipo de sensibilidad a 1 M NaCl causado por la pérdida de función de SltB.

ABSTRACT

Salt and alkaline pH high concentration tolerance is mediated by the *slt* pathway. Two components of this pathway are the transcription factor SltA and signaling protein SltB. SltB has two possible functional domains. The pseudokinase domain needed to process the native 78kDa SltA form to a 32kDa form. The second domain might be a trypsin like peptidase and new laboratory data suggest SltB undergo auto processing by this trypsin like activity. The aim of this research was the functional analysis of two residues (His1033 and Ser1142) that might be part of the catalytic triad of the SltB peptidase domain. The effect of the substitution of these residues by alanine respectively was analyzed by stress response of colonial growth as well as the SltA and SltB processing. Mutant strains were generated with the expressing of the SltB mutant as the only source in cell. Western blot analyses of the mutant protein SltB^{H1033A} revealed its low processing. This amount of SltB^{H1033A} processed is enough to signal SltA and let undergo its own processing. The low processing of SltA is suitable to keep the tolerance of the fungi to the presence of some cations but it is not able to keep this tolerance to alkaline environment. Western blot of SltB^{S1142A} mutant protein showed the absence of the processing of SltA and SltB. Extragenic mutations in the *slt* system were found in the suppressor mutants of loss of function of SltB, which were isolated from the growth at NaCl 1 M.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción general de *Aspergillus nidulans* y su ciclo de vida

Aspergillus nidulans, como se conoce a su forma anamorfa, (*Emericella nidulans*, en su forma teleomorfa) es un hongo filamentosos perteneciente a la familia Trichocomaceae, phylum Ascomycota (Pontecorvo *et al.*, 1953). Este hongo se caracteriza por tener un tipo de crecimiento hiperporalizado por extensión apical, formando hifas, de crecimiento lateralmente ramificado. Las células vegetativas son cenocíticas, sincitiales multinucleadas, generalmente haploides y están divididas en compartimentos por septos preformados permitiendo el intercambio de nutrientes y efectores entre éstos (Adams *et al.*, 1998). Las hifas forman una red entrecruzada conocida como micelio, el cual se expande radialmente en colonias circulares. Las células en este micelio pueden llegar a fusionarse en un proceso denominado anastomosis, aumentando la capacidad de comunicación intrahifal, mantenimiento de la homeostasis (Pontecorvo *et al.*, 1953).

Un aspecto muy importante en la utilidad del estudio de este hongo es su muy bien caracterizado ciclo de vida (Todd *et al.*, 2007). Se distinguen cuatro estadios marcados: crecimiento vegetativo, reproducción asexual, reproducción sexual y ciclo parasexual (Figura 1). El crecimiento vegetativo comienza con la germinación de una conidiospora, en la que se establece el punto de polaridad de la célula, formando hifas. El ciclo asexual está marcado por la formación de conidiosporas uninucleadas que comparten la misma dotación genética, si provienen de una misma colonia y son generadas por diferenciación celular en estructuras denominadas conidióforos. Éstas son y son características del ciclo asexual del hongo.

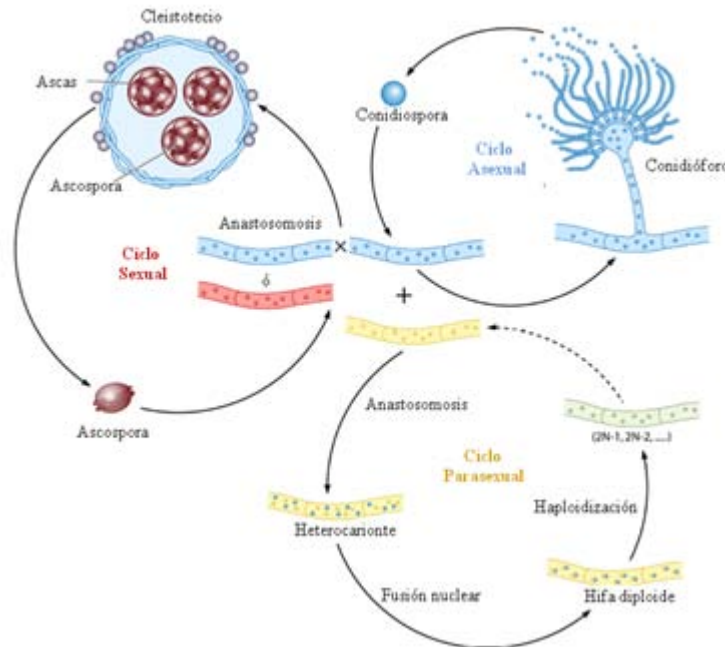


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*: Esquema de las diferentes fases del ciclo celular (ver texto para más detalle). Adaptado de Lee *et al.*, 2010.

El ciclo sexual comienza tras la fusión por anastomosis de dos hifas homocarióticas. Al ser un organismo homotálico (posee ambos genes de apareamiento HMG y alpha), permite el cruce sexual de dos cepas diferentes (o dentro la misma colonia) produciendo células heterocarióticas diploides. Estas células sufren varias divisiones meióticas y mitóticas, hasta formar ascosporas haploides binucleadas que se localizan en sacos denominados ascas, dentro de cuerpos fructíferos

(cleistotecios). Las ascas maduras, libera miles de ascosporas, cuya germinación es el comienzo de un nuevo ciclo vegetativo (Glass *et al.*, 2000; Todd *et al.*, 2007). El ciclo parasexual se inicia tras la anastomosis de dos hifas vegetativas, generando el intercambio de material celular, y dando lugar a individuos heterocarióticos con núcleos haploides (Pontecorvo *et al.*, 1953).

Aspergillus nidulans se lo reconoce como un organismo modelo de referencia, aplicables a otros miembros del género de interés comercial, como *A. oryzae*, o clínico, como *A. fumigatus* (Dyer *et al.*, 2003). Gracias a la capacidad de formar esporas sexuales, su carácter homotálico y su fácil manipulación en estudios genéticos, *A. nidulans* ha permitido obtener grandes avances en el estudio de la fisiología celular eucariótica, contribuyendo a un mayor entendimiento de la regulación génica, el control del ciclo celular, estructura de la cromatina, función del citoesqueleto, morfogénesis, homeostasis; e incluso comprender genes implicados en enfermedades metabólicas de origen genético en humanos (Galagan *et al.*, 2005).

1.2 Respuesta al estrés ambiental en hongos

Las células vivas presentan una rápida respuesta molecular al ser expuestas a condiciones medioambientales adversas (Mager and Kruijff, 1995). Los hongos no son la excepción, en los cuales, su diversidad está marcada por la heterogeneidad de los nichos que ocupan. Muchos de estos nichos no son constantes, más bien fluctuantes, presentando cambios repentinos de condiciones de estrés. Entre estas condiciones podemos citar la limitación de nutrientes, cambios en temperatura, luz, osmolaridad, pH, formas reactivas de oxígeno, exposición a toxinas ambientales y otros microorganismos (Gasch, 2007).

Es así que los hongos han desarrollado sistemas elaborados para medir las características de su medio ambiente y generar respuestas rápidas al estrés que enfrenten. Para esto poseen un amplio programa de expresión génica que modula dicha respuesta. Un sistema de respuesta específico para mantener las condiciones internas óptimas frente a un tipo de estrés específico puede no ser útil en otras condiciones, y el organismo debe ser capaz de ajustar su expresión génica para lograr adaptarse rápidamente (Mager & Kruijff, 1995; Gasch, 2007).

Éstas variaciones en el patrón de expresión génica provocan cambios a nivel metabólico en el microorganismo y permiten la síntesis de enzimas y transportadores transmembrana, que activan rutas generales o específicas, que regulan la homeostasis de cationes y pH, afectan el desarrollo e integridad celular y permiten la diferenciación celular (Etxebeste *et al.*, 2010a).

1.3 El sistema *slt* regula la respuesta al estrés catiónico y osmótico en *Aspergillus*

Un miembro de este sistema es el factor transcripcional (FT) de dedos de zinc SltA, cuyo gen *sltA* (*stzA*) fue identificado por O'Neil *et al.* (2002), a partir de una cepa mutante de *Aspergillus nidulans* (*sltA1*), el cual reducía la sensibilidad al estrés abiótico ocasionado por elevadas concentraciones de sales y pH alcalino. De hecho, se ha demostrado que la ausencia de SltA en la células genera una alta sensibilidad a determinadas concentraciones de sales mono- y divalente, a excepción del calcio (Spielvogel *et al.*, 2008). No se han encontrado homólogos de este gen en levaduras, siendo exclusivo de hongos filamentosos, y en el único organismo que ha sido estudiado es *Hypocrea jeconiana* en el cual lleva el nombre de ACE1 (Chilton *et al.*, 2008).

Cepas mutantes para este locus fueron aisladas como supresoras de la pérdida de función de ciertos genes *vps* (*vacuolar protein sorting*), pertenecientes a la ruta PacC de respuesta al estrés por pH. Éstas mutaciones en *sltA* suprimían el efecto morfológico ocasionado por las mutaciones en los genes *An-vps32* y *An-vps36* (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011). En éste mismo estudio se aislaron cepas que portaban mutaciones en otro locus, el cual se denominó *sltB*. Éste gen se definió como otro miembro de la ruta *slt* ya que mutaciones Δ *sltA* o Δ *sltB* presentan un fenotipo

indistinguible, y a demás, su doble mutante nulo no presenta un fenotipo aditivo. La proteína de señalización (PS) SltB de igual forma es específica para hongos filamentosos y posee dos dominios claramente definidos; la región N-terminal, una pseudoquinasa que guarda relación con una Ser/Thr quinasa; y la región C-terminal, que tiene una identidad peptidasa del tipo tripsina.

Este sistema está siendo caracterizado por la Unidad de Genética Molecular en *Aspergillus* del CSIC-CIB, logrando grandes avances en su comprensión. Se ha observado la presencia de dos formas de SltA; una forma “nativa” de menor movilidad electroforética (100kDa), denominada SltA^{78kDa} y otra forma truncada de mayor movilidad (45kDa), denominada SltA^{32kDa}. Por otro lado, se tiene evidencia de que SltB sufre autoproteólisis gracias a su actividad proteasa, lo separando sus dos dominios, SltB^{prot} y SltB^{kin}. Una vez identificadas las formas de los dos elementos del sistema podemos explicar la relación funcional entre ellos (Figura 2). SltA es sintetizado como una forma de 78kDa (SltA^{78kDa}) y la señal para su procesamiento a la forma de 32kDa es proporcionada por SltB^{kin}. Sin embargo SltB no es la proteasa que media este proceso proteolítico y actualmente la identidad de dicha proteasa es desconocida.

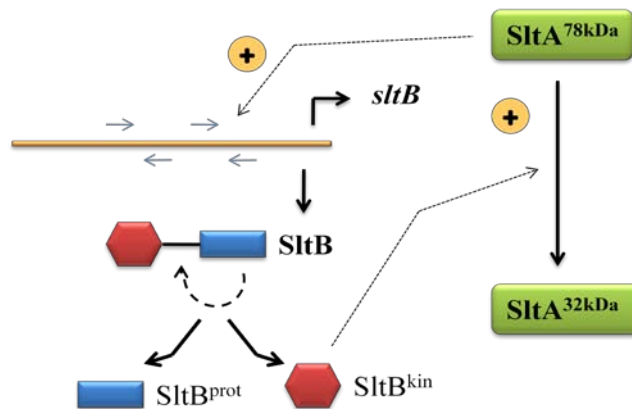


Figura 2. Relación funcional entre el factor transcripcional SltA y la proteína de señalización SltB. (Ver texto para más detalle).

La expresión de SltB depende de la presencia de SltA en la célula, y se sabe este hecho ya que es imposible detectar SltB tanto en mutantes $\Delta sltA$, como doble mutantes $\Delta sltA$, $\Delta sltB$. Se cree que la forma nativa del FT permite la expresión de la PA, aunque nueva evidencia apunta que la forma SltA^{32kDa} sería suficiente para generar la expresión. Este sistema guarda gran similitud con el sistema PacC, también señalizado por procesamiento proteolítico limitado (Diez *et al.*, 2002), aunque, por otro lado, se ha detectado que SltA^{32kDa} se encuentra en dos formas, nativa y fosforilada, lo que significaría un sistema de modificación postraduccional más complejo.

En este estudio nos centramos en la caracterización del centro catalítico del dominio proteasa de la proteína de señalización SltB. La función o activación de esta proteína precisa también de un paso proteolítico. Evidencia experimental indica que el dominio proteasa está realizando dicha digestión para así liberar al fragmento con actividad quinasa. La búsqueda en bases de datos especializadas demuestra que el dominio proteasa de SltB tiene una alta similitud con peptidasas del tipo tripsina, y pertenece a la familia de peptidasas S64. El único miembro de esta familia es la endoproteasa Ssy5 de *Saccharomyces cerevisiae* (Abdel-Sater *et al.*, 2004). Esta endoproteasa cataliza el truncamiento del FT Stp1, y promueve la transcripción del gen *AGPI*, el cual codifica una permeasa encargada de la captación de aminoácidos del medio ambiente. SltB parece poseer la actividad autocatalítica de las tripsinas como Ssy5 (Polgár, 2005). Sin embargo la organización molecular de SltB y Ssy5 son muy diferentes dado que en el caso de SltB existe un dominio pseudoquinasa, lo que puede representar un origen evolutivo más sorprendente. Esta

característica hace única a SltB, de quien no se han observado similitudes significativas con otras proteasas en las bases de datos disponibles.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Conociendo la identidad molecular del dominio proteasa de la proteína SltB, como una peptidasa del tipo tripsina, la línea principal de esta memoria está encaminada a la identificación de los residuos que conforman su centro catalítico. Se sabe que las peptidasas tripsina, poseen en su centro activo una triada catalítica, la cual, en este tipo de peptidasas, está constituida generalmente por los residuos His-Asp-Ser (Polgár, 2005). Tomando esto como referente y utilizando la potente herramienta que representa el acceso público a la secuencia total del genoma de *Aspergillus nidulans*, se pretende identificar y caracterizar los miembros de esta triada. Esto significaría un gran aporte al entendimiento del mecanismo molecular que posee esta proteína, y su relación funcional con SltA; temas que están siendo abordados ampliamente en el laboratorio de la UGMA (CSIC-CIB). Los datos arrojados en este trabajo contribuirán a describir un mecanismo de señalización nuevo y único de hongos filamentosos, el cual media la respuesta al estrés salino y pH alcalino. Basándonos en esto, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aprender el fundamento de las técnicas y metodologías de laboratorio utilizadas para el manejo, estudio y análisis funcional de sistemas de señalización molecular en *Aspergillus nidulans*.
2. Generar sustituciones en los residuos predichos de formar parte de la triada catalítica del dominio proteasa de SltB, mediante mutagénesis dirigida en los tripletes que los codifican.
3. Construir mutantes que expresen proteínas mutantes SltB etiquetadas con GFP, generando así nuevos alelos en el gen *sltB* mediante recombinación homóloga.
4. Analizar y relacionar el fenotipo (tanto a nivel colonial como molecular) de los nuevos alelos *sltB* con el fenotipo de mutantes observado en ensayos de crecimiento en placa, bajo distintas condiciones de estrés salino y pH alcalino.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medios de cultivo

Para el mantenimiento y estudio fenotípico de las cepas de *A. nidulans* analizadas en este estudio, se emplearon medios de cultivo sólidos y líquidos con la misma composición, difiriendo únicamente en la adición de agar Oxoid al 1,5% (p/v) obteniendo medio sólido. Los medios de cultivo fueron suplementados con una solución de sales (KCl 17 mM, MgSO₄·7H₂O 5 mM y KH₂PO₄ 11 mM), y de elementos traza (Cove, 1966). El pH fue ajustado a 6,8 con una solución concentrada de NaOH. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 110° C.

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

Contiene la misma base de sales anteriormente descrita, a la que se complementó con una fuente de carbono y otra de nitrógeno (D-glucosa al 1 % p/v y tartrato de amonio 5 mM respectivamente); además, de los suplementos vitamínicos requeridos de acuerdo a las necesidades metabólicas de cada cepa utilizada (ej. Ácido p-aminobenzoico 14 µM, Biotina 0,04 µM, etc.)

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

Compuesto por los mismos elementos que el MMA al que se añade una solución de casaminoácidos al 0,15 % (v/v), bactopectona al 0,2 % (p/v) y extracto de levadura 0,1 % (p/v).

El medio fue suplementado con una solución de vitaminas (Tiamina 160 μM , Biotina 0,04 μM , Ácido nicotínico 10 mM, Pantotenato de calcio 24 μM , Piridoxina-HCl 2,5 μM , Riboflavina 6 μM , Ácido p-aminobenzoico, 14 μM , Inositol 0,65 mM).

- **Medio mínimo de regeneración de *Aspergillus* (MMR)**

Con la misma composición del MMA sólido al que se le añadió 1M de sacarosa como estabilizante hiperosmótico para permitir la regeneración de los protoplastos.

- **Análisis fenotípico de respuesta al estrés catiónico y pH alcalino**

Los ensayos de crecimiento en condiciones de estrés para analizar el fenotipo de las diferentes cepas generadas en este trabajo fueron realizados en medio de cultivo MMA sólido. A este medio se le añadió el compuesto que causaba el estrés: las sales monovalentes LiCl 0,3 M y NaCl 1 M; las sales divalentes CaCl_2 0,05 M y MgCl_2 0,2 M, y fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4 0,1 M) para obtener la alcalinización del medio a un valor de pH = 8,0.

- **Medio Luria Bertani (LB)**

Este medio se utilizó para el mantenimiento de cepas de *Escherichia coli*, el clonaje y la propagación de plásmidos recombinantes. Los plásmidos utilizados portaban el gen de resistencia al antibiótico β -lactámico ampicilina añadido al medio, como sal sódica, a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La selección de plásmidos recombinantes, utilizando la producción de la enzima β -galactosidasa como marcador o reportero, se realizó añadiendo al medio LB, Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG 100 mM) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal 2 % v/v).

3.2 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados

3.2.1 Cepas de *Aspergillus nidulans*

Las cepas utilizadas en este trabajo y sus diferentes genotipos se encuentran detallados a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *Aspergillus nidulans*

Cepa #	Genotipo
MAD1427	<i>pyrG89, pabaA1, riboB2, $\Delta nkuA::argB^+$</i>
MAD2733	<i>pyrG89, pabaA1, riboB2, $\Delta nkuA::argB^+$</i>
MAD3652	<i>pyrG89, pabaA1, argB2, $\Delta nkuA::argB^+$, <i>sltA::HA3::pyrG^{Af}, riboB2</i></i>
MAD3682	<i>pyrG89⁺, pabaA1, argB2, $\Delta nkuA::argB^+$, riboB2, $\Delta sltB::riboB^{Af}$</i>
MAD3751	<i>pyrG89, <i>sltA::HA3::pyrG^{Af}, sltB::gfp::riboB^{Af}, pabaA1, argB2, $\Delta nkuA::argB^+$, riboB2</i></i>
MAD4013	<i>biA1, pantoB100, pyrG89, <i>sltB-53::gfp::pyrG^{Af}, nku::bar(?)</i></i>
MAD4487	<i>biA1, pantoB100, pyrG89, <i>sltA::HA3::pyrG^{Af}, sltB-53, nku::bar(?)</i></i>
MAD4731	<i>pyrG89, pabaA1, argB2, $\Delta nkuA::argB^+$, <i>sltA::HA3::pyrG^{Af}, riboB2, sltBHis1033::gfp::riboB^{Af}</i></i>
MAD4732	<i>pyrG89, pabaA1, argB2, $\Delta nkuA::argB^+$, <i>sltA::HA3::pyrG^{Af}, riboB2, sltBHis1033::gfp::riboB^{Af}</i></i>
MAD4760	<i>pyrG89, pabaA1, argB2, $\Delta nkuA::argB^+$, <i>sltA::HA3::pyrG^{Af}, riboB2, sltBSer1142::gfp::riboB^{Af}</i></i>

Cepa #	Genotipo
MAD4761	<i>pyrG89, pabaA1, argB2, ΔnkuA::argB⁺, sltA::HA3::pyrG^{A.f}, riboB2, sltBSer1142::gfp::riboB^{A.f}</i>

3.2.2 Cepas de *Escherichia coli*

El nombre y genotipo de las cepas de *E. coli* que fueron usadas para la clonación de plásmidos y su propagación se detallan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo
DH5α	endA1 recA1 gyrA96 thi-1 glnV44 relA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) λ ⁻
DH1	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻

3.2.3 Plásmidos

P1830: Este plásmido porta un fragmento codificante para un conector de glicina-alanina (x5), seguido de la proteína fluorescente verde (GFP) en fase y de un fragmento genómico del locus *riboB* de *Aspergillus fumigatus*. Fue utilizado como molde en PCR para obtener el fragmento de GA5x-GFP/RiboBAf que se emplea en el etiquetado de proteínas con GFP.

pGEM®-T easy: Plásmido utilizado para la clonación del fragmento de *sltB*, tanto silvestre como mutagenizado. Este plásmido pertenece a la casa comercial Promega y está incluido en el kit para uso en laboratorio pGEM®-T Easy Vector Systems I. Contiene en su secuencia la región codificante del gen de resistencia a ampicilina (marcador de selección) y el gen *lacZ* (marcador de selección), con un sitio múltiple de clonaje en el interior de su marco de lectura.

3.2.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCR y en la secuenciación de fragmentos de ADN están detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'	Objetivo
sltB secu 2 (49)	TCGCAACCAGTGGCTGTGGC	Fragmento <i>sltB</i> / PCR de fusión / Secuenciación
sltB gfp GSP2 (8)	AGCAAGCTGTCTTTCCAGACTGCGACC	Fragmento <i>sltB</i>
sltB mut His1033 (60)	CACGACAGGGCATCAAGGCTGAAATCG ACTGGGC	Mutagénesis dirigida His → Ala
sltB mut His31033 compl (61)	AGTCGATTCAGCCTTGATGCCCTGTCTG TGTCACG	Mutagénesis dirigida His → Ala
sltB gfp GFP1 (9)	GGTCGCAGTCTGGAAAGACAGCTTGCTG GAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Fragmento GFP:: <i>RiboB</i> ^{A.f}
sltB nulo GFP2 (4)	GCACAGTGGACGGGGTAAGGTGAGTCT GAGAGGAGGCACTGATGC	Fragmento GFP:: <i>RiboB</i> ^{A.f}
sltB nulo GSP3 (5)	TCACCTTACCCCGTCCACTGTGC	Fragmento UTR 3' de <i>sltB</i>

Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'	Objetivo
sltB nulo GSP4 (6)	CGAAAGAAGCTCTACATTGTCCACGAGG AT	Fragmento UTR 3' de <i>sltB</i> / PCR de fusión
sltB mut Ser1142 (62)	GAGTTCCCGGTGATGCTGGCGCTTGGGT CTTTG	Mutagénesis dirigida Ser → Ala
sltB mut Ser1142 compl (63)	AAGACCCAAGCGCCAGCATCACCGGGA ACTCCG	Mutagénesis dirigida Ser → Ala
sltB gfp GSP1 (7)	GCCTTCATGAATGAAGAACATCTCCCTC	Secuenciación
secu sltA promoter (26)	TTGGTCACGATCAGTGAG	Secuenciación
secu sltB promoter (27)	TCAACGACAGCGCTCGC	Secuenciación
secu pyrGA.f general (36)	ATTGCTGTTGCCAGGTGAGG	Secuenciación
sltA gsp5 (38)	GCTCAGAGAGTCCATTGTCATGC	Secuenciación
sltA gsp7 (47)	AGGGCTCCGCAACTTAGACTCG	Secuenciación
sltB secu 1 (48)	GCTTATGACCTCCTTATGGC	Secuenciación
sltB secu 2 (49)	TCGCAACCAGTGGCTGTGGC	Secuenciación
sltB secu 3 (50)	CGGTTTGAGGAGCTTGGTGGC	Secuenciación
sltA secu 1 (51)	TTCCGAAGCGCCTGACTAC	Secuenciación
sltA secu 2 (52)	CAGTATTCTCGCTCGCTCCG	Secuenciación
sltB-F1 (MS 19)	AGTCCTGGCGGTGATCTGGGC	Secuenciación

3.3 Técnicas de Biología Celular y Molecular

Los reactivos químicos y suplementos utilizados fueron de alto grado de pureza para uso en biología molecular, en general de las marcas Fluka, Merck, Oxoid y Sigma. Las enzimas de restricción procedían de New England Biolabs, Roche y la ADN polimerasa de Takara.

3.3.1 Técnicas de PCR

Los diferentes fragmentos y construcciones de ADN generados en este estudio fueron amplificados a partir de ADN genómico o plasmídico utilizando técnicas estandarizadas de PCR del laboratorio. Todos los productos de PCR fueron purificados directamente o a partir de geles de TAE/agarosa sometidos a electroforesis horizontal, utilizando los kits comerciales QIAquick® PCR Purification Kit y QIAquick® Gel Extraction Kit respectivamente, ambos de la casa comercial QIAGEN y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.3.1.1 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR se utilizó para generar fragmentos de ADN con diferentes usos. Así también se amplificaron los diferentes fragmentos que serán utilizados para la elaboración de la construcción genómica quimérica, descrita en el apartado 3.3.1.3 (Figura 3). A partir de ADN genómico de la cepa MAD1427, se amplificó un fragmento de 1853 pb que contiene el extremo 3' de la secuencia nucleotídica del gen silvestre de *sltB*, así como los codones a ser mutados, y del que se ha eliminado el codón de terminación de la traducción. El fragmento *gfp::riboB^{Af}* fue amplificado a partir del plásmido p1830, obteniendo una secuencia de 2947 pb; los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de este fragmento (Tabla 3) añadieron a sus

extremos secuencias solapantes (~25 pb) tanto con el fragmento de *sltB* como con el fragmento terminador 3'UTR del mismo gen. Por último, se amplificó el terminador del gen *sltB* (3'UTR) a partir de ADN genómico de la cepa de tipo silvestre MAD2733, obteniendo un fragmento de 1559 pb.

La reacción de PCR utilizada en todas las amplificaciones contenía 0,75 U de ADN polimerasa PrimeSTAR® HS DNA Polymerase de Takara, 200 µM de cada base nitrogenada y 0,3 µM de cada oligonucleótido (Tabla 3), en un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación consistieron en una denaturalización inicial a 98 °C durante 2 minutos; seguidos de 25 ciclos que de con denaturalización a 98 °C durante 10 segundos, seguido de anillamiento del ADN a 55 °C durante 5 segundos y extensión por la polimerasa a 72 °C durante 1 minuto por cada kilobase de producto; y una extensión final a 72 °C durante 8 minutos.

3.3.1.2 Mutagénesis dirigida

Con el fin de producir mutaciones puntuales en el teórico sitio catalítico del dominio proteasa de la proteína señalizadora SltB, se produjeron cambios de en los tripletes que codifican para histidina 1033 y la serina 1142, para que codificaran para alanina en ambos casos. Con ese objetivo se realizó la siguiente estrategia. parte de la secuencia genómica silvestre de

Como molde para la PCR de mutagénesis dirigida se utilizó un plásmido pGEM®-T easy recombinante que contenía parte de la secuencia genómica silvestre de *sltB* (sección 3.3.1.1). Los oligonucleótidos utilizados poseen en su secuencia las bases nucleotídicas que darán lugar a los cambios descritos (Tabla 3, Tabla 5). Durante la amplificación por PCR, la incorporación de la secuencia de los oligonucleótidos por parte la DNA polimerasa *PfuTurbo*® DNA polymerase, genera plásmidos que contienen la mutación deseada. La reacción de PCR contenía 2,5 U de ADN polimerasa y 0,3 µM de cada oligonucleótido en un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación consistieron en una denaturación inicial a 95 °C durante 30 segundos; seguido de 15 ciclos de denaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 10 minutos; y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

El producto de PCR fue tratado con la endonucleasa *DpnI* durante una hora a 37 °C, degradando el plásmido parental y las moléculas híbridas parental/copia. La enzima *DpnI* hidroliza ADN metilado o hemimetilado en la secuencia 5'-Gm⁶ATC-3'. El plásmido recombinante formado fue posteriormente clonado en la cepa *E coli* DH1 (sección 3.3.2.1). Los plásmidos obtenidos fueron analizados mediante secuenciación para determinar la presencia de las sustituciones introducidas así como de la ausencia de cambios no deseados. A partir de éste plásmido se obtuvo el fragmento *sltB* mutagenizado para ser usado como molde en la PCR de fusión (sección 3.3.1.3).

3.3.1.3 PCR de fusión

El fin de esta técnica de PCR es generar fragmentos de ADN mediante la fusión de otros más pequeños que contienen en sus extremos regiones comunes. Estas construcciones o casetes están destinadas al reemplazamiento génico mediante recombinación homóloga, y se han empleado en la generación de alelos mutantes que expresan formas etiquetadas con proteínas fluorescentes. La PCR de fusión se realizó utilizando como molde la mezcla de los fragmentos GFP::RiboB^{A.f.}, el fragmento del gen *sltB* mutagenizado y el 3'UTR amplificados previamente (ver secciones 3.3.1.1 y 3.3.1.2), obteniendo así el casete *sltB*^{*}::*gfp*::*riboB*^{A.f.}::3'UTR (Figura 3). El gen *riboB* de *Aspergillus fumigatus* fusionado a GFP tiene la función de marcador de selección dado que complementa el requerimiento de riboflavina que la mutación *riboB2* produce en su homólogo de *A. nidulans*. Esta técnica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Yang *et al.*, 2004.

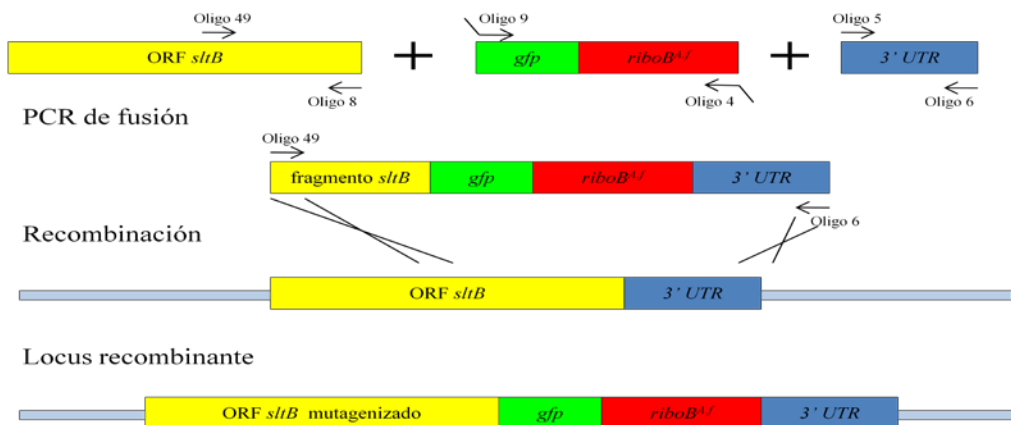


Figura 3. Construcción del casete de ADN y posterior recombinación homóloga. Se amplifican los fragmentos utilizando oligonucleótidos específicos para cada caso (Oligo#, ver Tabla 3). En la amplificación del fragmento *gfp::riboB^{Δf}* se utilizaron oligonucleótidos cuyo extremo 5' solapó complementariamente con los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos *sltB* y 3' UTR, respectivamente. El casete generado fue utilizado para transformar la cepa silvestre MAD3652, construyendo las cepas mutantes *sltB^{H1033A}* y *sltB^{S1142A}* gracias a un doble proceso de recombinación homóloga en el locus.

La reacción de PCR contenía 0,75 U de ADN polimerasa PrimeSTAR® HS DNA Polymerase, 200 μM de cada dNTP y 0,3 μM de cada oligonucleótido (Tabla 3), en un volumen final de 50 μL. Las condiciones de amplificación consistieron en una denaturación inicial a 98 °C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de denaturación a 98 °C durante 10 segundos, seguido de anillamiento del ADN a 55 °C durante 5 segundos y finalmente extensión a 72 °C durante 7 segundos; a continuación 15 ciclos de una denaturación inicial a 98 °C durante 10 segundos, seguidos por anillamiento a 58 °C durante 5 segundos y finalmente extensión a 72 °C durante 7 minutos más un incremento de 20 segundos por cada ciclo de amplificación; el programa concluye con una extensión a 72 °C durante 9 minutos.

3.3.2 Técnicas de transformación

El objetivo de esta técnica es el de introducir o insertar secuencias de ADN foráneo en una célula receptora o en su genoma, con la finalidad de propagar este ADN o de expresar su la proteína que codifique.

3.3.2.1 Transformación de *Escherichia coli*

Esta técnica es utilizada para la propagación y selección de vectores recombinantes; en este estudio fue utilizado para la clonación del plásmido recombinante con el fragmento *sltB*.

El primer paso fue insertar el fragmento silvestre en dicho plásmido, utilizando T4 DNA Ligase y 2x Rapid Ligation Buffer, ambos incluidos en el kit para laboratorio pGEM®-T Easy Vector System I; siguiendo las recomendaciones del fabricante. El plásmido conteniendo el fragmento silvestre de *sltB* fue transformado en la cepa DH5α de *E. coli* (Tabla 2) mediante shock térmico. Las células de *E. coli* sometidas al proceso de transformación fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C en medio sólido LB conteniendo ampicilina (100 μg/mL), IPTG (100 mM) y X-gal (2 % v/v) como marcadores de selección. La incubación con ampicilina asegura el crecimiento únicamente de células que han integrado el plásmido, ya que éste contiene el gen de resistencia al antibiótico. Solo las colonias blancas son seleccionadas como transformantes que han captado el inserto (se observan colonias azules y blancas). La β-galactosidasa traducida por el gen *lacZ* incluido en el plásmido pGEM®-T Easy, hidroliza el X-gal en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol; este último es oxidado en un compuesto azul insoluble dando esta coloración a la

colonia. La secuencia del gen *lacZ* parte de la secuencia genómica silvestre de incluye un sitio múltiple de clonación en donde ocurre la inserción del fragmento de interés. Este evento corta la traducción de β -galactosidasa viable, truncando el sistema y generando colonias blancas.

Esta técnica fue utilizada de igual forma para clonar y seleccionar el plásmido recombinante que porta la mutación generada en la sección 3.3.1.2. Este plásmido fue transformado en la cepa DH1 de *E. coli* (Tabla 2) mediante shock térmico. Las células de *E. coli* sometidas al proceso de transformación fueron incubadas en medio sólido LB conteniendo únicamente ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bajo las mismas condiciones descritas en este apartado, permitiendo el crecimiento únicamente de las células que integraron el plásmido.

3.3.2.2 Transformación de *Aspergillus nidulans*

Con esta técnica se insertó mediante recombinación homóloga la construcción descrita en el apartado 3.3.1.2 (*sltB*^{*}::*gfp*::*riboB*^{A.f.}::3'UTR), al correspondiente locus *sltB*. La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Tilburn *et al.*, (1983). La primera parte de la técnica está destinada a la obtención de protoplastos viables. Para esto se inoculó conidiosporas de la cepa a ser transformada en MMA suplementado de acuerdo a las necesidades. Se incubó el cultivo a 30 °C durante 14 horas. El micelio fue filtrado a través de muselina estéril con un poro de 22 – 25 μm , y alrededor de 1 g de éste, fue suspendido en tampón de protoplastos ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Na_2HPO_4 0,2 M; NaH_2PO_4 0,2 M; pH 5,8). La pared celular fue tratada enzimáticamente mediante incubación por dos horas a 30 °C con Vinoflow® FCE (Novozymes) (200 mg por gramo de micelio), para luego verificar la presencia de protoplastos mediante microscopía óptica. A continuación se realizó la purificación de protoplastos añadiendo, sin mezclar, solución de flotación (D-Sorbitol 0,6 M; Tris-HCl 1 M; pH 7,5) para luego ser centrifugando a 4400 g durante 10 minutos a 4 °C. Se lavó el precipitado con solución ST (D-Sorbitol 1 M; Tris-HCl 1 M), centrifugando primero a 2800 g por 10 minutos a 4 °C y luego 4 veces más a 5000 r.p.m. durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los protoplastos fueron resuspendidos en solución STC (D-Sorbitol 1 M; Tris-HCl 10 mM; CaCl_2 10 mM; pH 7,5). Tras la obtención y purificación de protoplastos se procedió a su transformación. Para esto se incubó a 4 °C durante 20 minutos, 200 μL de la suspensión de STC (10^6 protoplastos/ml) junto con 300 ng de la construcción descrita en el apartado 3.3.1.2 y 50 μL de solución PEG (polietilenglicol 6000 60 % p/v; Tris-HCl 10 mM; CaCl_2 10 mM; pH 7.5). Los protoplastos transformados se incubaron en MMA suplementado adecuadamente a 37 °C durante tres días, para luego ser purificados a homocariosis mediante replicado de conidiosporas.

3.3.3 Técnicas de extracción de ADN

3.3.3.1 Purificación de plásmidos.

Para la purificación de plásmidos se utilizó el kit comercial High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.3.3.2 Aislamiento de ADN de *Aspergillus nidulans*

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio liofilizado. En primer lugar, se cultivó una suspensión de 10^6 conidiosporas/mL en Tween 10^{-4} al 0.01% (v/v), en MMA líquido suplementado adecuadamente, a 37°C con agitación a 120 rpm y durante 16 horas. Al término de este tiempo, el micelio fue filtrado a través de Miracloth y liofilizado durante 18 horas (liofilizador Cryodos, Telstar). El micelio fue pulverizado en el molino FP120 Fast Prep Cell Disruptor (BIO101/Savant), con un pulso de 20 segundos de duración, a potencia 4.0 y la ayuda de una bola de cerámica. El polvo del micelio fue lisado con 1 mL de solución de Tris 25 mM pH 8.0, sacarosa 250 mM y EDTA 20 mM, junto con 100 μL de SDS 10%. Esta suspen

incubada a 65 °C durante 15 minutos. El DNA genómico fue deproteínizado mediante tratamiento con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (49:49:1) y precipitado selectivamente con una mezcla de acetato sódico (3 M, pH: 6) e isopropanol. Tras varios pasos de centrifugación y lavado del precipitado con etanol al 80%, el ADN precipitado y seco fue resuspendido en agua Mili-Q estéril e incubado durante una hora con RNasa (5mg/mL) a 37 °C. Por último fue precipitado nuevamente y el sedimento lavado con etanol al 80% (v/v). Finalmente, el ADN se almacenó en solución acuosa a -20 °C.

3.3.4 Análisis de ADN por el método de *Southern blot*

La correcta recombinación homóloga en el locus correspondiente a la construcción obtenida en la sección 3.3.1.3, fue analizada observando patrones de bandeo específicos generados a partir de la digestión enzimática del ADN genómico aislado de transformantes de *A. nidulans*, mediante marcaje radioactivo con sondas nucleotídicas. El ADN aislado en la sección 3.3.3.2 fue digerido con la endonucleasa *BglIII* (Takara) durante 16 horas a 37 °C. El producto de la digestión fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. El gel fue sumergido en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos, luego fue fotodocumentado y, el ADN, fragmentado mediante exposición directa a luz UV, durante 5 minutos, en un transiluminador (BioRad GelDoc System). A continuación, el gel se incubó con solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M) durante 45 minutos, se lavó con agua y posteriormente se incubó en solución neutralizante (0,5 M TrisHCl pH 7,5 y 3 M NaCl) durante 45 minutos adicionales. Tras esta segunda incubación se lavó el gel con tampón 2xSSC y se realizó la transferencia del ADN a una membrana de nylon por capilaridad (16 horas), según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). El ADN fue fijado a la membrana exponiéndola a luz UV durante 5 minutos. La hibridación DNA-DNA, así como el marcaje radiactivo de las sondas con α -P³²dCTP, fue realizado por otros miembros del laboratorio. Para visualizar las bandas de hibridación se utilizó un sistema de análisis de imágenes Phosphorimager Fujifilm FLA-3000.

3.3.5 Extracción de proteína total

La proteína total de *A. nidulans* fue extraída a partir de micelio liofilizado y pulverizado, obtenido de igual forma que en la sección 3.3.3.2. Este polvo fue resuspendido en tampón de lisis (NaOH 200 mM; β -Mercaptoetanol 0,2 % (v/v)). Las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) 7,5 % (v/v) e incubándolas en hielo durante 10 minutos. Se obtuvo un precipitado mediante doble centrifugación 14000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Las proteínas son resuspendidas en Tris base 1 M y tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2 % v/v; β -Mercaptoetanol 5 % v/v; Urea 6 M; azul de bromofenol). La suspensión fue hervida a 90 °C durante 2 minutos y centrifugada a máxima velocidad durante 1 minuto. Antes de cada uso, la muestra fue hervida y centrifugada nuevamente.

3.3.6 Inmunodetección de proteínas

3.3.6.1 Determinación de carga y calidad del extracto proteico

Se utilizó SDS-PAGE (*polyacrylamide-gel electrophoresis*) para estimar la calidad del extracto y la cantidad de proteína total a utilizar en cada ensayo de *Western blot*. Se prepararon geles de poliacrilamida 10 % (v/v) cargando 10 µL de muestra por pocillo y utilizando el sistema estándar de tampón de electroforesis SDS-PAGE (14,4 g de glicina, 3 g de Trizma base, 1 g SDS). Al término de la separación electroforética, el gel se lavó dos veces con agua destilada durante 10 minutos y a continuación se tiñeron las proteínas tratando durante 60 min con Coomassie (Bio-Safe™ Coomassie G-250, BioRad), y posterior eliminación del tinte sobrante con diferentes lavados con agua destilada. Comparando la intensidad entre las muestras observadas con la tinción, se decidió el volumen de extracto a cargar en los ensayos de *Western blot* (ver siguiente

sección).

3.3.6.2 Técnica de Western blot

Los ensayos de *Western blot* se realizaron siguiendo el protocolo general del Laboratorio. Se prepararon geles SDS-PAGE y las proteínas de los extractos a analizar se resolvieron en el sistema de electroforesis vertical Mini-PROTEAN® Tetra System de la casa comercial (Bio-Rad). En cada pocillo se cargaron entre 5 y 10 μ L de cada muestra, dependiendo de la estimación de carga a partir de la tinción con Coomassie (sección 3.3.6.1).

Concluida la electroforesis, las proteínas separadas monodimensionalmente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, para su posterior análisis y detección con anticuerpos específicos para cada caso. La transferencia se realizó utilizando el sistema Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System de Bio-Rad, utilizando la membrana de nitrocelulosa incluida en el Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack de Bio-Rad (Figura 4).

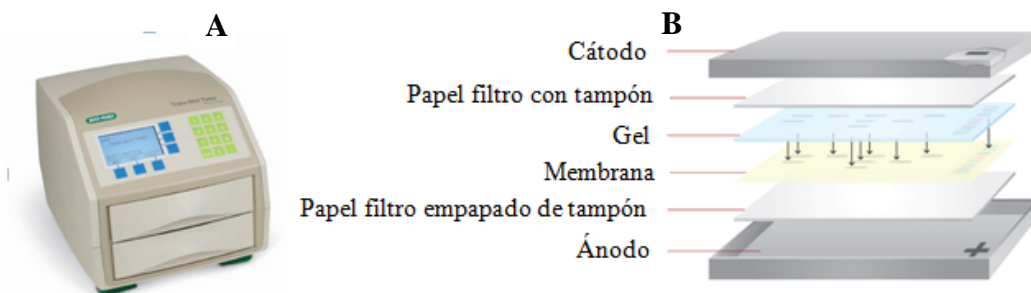


Figura 4. Esquema del montaje de *Western blot*. A) Equipo Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System de Bio-Rad. B) Elementos del montaje.

En la Figura 4 se representa este sistema de electotransferencia de alta velocidad y efectividad. Las proteínas transferidas con este método se detectaron, según la forma etiquetada, con los anticuerpos primarios detallados en la Tabla 4. El anticuerpo secundario utilizado se eligió de acuerdo con el organismo origen del anticuerpo primario. Todos los anticuerpos secundarios utilizados están conjugados a la peroxidasa de rábano. La actividad peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Las imágenes se obtuvieron mediante un analizador de imágenes de quimioluminiscencia 06-LAS3000Q (TDI) y se analizaron con el programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en este estudio.

Anticuerpo		Dilución	Fuente	Referencia
Primario	α -GFP	1:5000	Ratón	Roche
	α -actina	1:50000	Ratón	Biomedicals
	α -HA	1:1000	Rata	Roche
Secundario	α -mouse IgG	1:4000	Cabra	Sigma
	α -rat IgM+G	1:4000	Cabra	Biotech

3.3.7 Secuenciación

Todas las construcciones y la presencia de las mutaciones en los alelos mutantes generados fueron verificadas mediante secuenciación automática de fragmentos de PCR o plásmidos directamente. El material fue enviado al servicio de secuenciación del CSIC-CIB. Los CDS, tanto

el gen *sltA* como del gen *sltB* mutagenizado, fueron amplificados en su totalidad mediante PCR a partir del ADN genómico aislado como se indica en la sección 3.3.3.2. Debido al tamaño del producto de PCR, y con la finalidad de obtener una fiable calidad de secuencia, se decidió utilizar diferentes oligonucleótidos (Tabla 3) para obtener 6 diferentes secuencias de cada gen, las cuales en conjunto resultaban en la extensión total de la secuencia del gen.

3.4 Herramientas Bioinformáticas

El análisis de secuencias, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se realizó utilizando la base de datos de *A. nidulans*, de libre acceso a través de NCBI. Las búsquedas en bases de datos se realizaron con el algoritmo BLAST en www.aspergillusgenome.org y a través del Instituto Broad en http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/. El programa Vector NTI8 (Invitrogen) fue utilizado para la representación de las construcciones y la localización de las enzimas de restricción utilizadas. El software informático GenDoc fue utilizado para el análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación.

4. RESULTADOS

4.1 Residuos diana para mutagénesis dirigida en el putativo dominio proteasa de SltB

Los análisis bioinformáticos dirigidos a identificar el tipo de proteína y familia a la que pertenece SltB, así como sus dominios conservados fueron realizados previamente en el laboratorio. Para ello se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias peptídicas de SltB y sus posibles ortólogos mostrando las regiones más conservadas. El programa bioinformático InterProScan reveló la presencia de dos posibles dominios funcionales en SltB. Un dominio quinasa y otro dominio peptidasa del tipo tripsina basado en residuos de serina o cisteína (Figura 5). La base de datos MEROPs especializada en peptidasas, predijo que SltB pertenece a la familia de tripsinas S64, del clan PA, subclan PA(S). En la Figura 6 se presenta parte del alineamiento múltiple realizado con la secuencia SltB y ortólogos de otros hongos filamentosos. Teniendo en cuenta que el centro activo de las proteasas tipo tripsina está formado por una triada catalítica (histidina, ácido aspártico y serina) (Polgar, 2005), se examinó las regiones conservadas en el dominio proteasa identificando a los residuos H1033 y S1142 como posibles candidatos a formar parte de esta triada (Figura 6).

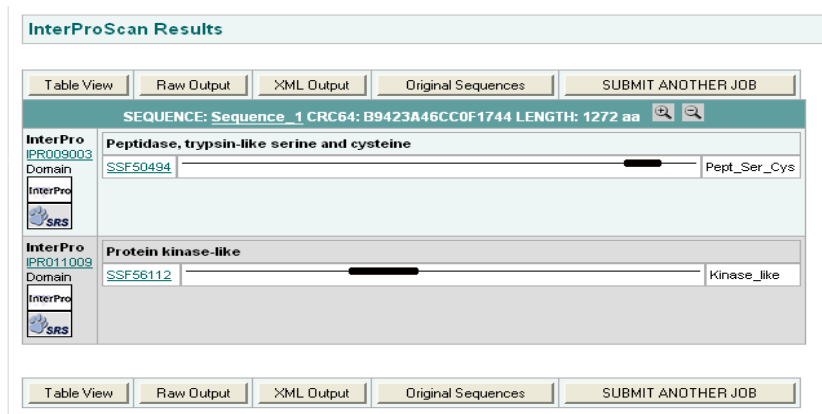


Figura 5. Análisis de la secuencia peptídica de SltB en InterProScan. La secuencia peptídica fue analizada para la identificación de dominios funcionales conservados. La gráfica muestra dos dominios; en el con una posible función peptidasa del tipo tripsina, y en el extremo C-terminal con una posible función quinasa.

4.2 Construcción de cepas mutantes *sltB*^{H1033A} y *sltB*^{S1142A}

Para determinar si los residuos H1033 y S1142 de SltB son importantes para la funcionalidad de la proteína, y consecuentemente del sistema, se decidió generar cepas mutantes en las que se

expresarían versiones de SltB, donde cada uno de estos residuos estaría reemplazado por una alanina. Se realizaron reemplazamientos génicos mediante recombinación homóloga y se utilizaron fragmentos o casetes de transformación generados mediante la técnica de mutagénesis dirigida, como se describe en la sección 3.3.1.2.

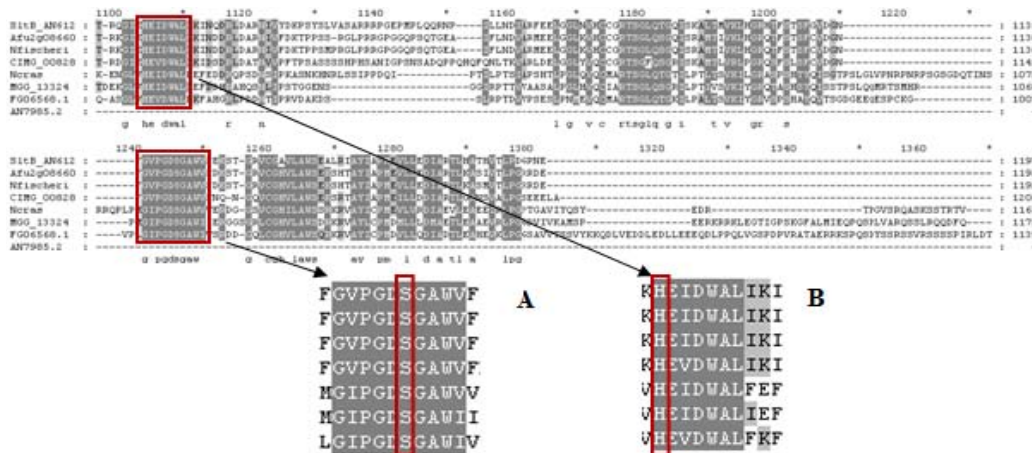


Figura 6. Alineamiento múltiple de SltB de *A. nidulans* y ortólogos de otros hongos filamentosos. Se representa el alineamiento de parte del dominio peptidasa (SltB_An612: secuencia SltB de *A. nidulans*). Se observan varias regiones conservadas. Se presenta los residuos serina 1142 (A) e histidina 1033 (B), posibles candidatos a formar parte de la triada catalítica.

En primer lugar se obtuvo parte de la región codificante de SltB para posteriormente generar las mutaciones planificadas. Se amplificó un fragmento de 1,8 kb (2031 – 3883 pb) correspondiente al gen *sltB* silvestre y se insertó en el plásmido pGEM®-T Easy (sección 3.3.1.1 y 3.3.2.1). La mezcla de ligación se transformó en la cepa DH5α de *E. coli* y de entre los transformantes que no mostraban la actividad beta-galactosidasa (colonias blancas en medio LB con Xgal) se seleccionaron 4 para proceder a aislar su plásmido y comprobar la presencia del fragmento de PCR, mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8 % p/v). En la resolución de los 4 plásmidos probados, se logró observar una banda de ~4,8 kb, que corresponde al plásmido (3 kb) junto con el inserto (1,8 kb), lo que comprueba la inserción. Se envió a secuenciar el plásmido aislado de la colonia número tres con el fin de verificar la correcta inserción del fragmento *sltB* en éste, utilizando los oligonucleótidos estándar (servicio de secuenciación) que anillan en los promotores T7 y SP6. Estos promotores flanquean el sitio de múltiple clonación (Figura 7). Al plásmido transformado se le bautizó como pGEM-T::sltB.

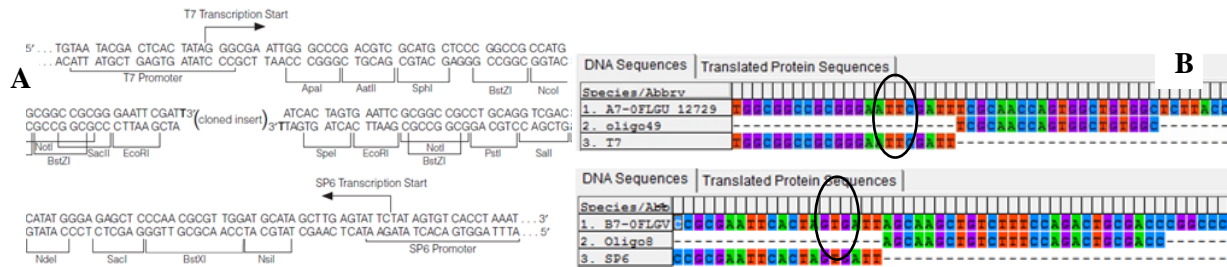


Figura 7. Verificación de la inserción del fragmento *sltB* en el plasmido pGEM®-T Easy. (A) Se muestra la estructura nucleotídica del sitio múltiple de clonación., flanqueado por los promotores T7 y SP6. (B) Se representa el análisis de secuencias utilizado para confirmar la correcta inserción del fragmento (sectores marcados). Las secuencias oligo49 y oligo8 pertenecen a los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento *sltB* e indican el inicio del fragmento, tanto 5' como 3' respectivamente. Las secuencias T7 y SP6 pertenecen al plásmido, en su sitio de inserción.

El plásmido pGEM-T::sltB fue usado como molde para la PCR de mutagénesis dirigida (sección 3.3.1.2). En la Tabla 5 se muestra el cambio en los tripletes generado por los oligonucleótidos utilizados en los diferentes eventos de mutagénesis dirigida. (Tabla 3).

Tabla 5. Estrategia de mutagénesis para generar el cambio de residuo. En rojo se representa los nucleótidos reemplazados.

Secuencia triplete silvestre	Secuencia triplete mutagenizado
CAT (His)	GCT (Ala)
TCT (Ser)	GCT (Ala)

En los dos eventos de PCR de mutagénesis dirigida, en los que se modificó el triplete de bases que codifica para His1033 y para Ser1142, el producto de PCR fue digerido con la endonucleasa *DpnI*, degradando el plásmido parental pGEM-T::sltB y las moléculas híbridas parental/copia, y dejando únicamente el plásmidos que poseían la mutación deseada. El plásmido pGEM-T::sltB mutagenizado fue propagado en células DH1 de *E. coli* (sección 3.3.2.1), y al cabo de la incubación, se logró observar varias colonias que lograron crecer en medio LB con ampicilina; de éstas se escogieron 4 con el fin de aislar su plásmido. Se enviaron a secuenciación el plásmido pGEM-T::sltB de la cepa 2 en el que fue mutagenizado la His1033, y el plásmido 3 de la cepa en donde fue mutagenizado la Ser1142; esto con el fin de verificar el correcto cambio deseado en la secuencia (Figura 8).



Figura 8. Comprobación de la mutagénesis dirigida. El cuadro rojo enmarca el triplete donde se produjo el cambio de nucleótido. (A) Triplete codificante para His1033 → Ala y (B) triplete codificante para Ser1142 → Ala.

Se realizó la PCR de fusión utilizando como moldes el fragmento *sltB* mutagenizado en el plásmido pGEM-T::sltB y los fragmentos obtenidos por PCR en la sección 3.3.1.3, utilizando los oligonucleótidos 49 y 6 (Tabla 3). En la figura 9A se representa gráficamente el casete de ADN generado en la PCR de fusión que permitió la expresión de una forma SltB mutante fusionada a GFP tras su transformación en la cepa adecuada de *A. nidulans*. La estructura de este casete, en orden 5' - 3', es: *sltB*::*gfp*::*riboB*^{A.f.}::3'UTR. Tras la transformación de la cepa MAD3652 de *A. nidulans* con este casete se seleccionaron 8 cepas recombinantes sobre medio MMR selectivo (sección 3.1). El crecimiento de estos transformantes en ausencia de riboflavina indicó la integración del casete gracias al marcador de selección, el gen *riboB* de *A. fumigatus*. Las 8 transformantes fueron purificados a homocariosis (Figura 9B).

La correcta integración del casete en el correspondiente locus de *sltB* se comprobó mediante análisis por *Southern blot*. La digestión del ADN genómico con la enzima de restricción *BglII* proporciona un patrón de bandas distintivo entre los mutantes y la cepa receptora, debiendo observarse una banda para el locus silvestre de 3,5 kb y de 7,3 kb para el locus recombinante (Figura 9C). La sonda radioactiva utilizada en ambos casos cubría la CDS de *sltB*.

A partir de éste análisis se logró observar que todos los transformantes en los cuales fue mutagenizado el triplete de histidina (transformantes His1033) integraron el casete de forma

correcta en el locus deseado (Figura 9D), a excepción del aislado 8.

Por otro lado, se observó que todos los transformantes en los cuales fue mutagenizado el triplete serina (transformantes Ser1142) integraron correctamente el casete de ADN (Figura 9E). Para los análisis fenotípicos y moleculares posteriores se utilizaron los transformantes 5 y 6 que expresan $SltB^{His1033A}$, y los transformantes 6 y 7 que expresan $SltB^{Ser1142A}$.

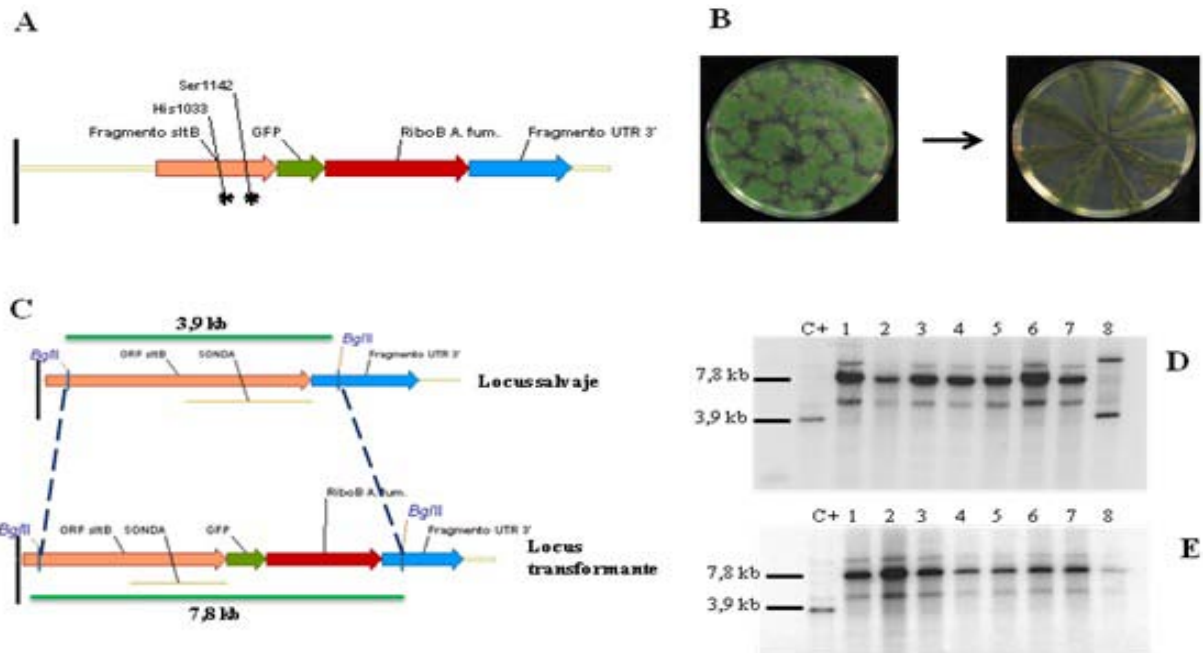


Figura 9. Transformación de *Aspergillus nidulans*. Se utilizó la misma estrategia para construir cepas mutantes tanto $SltB^{His1033A}$ como $SltB^{Ser1142A}$. **A)** Estructura del casete generado mediante PCR de fusión; Ser1142 o His1033 representan las zonas mutadas en cepas diferentes. **B)** Colonias aisladas en MMR auxótrofas para riboflavina (izquierda); purificadas a homocariosis (derecha). **C)** Mapa de restricción para su análisis mediante *Southern blot*. **D)** y **E)** *Southern blot* donde se observa la hibridación de la sonda al ADN genómico de los transformantes His1033 y Ser1142 respectivamente. C+, MAD3652 como cepa receptora silvestre.

4.3 Análisis de las nuevas mutaciones generadas en *SltB* sobre el sistema regulatorio.

4.3.1 Análisis fenotípico de las mutaciones en los transformantes.

Seguidamente se analizó el fenotipo sensibilidad o resistencia a cationes y pH alcalino de las cepas mutantes $sltB^{His1033A}$ y $sltB^{Ser1142A}$. En este análisis se comparó el crecimiento colonial de las cepas mutantes con el de la cepa silvestre MAD2733 (función normal para *SltB*) y el de la cepa nula para *SltB* MAD3682 (ausencia de función total de *SltB*) frente a los estreses anteriores. Las condiciones de estrés fueron generadas por la adición al medio de cultivo MMA de diferentes sales mono- y divalentes (sección 3.1) (Figura 10).

- **Cepa mutante $SltB^{His1033A}$**

Las pruebas de crecimiento y forma colonial en placa, realizadas para los transformantes 5 y 6, revelaron un fenotipo similar al silvestre, en presencia de NaCl, KCl y MgCl₂ en las concentraciones ensayadas, ya que no se distingue una marcada diferencia en el tamaño y forma de la colonia de ambos transformantes con la cepa MAD2733. Por otro lado en presencia LiCl a 0,3 M o con pH alcalino, la sensibilidad de los transformantes aumentó significativamente, aunque no como el control negativo de crecimiento (MAD3682). El desarrollo de los transformantes en presencia de CaCl₂ presentó un fenotipo silvestre (Figura 10).

- Cepas mutante *SltB*^{S1142A}

Los transformantes 6 y 7 mostraron una inhibición total de su crecimiento en presencia de estrés, siendo éste similar al presentado por la cepa nula MAD3682 (Figura 10).

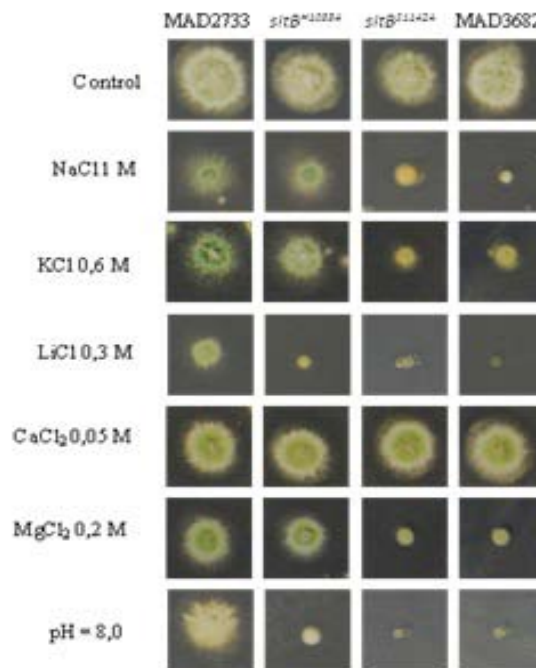


Figura 10. Análisis fenotípico de las cepas mutantes *sltB*^{H1033A} y *sltB*^{S1142A}. Se inocularon esporas en placas con MMA complementado con diferentes sales a la concentración indicada. Para alcalinizar el medio a pH 8 se utilizó Na₂NPO₄ a 100 mM. La placa control no contenía compuestos que generen estrés. MAD2733, cepa silvestre. MAD3682 cepa Δ *sltB*.

4.3.2 Efecto de las mutaciones en la expresión y procesamiento de SltB

Para medir los efectos a nivel molecular de la mutación dirigida en His1033 y en Ser1142 de la proteína SltB, se realizaron ensayos de *Western blot*, analizando la expresión y el procesamiento de SltB y del factor de transcripción SltA. La cepa receptora de *A. nidulans* utilizada para generar los dos mutantes, tiene un fondo genético donde *sltA* se encuentra etiquetado con el epítipo HA, lo que permite visualizar a SltA mediante inmunodetección con un anticuerpo específico para HA. De esta forma podemos llevar a cabo la observación diferencial de ambas proteínas en la célula, ya que SltB está etiquetado con la proteína fluorescente GFP (Figura 11).

Comparando con la cepa control silvestre, se logró evidenciar un procesamiento casi nulo de SltB en las cepas mutantes *sltB*^{H1033A}, que presentaron la acumulación de la forma nativa sin procesar, en altas concentraciones (~190 kD); las formas truncadas del dominio peptidasa, producto del procesamiento, son casi indistinguibles. Al analizar SltA en los mutantes *sltB*^{H1033A}, se pudo evidenciar que esta proteína sí se procesa, pero en cantidades por debajo de los niveles normales observados en la cepa silvestre; de igual forma presenta una acumulación de su forma nativa de 78 kD. Por otro lado, en los mutantes *sltB*^{S1142A} no se logró identificar las formas procesadas del dominio peptidasa, y su forma nativa es prácticamente indistinguible. Al analizar lo que ocurre con la proteína SltA se comprobó la ausencia de procesamiento, encontrando sólo la forma nativa de 78 kDa (Figura 11).

Se secuenció el gen *sltB* en su totalidad para comprobar si el cambio producido en los tripletes se mantenía, y si el fenotipo y los efectos moleculares observados no eran provocados por otras mutaciones intragénicas adicionales. Se comprobó que no existe ninguna mutación en la

secuencia, salvo la provocada en la mutagénesis dirigida.

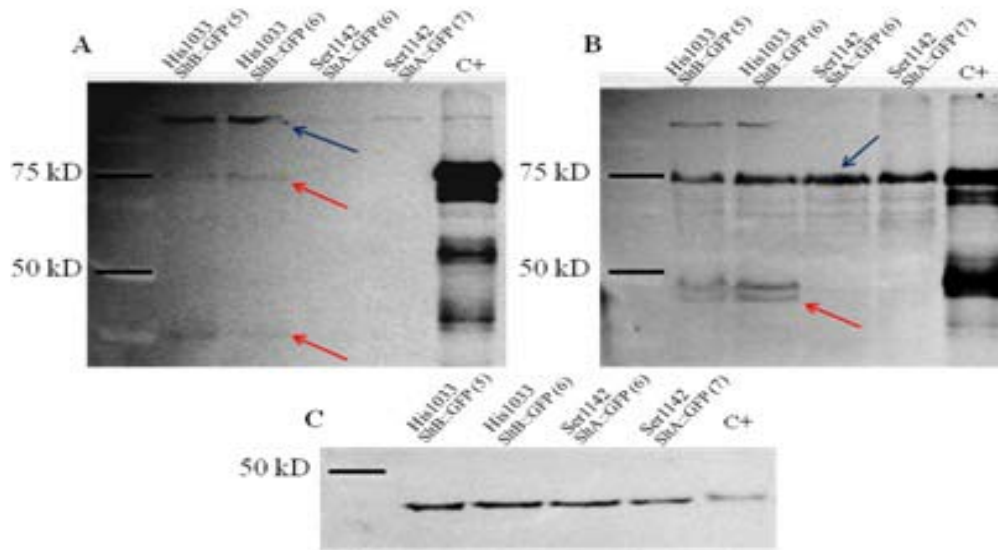


Figura 11. Análisis de la expresión y procesamiento de *sltA* y *sltB* en las cepas mutantes. Imagen de la inmunodetección mediante *Western blot* de (A) SltB utilizando α -GFP y (B) SltA utilizando α -HA3. C. Inmunodetección de actina. C+, MAD3751 como cepa silvestre control. Flecha azul, formas nativas; Flecha roja, formas procesadas.

4.4 Búsqueda de supresores de la pérdida de función en el sistema *slt*

El aislamiento de mutantes supresores de pérdida de función se utiliza con el fin de obtener nuevos alelos mutantes, para lograr comprender y describir nuevas características propias del sistema o de sistemas complementarios. El objetivo de esta sección fue buscar mediante mutación espontánea supresores que rescaten la pérdida de función de SltB ocasionada por la delección del residuo Phe1136 en su secuencia nucleotídica. Esta delección está presente en la cepa mutante *sltB53*, quien fue aislado como supresor extragenético del reducido crecimiento colonial y de conidiación de una cepa nula para el gen *vps20*, perteneciente al complejo de transporte endosomal ESCRT en *A. nidulans* (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011). Esta mutación en SltB causa su pérdida de función y la del sistema de señalización de *slt*. Para continuar el análisis de SltB53 se construyeron dos cepas, una que expresa la proteína mutante SltB53 etiquetada con GFP en su extremo carboxilo terminal (MAD4013) y otra en la que el factor SltA está etiquetado C-terminalmente con HA (MAD4487).

La mutación espontánea se indujo sometiendo al hongo a estrés generado por la adición al medio MMA de NaCl 1 M de concentración. Se hicieron un total de 112 inoculaciones de conidiospora en este medio y se incubaron a 37°C. Se observó en el tiempo la aparición de sectores de crecimiento en algunas de las colonias (Figura 12A), los cuales fueron reaislados en medio MMA sin estrés. Se reaislaron un total de 25 colonias que presentaron un mejorado fenotipo de crecimiento perfilándose como candidatas a poseer mutaciones supresoras. Estas 25 colonias fueron separadas en tres grupos diferentes, de acuerdo a la capacidad de conidiación que presentaron (Figura 12 B). Los aislados catalogados como grupo 1 (9 aislados) presentaron un nivel de conidiación de tipo silvestre, los aislados del grupo 2 presentaron un nivel de conidiación reducido (8 aislados) y los del grupo 3 presentaron un nulo nivel de conidiación (8 aislados). Se decidió empezar analizando los aislados del grupo 1 por ser los que mayor nivel de supresión presentaron. Se realizaron ensayos fenotípicos probando la resistencia los aislados del grupo 1 a condiciones de estrés ambiental generado por la presencia de NaCl 1M ó LiCl 0,3 M, y en

condiciones de pH alcalino (Figura 12 C). Los supresores presentaron una elevada sensibilidad al NaCl, aunque lograron alcanzar un desarrollo mayor que las cepas de donde se originaron (MAD4013 y MAD4487), pero muy por debajo de la cepa de tipo silvestre (MAD2733). Por otro lado los supresores presentaron un fenotipo totalmente sensible a LiCl y a pH alcalino (pH 8,0), similar a las cepas originarias (MAD4013 y MAD4487).

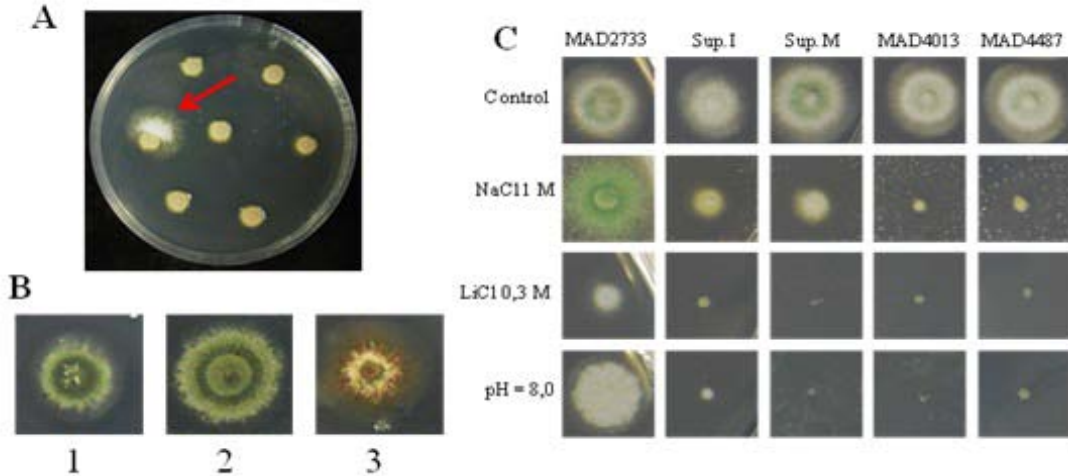


Figura 12. Análisis fenotípico de los supresores obtenidos. A) Se observaron sectores de crecimiento en colonias sometidas a estrés ambiental por la adición de NaCl 1 M. B) Representantes de los tres diferentes grupos basados en su capacidad de conidiación, que fueron reaislados como posibles mutantes supresores C) Se inocularon esporas en placas con MMA complementado con diferentes sales a la concentración indicada. La placa pH = 8,0 contenía 100 mM Na_2NPO_4 . La placa control no contenía compuestos que generen estrés. MAD2733, cepa silvestre. MAD4013 mutante SltB53 etiquetado con GFP en C-terminal. MAD4487, mutante SltB53 con SltA etiquetado con HA en C-terminal.

El comportamiento molecular del sistema en los supresores se analizó mediante *Western blot* la proteína SltA (se analizó únicamente SltA puesto que los supresores obtenidos provenía de la cepa parental MAD4487). Al realizar la inmunodetección del epítipo HA, se observó que SltA no había sufrido procesamiento ya que se detectó únicamente la forma de 78 kDa y a unos niveles mayores que en la cepa silvestre (Figura 13). La inmunodetección de actina se utilizó como control de carga y permitió comprobar que la cantidad de extracto proteico era uniforme entre las muestras utilizadas en la electroforesis de SDS-PAGE.

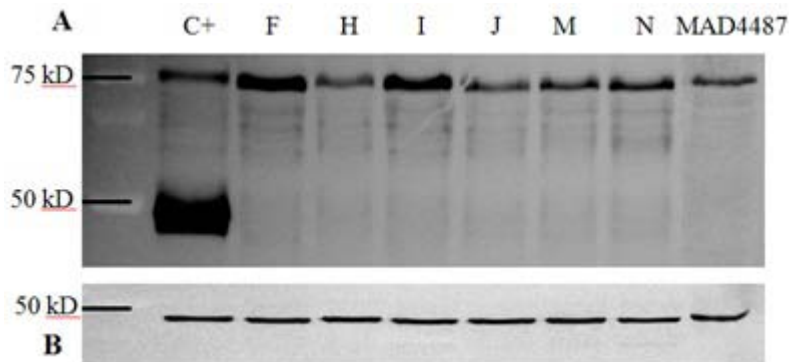


Figura 13. Análisis de la expresión de SltA en los supresores obtenidos. A) Imagen de la inmunodetección mediante *Western blot* utilizando α -HA; se detectó el no procesamiento de SltA. Solamente se observó la acumulación de la forma de 78 kDa. B) Inmunodetección de actina. C+, cepa control silvestre MAD3751.

Para comprobar si las mutaciones supresoras espontáneas ocurrieron en los loci *sltA* o *sltB*,

ambos genes fueron enviados a secuenciar en su totalidad. Se envió al servicio de secuenciación los supresores I y M, y no se observó ninguna mutación en la secuencia nucleotídica tanto en *SltA* como en *SltB*.

5. DISCUSIÓN

Tomando ventaja de la potente herramienta que representa el acceso a las diferentes bases de datos genómicas y proteómicas, incluida el genoma de *Aspergillus nidulans* (*AspGD*, *Aspergillus Comparative Database* (Galagan *et al.*, 2005), y poniendo en práctica el conocimiento existente en el estudio de la biología celular y molecular, regulación génica, y el funcionamiento biológico y fisiología del hongo, se decidió emplear la metodología y estrategias de estudio descritos en este documento, logrando un mejor entendimiento del funcionamiento del sistema de adaptación a cationes y pH alcalino, *slt* (Spielvogel *et al.*, 2008; Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011).

El objetivo principal de este estudio fue el de analizar la función de dos residuos pertenecientes al posible centro catalítico del dominio proteasa de SltB, Se estudió el efecto tanto fenotípico como molecular que se deriva del reemplazamiento dirigido e independiente de los residuos His1033 y Ser1142 por alaninas. Ambos residuos están altamente conservados en el dominio serin peptidasa de la proteína señalizadora SltB. Para esto se combinó el uso de varias técnicas de laboratorio, tanto de básicas (manejo y mantenimiento del hongo, pruebas fenotípicas en placa y PCR) como especializadas (inmunodetección de proteínas, *Southern blot* y secuenciación).

El estudio y comprensión de sistemas de regulación de la expresión génica que median la respuesta estrés ambiental, se lo realiza a través de varias aproximaciones. Una de ellas es la generación de alelos mutantes mediante genética en reverso, observando el efecto en el desarrollo y a nivel molecular. En este estudio, la generación de alelos mutantes se realizó mediante genética en reverso: mutagénesis dirigida de nucleótidos en la secuencia codificante del locus *sltB*, y la construcción de quimeras etiquetadas con GFP para su posterior análisis por Western-blot, utilizando los casetes de ADN generados para obtener las nuevas cepas mutantes mediante transformación y selección de eventos de recombinación homóloga en los loci seleccionados.

La proteína señalizadora SltB forma parte esencial del sistema de regulación génica *slt*, ya que mutantes de delección para este gen dan lugar a la pérdida de la viabilidad o un pobre desarrollo vegetativo del hongo en presencia de altas concentraciones de cationes y pH alcalino. Análisis informáticos de la secuencia proteica de SltB, indican la presencia de dos dominios posiblemente funcionales, un dominio pseudoquinasa, codificado en sus primeros 477 aminoácidos, y un dominio que guarda gran similitud con las serin peptidasas del tipo tripsina. Las tripsinas poseen en su centro activo la triada catalítica (His-Asp-Ser). En el caso de SltB, tras un análisis informático básico, decidimos enfocarnos en los residuos His1033 y Ser1142 (sección 4.1), como posibles miembros de esta triada. Basándonos en la experiencia previa del laboratorio UGMA en la generación de mutantes con proteínas quiméricas etiquetadas, mutagénesis dirigida y reemplazamiento génico, se construyeron las cepas mutantes *sltB*^{S1142A} y *sltB*^{H1033A}.

La autocatálisis es un mecanismo de activación habitual entre las serin peptidasas (Polgár, 2005), y un ejemplo de esto es la proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, Ssy5. Ensayos de sustitución aminoacídica en el residuo Ser640 de esta proteína, perteneciente a la triada catalítica, condujeron a la ausencia de autocatálisis por parte de Ssy5, así como el no procesamiento de otras proteínas dependientes de esta peptidasa (Abdel-Sater *et al.*, 2004).

En este estudio, los análisis moleculares en el mutante *sltB*^{H1033A} revelaron un resultado similar, al observado por Abdel-Sater y colaboradores (2004), demostrando la importancia del residuo His1033 en la funcionalidad de la proteína. La sustitución de este residuo por una alanina, reveló

en los ensayos de *Western blot* un procesamiento anormal en la proteína SltB, y la acumulación de su forma nativa y en un muy bajo nivel, las formas procesadas (Figura 9A). Se sabe que la sustitución de los residuos miembros de la triada por residuos poco reactivos como la alanina, ocasionan la pérdida de la función peptidasa, no obstante, se ha observado que puede permanecer alguna actividad remanente del procesamiento, ya que el papel de las endonucleasas es mejorar la tasa de hidrólisis no enzimática del enlace amida entre 10^9 y 10^{10} veces (Polgar, 2005). Esto podría explicar el imperceptible nivel de procesamiento observado en la inmunodetección de SltB. De igual forma se logró observar un disminuido nivel de procesamiento del factor transcripcional SltA en comparación con la cepa silvestre (Figura 9B), revelando la acumulación de la forma de 78 kD. La escasa autocatálisis de SltB pudiera ser suficiente para permitir la señalización de SltA y generar su procesamiento en niveles bajos. Esto podría explicar el fenotipo observado en los ensayos de crecimiento bajo condiciones de estrés cationico y pH alcalino. Aparentemente, el sistema no requiere de altos niveles de procesamiento para ponerse en marcha, ya que los niveles observados de las formas procesadas de SltB y de la forma de 32 kD de SltA, son suficientes para proporcionar a estas cepas tolerancia a elevadas concentraciones de cationes como Na^+ , K^+ y Mg^{2+} , posiblemente a que la señal que produce SltA es amplificada en el sistema. Este nivel de procesamiento no fue suficiente para la tolerancia del hongo LiCl o pH alcalino (Figura 8). Con esta evidencia se puede concluir que el residuo His1033, muy probablemente, sea miembro de la triada catalítica.

Por otro lado, los análisis moleculares en el mutante *sltB*^{S1142A} revelaron niveles extremadamente bajos de SltB, contrastando con los generados por el alelo *sltB*^{H1033A} (Figura 9). Como era esperable, en la práctica ausencia de SltB, tanto en su versión completa o truncada, fue imposible detectar el procesamiento de SltA. Este patrón es igual al observado en una cepa Δ *sltB*, en donde únicamente se encuentra la acumulación de la forma nativa SltA^{78kD}. Debido a la falta de acumulación de la forma completa de SltB, no es posible concluir que la sustitución de la Ser1142 por una alanina se traduzca en una pérdida de función catalítica por parte del dominio proteasa, ni tampoco que este residuo pueda formar parte de la triada catalítica. La sustitución Ser1142Ala podría estar generando una inestabilidad conformacional de la proteína, la disminución de su nivel de traducción, o inclusive la no transcripción del gen *sltB*. En la figura 10 se observa que el mutante *sltB*^{S1142A} presenta un fenotipo sensibilidad a cationes, igual que el presentado en una cepa Δ *sltB*, confirmando el bloqueo del sistema *slt*, y demostrando así la importancia de la Ser1142 para la funcionalidad de la proteína; esta sería la razón de su gran conservación entre sus homólogos.

Otra aproximación para el estudio de la señalización celular y la regulación génica, es la genética clásica. Si bien en la genética en reverso se genera mutantes a partir del conocimiento de la secuencia nucleotídica de un gen para determinar su función, la genética clásica parte de individuos cuyo fenotipo sugiere la generación espontánea de mutaciones en su genoma. Un ejemplo de esto es el surgimiento de mutantes supresoras que recuperan la viabilidad celular. Gracias al estudio de estas mutantes se logró identificar nuevos loci, como es el caso *hala*, supresor del efecto negativo de la pérdida de función de PacC frente a la resistencia al anión molibdato (Espeso *et al.*, 2005), así como *sltB* (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011), como ya se ha mencionado en la introducción (ver a demás la sección 4.4).

En este estudio se intentó buscar nuevos alelos mutantes a través de la generación de supresores de la pérdida de función de SltB. El análisis de la inmunodetección mediante *Western blot* de la proteína SltA en estos supresores, pone de manifiesto la no recuperación de la pérdida de función en SltB. En este análisis se logró observar únicamente la acumulación de la forma no truncada

SltA^{78kD}, en concordancia a lo observado en cepas Δ *sltB*, aunque la concentración de esta forma es peculiarmente más elevada de lo normal, para estos casos. La escasa resistencia observada al estrés producido por NaCl, puede deberse a la gran concentración de la forma SltA^{78kD} observada, aunque ésta no fue suficiente para recuperar los niveles normales en el desarrollo del hongo. Al no haberse encontrado mutaciones adicionales en el alelo *sltB* ni en el alelo *sltA*, podemos concluir que la mutación supresora es extragénica.

6. CONCLUSIONES

- Se logró cumplir con los objetivos planteados con mi estancia en el laboratorio de la UGMA (CSIC-CIB) en cuanto a mi formación según corresponde con los estudios del Máster, aportándome una base sólida de conocimientos que me permitirán continuar con mi formación científico – investigador.
- Se demostró la eficacia de las técnicas moleculares utilizadas en este laboratorio al lograr con éxito construir cepas mutantes de *Aspergillus nidulans* los cuales que portaban versiones de SltB, cuyos residuos His1033 ó Ser1142 fueron reemplazados por una alanina.
- El residuo His1033 es importante para que ocurra un normal procesamiento de SltB, sugiriendo su posible vinculación directa en la actividad peptidasa, como miembro de la triada catalítica.
- No se requieren altos niveles de procesamiento en SltA y SltB para lograr la sobrevivencia por parte de *Aspergillus nidulans* bajo condiciones de estrés ocasionado por ciertos cationes mono- y divalentes, más no pH alcalino.
- El residuo Ser1142 puede tener mayores implicaciones en la estabilidad funcional y molecular de la proteína, y no nos permite intuir su pertenencia a la triada catalítica.
- Los mutantes supresores de pérdida de función, son una valiosa fuente para la obtención de alelos mutantes que nos permiten identificar nuevas características en dichos alelos y en el sistema al que pertenecen.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Sater, F., El Bakkoury, M., Urrestarazu, A., Vissers, S., and Andre, B. (2004) Amino acid signaling in yeast: Casein kinase I and the Ssy5 endoprotease are key determinants of endoproteolytic activation of the membrane-bound Stp1 transcription Factor. *Mol Cell Biol* **24(22)**: 9771–9785.
- Adams, T.H., Wieser, J.k., and Jae-Hyuk, Y. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Biol Rev* **62(1)**: 35-54.
- Calcagno-Pizarelli, A.M., Hervás-Aguilar, A., Galindo, A., Abenza, J.F., Peñalva, M.A., y 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 signaling. *J Cell Sci* **124(Pt23)**: 4064-4076.
- Chilton, I. J., Delaney, C. E., Barham-Morris, J., Fincham, D. A., Hooley, P., y Whitehead, M.P. (2008) The *Aspergillus nidulans* stress response transcription factor StzA is ascomycete-specific and shows species-specific polymorphisms in the C-terminal región. *Mycol Res* **112(Pt12)**: 435-446.
- Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113(1)**: 51-56.

- Díez, E., Josué, A., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., *et al.* (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *The EMBO Journal* **21(6)**: 1350-1359.
- Dyer, P.S., Paoletti, M., and Archer D.B. (2003) Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149(Pt9)**: 2301-2303.
- Espeso, E.A., Cobeño, L., and Arst, H.N. (2005) Discrepancies between recombination frequencies and physical distances in *Aspergillus nidulans*: Implications for gene identification. *Genetics* **171(2)**: 835-838.
- Etxebeste, O., Ugalde, U., and Espeso, E.A. (2010) Adaptive and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr Protein Pept Sci* **11(8)**: 704-718.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., *et al.* (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438(7071)**: 1105-1115.
- Gasch, A.P. (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* **24(11)**: 961-976.
- Glass, N.L., Jacobson, D.J., and Shiu, P.K. (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu Rev Genet* **34**: 165-186.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., and Heitman, J. (2010) The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Rev* **74(2)**: 298-340.
- Mager, W.H., and De Kruijff, A.J. (1995) Stress-Induced Transcriptional Activation. *Microbiol Rev* **59(3)**: 506-531.
- O'neil, J.D., Bugno, M., Stanley, M.S., Barham-Morris, J.B., Woodcock, N.A., Clement, D.J., *et al.* (2002) Cloning of a novel gene encoding a C2H2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Mycol Res* **106(4)**: 491-498.
- Polgár, L. (2005) The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* **62(19-20)**: 2121-2172.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D., and Bufton, A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141-238.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spielvogel, A., Findon, H., Arst, H.N., Araújo-Bazán, L., Hernández-Ortíz, P., Stahl, U., *et al.* (2008) Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* **414(3)**: 419-429.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R. A., and Davies, R.W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26(2-3)**: 205-21.
- Todd, R.B., Davis, M.A., and Hynes, M.J. (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* **2(4)**: 822-830.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, P.C., *et al.* (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3(5)**: 1359-1366.